



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Aislamiento y caracterización parcial de bacterias lácticas halófilas
de quesos en México”**

TESIS

Para Obtener el Título de:

QUIMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

Adriana Berenice Gutiérrez Ortega



MÉXICO, D.F.

2008.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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:

PRESIDENTA: Maria Elena Cañizo Suárez.

VOCAL: Dra. Maria del Carmen Wacher Rodarte.

SECRETARIO: Dr. Humberto Hernández Sánchez.

1er SUPLENTE: Agustín Reyo Herrera.

2do SUPLENTE: Martha Giles Gómez.

**LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Escuela Nacional de Ciencias
Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.**

ASESOR: Dr. Humberto Hernández Sánchez. _____

SUSTENTANTE: Adriana Berenice Gutiérrez Ortega. _____

*Dedicada a ese angelito que siempre
estuvo a mi lado y aunque no físicamente
si en mis pensamientos y que fue mi
inspiración para terminar mi carrera,
pero sobre todo mi motivación para
salir adelante y no caerme, gracias
por estar siempre conmigo y perdón
por no poder verte.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme tantas oportunidades y que a pesar de mis fracasos siempre ha estado a mi lado y me ha perdonado todo sin merecerlo, enseñándome lo maravilloso que es la vida, que con dedicación y trabajo todo se puede lograr.

A la virgen de Españita por que siempre ha estado a mi lado y me ha dado la fe para seguir adelante.

A la H. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO por darme la oportunidad de pertenecer a esta gran institución a la cual le debo más de lo que me ha dado, por que es un gran orgullo ser universitaria.

A mi madre, por ser una gran mujer, un ejemplo a seguir y la mejor madre del mundo, por enseñarme a luchar por lo que se quiere y buscar una mejor calidad de vida, por darme la vida y cuidar de mi, y por defender siempre a tu familia, gracias mamita te quiero mucho.

A mi hermana Karla por ser la única de mi familia que ha creído en mi, por su apoyo incondicional y sus palabras de aliento, que para mi ella es un gran ejemplo a seguir y mi mayor orgullo y por ser la mejor hermana del mundo, gracias, te quiero mucho.

A mi padre por que a pesar de que nunca ha creído en mi, y que para él vale más cualquier crítica en contra mía, que mis propias palabras, a pesar de que yo soy su hija. Le he demostrado con esto de lo que soy capaz. Y sin embargo para mí siempre será mi padre y el mejor del mundo.

A mi abuelo Francisco Ortega C. (q. p. d.) por ser el mejor abuelo del mundo y darme la oportunidad de conocerlo y dejarme una sonrisa como el mejor recuerdo que tengo de él. Y darme lo más valioso de mi vida, que es mi madre.

A mi abuelita Concepción Gudiño (q. p. d.) por ser la mejor abuelita del mundo, una gran mujer y sobre todo muy sabia, por que otra como ella no creo que exista.

Al Instituto Politécnico Nacional por prestarme sus instalaciones para la realización de mi tesis.

Al Dr. Humberto Hernández S. por darme el honor y la oportunidad de conocerlo y trabajar con él, por su apoyo y atención hacia mí.

A mi mejor amiga Laura A. Salgado por estar conmigo siempre y brindarme lo más valioso del mundo que es para mi, su gran amistad. Gracias por estos 11 años de conocerte.

A Saúl Arellano E. por aguantarme tanto y demostrarme lo que es que alguien te ame de verdad, gracias por estar conmigo a pesar de todo. Te quiero mucho.

A mi gran amiga Luz María Román Miranda por brindarme su amistad y ser un gran ejemplo a seguir, por que ella demuestra lo fuerte que es una mujer, por que es esposa, madre, estudiante, trabajadora y para mi es un orgullo tenerla como amiga por que es un gran ejemplo para muchas.

Al mejor amigo del mundo Francisco J. Reyes R. por estar conmigo en muchas situaciones difíciles, escucharme y darme sus sabios consejos, pero sobre todo por brindarme su valiosísima amistad, gracias. Te quiero mucho.

A Fredy Morales Trejo, por ayudarme en el desarrollo de mi tesis y hacerme muy divertida la estancia en el laboratorio (sobre todo por platicar mucho conmigo). Gracias por tu apoyo.

A mis amigos y compañeros de la H. Facultad de Química, Alicia Barbosa, Talía A., Verónica Aviles, Aída C., Norma M., Iralda, Jesús Barbosa y Rosa.

A mis amigos y compañeros del laboratorio del H. Instituto Politécnico Nacional, a Maribel C. (por ser la primera en hacerme sentir muy a gusto en el laboratorio al brindarme lo más valioso de cada ser humano que es la amistad), a Alaide, Brenda, Alejandro, Deni y su esposo David.

“La Universidad es el gran proyecto social de la nación mexicana. Los beneficios para el país están a la vista, son inobjetable. Pero la universidad es también un proyecto siempre inacabado, siempre mejorado, prodigioso y generoso; criticado y elogiado, polémico y diverso”

(Juan Ramón de la Fuente)

“No hay situación por difícil que parezca que no sirva para evolucionar”

(Alejandro Maldonado)

“Si engrandecemos nuestras alegrías como engrandecemos nuestras penas, nuestras dificultades se perderían”

(Alejandro Maldonado)

INDICE

I. INTRODUCCION	2
II. ANTECEDENTES	5
II.1. Generalidades de la leche.....	5
II.2. Fabricación de quesos	5
II.3. Maduración de los quesos.....	6
II.3.1. Queso Tipo Cotija	6
II.3.2 Queso Doble Crema	8
II.4.1. Papel de las LAB en la fabricación de quesos	10
II.5. Cultivos iniciadores.....	11
II.5.1. Funciones esenciales de los cultivos iniciadores.	13
II. 5.2.- Bacterias ácido lácticas no iniciadoras (NSLAB)	13
II.5.3. Papel de los metabolitos de las bacterias lácticas en tecnología quesera.	15
II.5.3.1. Ácido láctico	15
II.5.3.2. Péptidos, aminoácidos y productos derivados	16
II.5.4. Fuentes de las bacterias lácticas.....	17
II.5.5. HALAB en quesos.....	18
II.6. Aislamiento y caracterización de microorganismos	20
II.6.1. Aislamiento y recuento.....	20
II.6.2. Características fisiológicas y bioquímicas.	21
II.6.2.1 Prueba catalasa	21
II.6.2.2 Prueba de oxidasa.	22
II.6.2.3 Prueba de hidrólisis en almidón.....	24
II.6.2.4 Prueba de licuefacción de gelatina.	28
II.6.2.5 Prueba de Voges-Proskauer (VP-MR).....	29
II.6.2.6 Prueba de hidrólisis de caseína.....	30
II.6.2.7 Prueba de reducción de nitrato.....	31
II.6.2.8 Producción de gas a partir de glucosa y pruebas de fermentación de hidratos de carbono.....	33
II.6.2.9 Producción de amoniaco a partir de arginina.	35
II.6.2.10 Determinación de la actividad lipolítica.....	35
II.6.2.11 Determinación de la actividad proteolítica.	36
III. OBJETIVOS	38
III.1. Objetivo general	38

III.2. Objetivos particulares	38
IV. JUSTIFICACIÓN	40
V. METODOLOGÍA	42
V.1. Materia prima	42
V.2. Métodos de análisis	42
V.2.1 Determinación de humedad.	42
V.2.2. Determinación de pH.....	42
V.3. Preparación de los medios de aislamiento de bacterias ácido-lácticas halófilas.....	43
V.4. Aislamiento de bacterias ácido-lácticas halófilas a partir de muestras de queso.	45
V.5. Características morfológicas y de cultivo.....	46
V.5.1. Prueba de Movilidad.....	46
V.6. Características de crecimiento en relación a [NaCl], temperaturas y tiempo óptimo de crecimiento.	47
V.7. Características fisiológicas y bioquímicas.	48
V.7.1. Prueba de Catalasa	48
V.7.2. Prueba de Oxidasa.	48
V.7.3. Prueba de hidrólisis de almidón.....	49
V.7.4. Prueba de licuefacción de gelatina.....	49
V.7.5. Prueba de Voges-Proskauer y Rojo de Metilo (VP-MR).	50
V.7.6. Prueba de hidrólisis de caseína.....	50
V.7.7. Prueba de reducción de nitrato.....	51
V.7.8. Producción de gas a partir de glucosa.	52
V.7.9. Producción de amoníaco a partir de arginina.	52
V.7.10. Determinación de la actividad lipolítica, se realizo en agar de tributirina....	52
V.7.11 Determinación de la actividad proteolítica.	53
VI. Diagrama de Bloques	54
VI.1. Esquema general del aislamiento y caracterización de las cepas aisladas del queso tipo cotija (QC) y queso doble crema (QDC).....	54
VI.2. Preparación de la leche para inocular.	55
VI.3 Aislamiento de las bacterias presentes en los quesos utilizados (queso tipo cotija y queso doble crema).	55
VII. Equipo y Reactivos	56

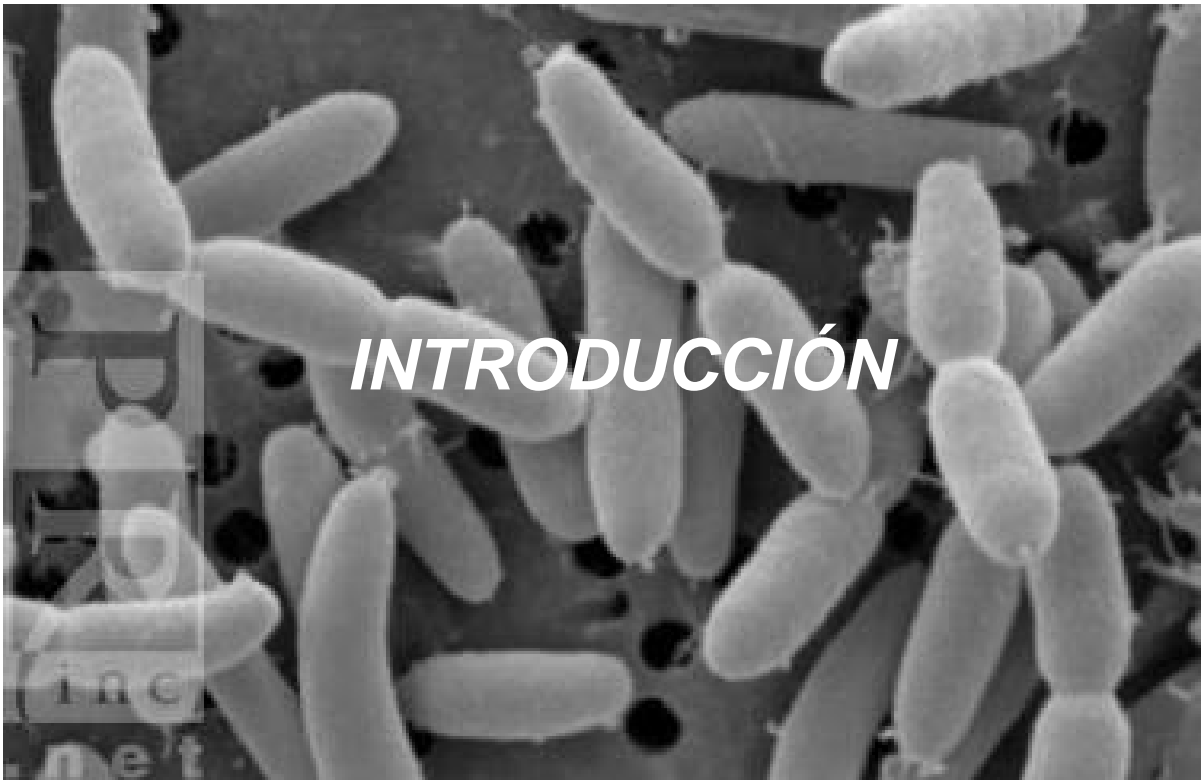
VIII. Resultados y discusión.....	58
VIII.1. Análisis de los quesos tipo cotija y doble crema.	58
VIII.2. Determinación del contenido de NaCl.	58
VIII. 4. Características microscópicas y macroscópicas a partir de las cepas aisladas del queso tipo cotija (QC) y queso doble crema (QDC).	60
VIII. 4.1. Observaciones microscópicas:.....	60
VIII.4.2. Observaciones macroscópicas:	61
VIII.5. Determinación de [NaCl], Temperatura y tiempo óptimo de crecimiento para cada cepa aislada.....	65
VIII.6. Pruebas bioquímicas.....	70
IX. CONCLUSIONES	75
X. GLOSARIO	78
X.1. Abreviaturas	79
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	81

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Ruta metabólica de la lactosa en bacterias lácticas homofermentativas (www.biologia.edu.ar).....	10
Fig. 2 Ruta metabólica de la lactosa en bacterias lácticas heterofermentativas (www.biologia.edu.ar).....	10
Fig. 3 Cultivos iniciadores de bacterias ácido-lácticas homofermentativas (www.biologia.edu.ar).....	12
Fig. 4 Ruta metabólica para la producción de ácido láctico (www.biologia.edu.ar).....	15
Fig.5 Ejemplo de la proteólisis esquematizado por el sistema proteolítico de los <i>lactococcus</i> (www.biologia.edu.ar).....	17
Fig.6 Imagen de una bacteria con flagelos peritricos	19
Fig.7 Molécula de Glucosa.....	25
Tabla 2. Datos del contenido de NaCl de los quesos tipo cotija y doble crema (fresco y seco).....	59
Tabla 3. Datos de pH en caldo GYPC y en leche descremada inoculados con las cepas aisladas de los quesos tipo cotija y doble crema.....	59
Fig. 8 Tinción Gram de las bacterias halófilas aisladas del.....	60

queso tipo cotija [bacterias Gram (+)]	60
Fig. 9 Tinción Gram de las bacterias halófilas aisladas del	61
queso doble crema [bacterias Gram (+)]	61
Fig. 10 Cepas del QDC y QC inoculadas en caldo GYPC a las 24 h. a) caldo GYPC sin inocular, b) caldo GYPC inoculado con la cepa aislada de QDC y c) caldo GYPC inoculado con la cepa aislada del QC.....	62
Fig. 11 Cepas del QDC y QC inoculadas en caldo GYPC a las 48 h. d) caldo GYPC sin inocular, e) caldo GYPC inoculado con la cepa de QC y f) caldo GYPC inoculado con la cepa de QDC.	62
Fig. 12 Colonias de queso tipo cotija en agar GYPC a las 48 h. de inoculación.	63
Fig.13 Colonias de QDC en agar GYPC inclinado.	63
Fig. 14 Colonias de queso doble crema en agar GYPC a las 48 h. de inoculación....	63
Fig.15 Prueba de movilidad de la cepa del queso tipo cotija. i) Medio sin TTC y j) Amplificación de la imagen j k) Medio con TTC.....	64
Fig. 16 Curva de crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl para la cepa aislada del QDC a 24 y 48 horas de incubación.....	65
Fig. 17 Curva de crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl para la cepa aislada del QC a las 24 y 48 horas de incubación.....	66
Datos de la figura 17.	66
Fig. 18 Curva de crecimiento a la concentración óptima de NaCl para la cepa aislada del QC, la cual es al 2.5% y a las 48 horas.	67
Fig. 19 Curva de crecimiento a diferentes Temperaturas para determinar la Temperatura óptima para la cepa aislada de QDC con 4% NaCl.....	67
Fig. 20 Curva de crecimiento que como se observa el tiempo de desarrollo óptimo es a las 48 horas.....	68
Fig. 21 Curva de crecimiento promedio de las absorbancias de la fig. 20 en relación al tiempo de desarrollo óptimo el cual es a las 48 horas (círculo color vino).....	68
Fig. 22 Curva de crecimiento en relación al tiempo de desarrollo óptimo para el QC el cual es a las 48 horas.	69
Fig. 23 Curva de crecimiento en relación al tiempo de desarrollo óptimo (círculo color vino) para la cepa aislada de QC el cual es a las 48 horas (promedio de la grafica fig. 21).	69
Datos de las figuras 22 y 23.....	70
Cuadro 1. Pruebas bioquímicas.....	70

Cuadro 2. Características bioquímicas y fisiológicas de las bacterias aisladas de los quesos europeos reportados en la literatura.	71
Cuadro 3. Características bioquímicas y fisiológicas de las cepas aisladas.....	71
Cuadro 4. Resultados de la prueba de fermentación de carbohidratos.	72



I. INTRODUCCION

El queso es un alimento extraordinario, porque tiene un valor nutricional muy completo; es rico en proteínas, calcio y vitaminas A y D. Actualmente, existen más de 50 razas de animales que producen leche para elaborar queso como son: vacas, búfalas, ovejas, cabras, llamas, entre otras razas que aportan sus cualidades hasta obtener una gran variedad de sabores, olores y colores en los quesos, esto sin importar el método tradicional y/o artesanal para prepararse, la fabricación en ranchos, cooperativas o de forma industrial; hay quesos que solamente se producen en su país de origen.

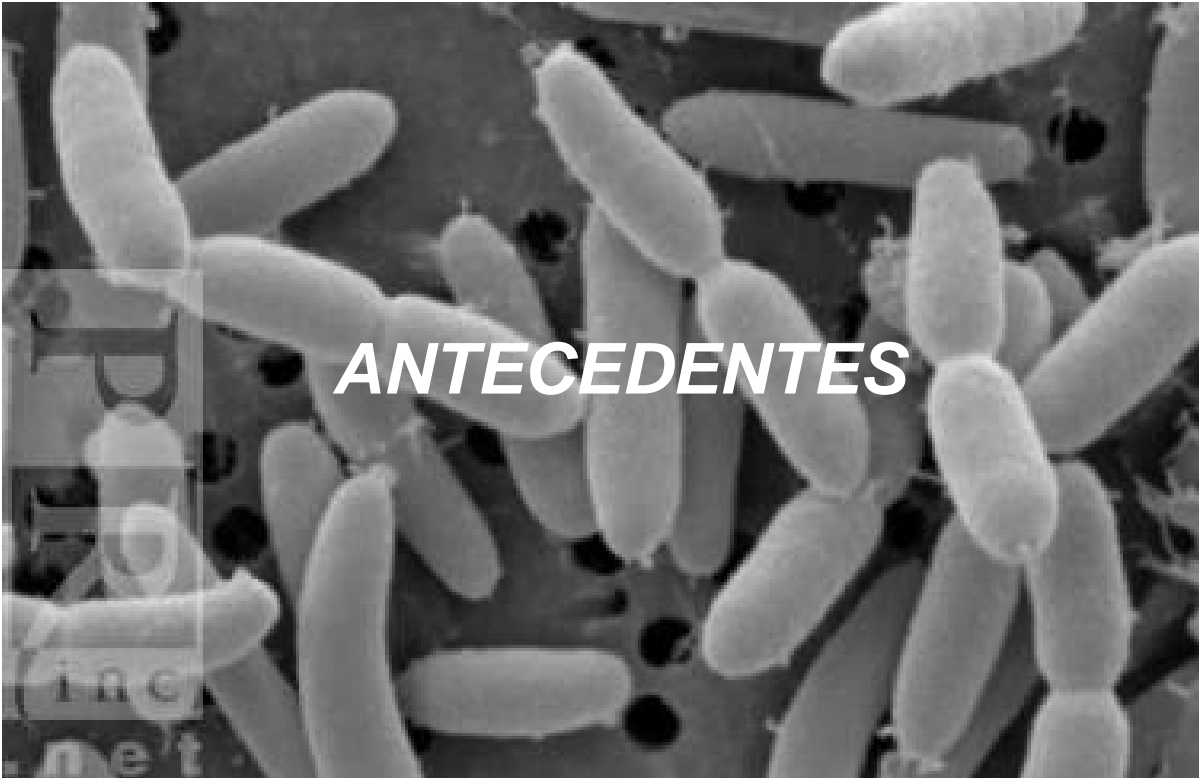
Uno de los principales contribuyentes a la maduración de los quesos son las “bacterias ácido lácticas” (LAB). Sin embargo, los medios alcalinos y salinos para la cuantificación o aislamiento de las LAB, no han sido aplicados previamente al análisis de la microbiota en los quesos. Actualmente se sabe que el origen de estas comunidades LAB está tanto en intestinos de humanos como de animales, en productos lácteos, alimentos vegetales fermentados y de agua de mar (llamadas bacterias lácticas marinas).

El descubrimiento relativamente reciente de las llamadas bacterias lácticas marinas y su aislamiento a partir de agua de mar y de la corteza de algunos quesos madurados europeos ha dado lugar a una serie de investigaciones en Europa y Japón para tratar de averiguar el posible papel de estos microorganismos en la maduración de esos quesos. Los géneros principales identificados son: *Marinilactibacillus* y *Halolactibacillus* y tienen las características de ser halófilicos.

Durante la producción de quesos, se les adiciona alrededor de 5% (w/w) de NaCl y el pH se incrementa de alrededor de 5.0 hasta arriba de 7.5. Sin embargo, los medios alcalinos y salinos para la cuantificación o aislamiento de las LAB, no han sido aplicados previamente al análisis de la microbiota en los quesos. Se piensa que la fuente de estos microorganismos puede ser la sal de origen marino que se utiliza en la fabricación de estos quesos (Ishikawa *et al.*, 2006).

En México existen varios quesos con bastante sal y relativamente bajo contenido de humedad (Queso tipo cotija, doble crema de Pijijiapan Chiapas, etc.) que pudieran contener este tipo de bacterias. Las bacterias ácido-lácticas (LAB) juegan un papel importante en los procesos de fermentación láctea y cárnica, y tienen una gran influencia en la calidad y preservación de los productos finales. Los papeles primarios de las LAB son la producción de ácido láctico a partir de carbohidratos, dando como resultado un decremento de pH y la proteólisis para liberar péptidos cortos y aminoácidos libres. Estos compuestos afectan el sabor y textura de los productos. Por lo tanto, el conocimiento de los sistemas proteolíticos y de transporte globales de estas bacterias ha sido el principal sujeto de investigación en las dos décadas pasadas (Piuri *et al.*, 2003).

El objetivo de este estudio es la cuantificación y aislamiento de las bacterias lácticas usando medios salinos, con la intención de confirmar la presencia de bacterias ácido lácticas halofílicas (nombradas HALAB, quizá de origen marino) en queso doble crema y queso tipo cotija, así como para conocer su papel en la maduración de los quesos; además de su caracterización fisiológica (capacidad de acidificación, proteólisis, lipólisis, etc.).



II. ANTECEDENTES

II.1. Generalidades de la leche.

La leche fue uno de los primeros alimentos pecuarios utilizados por el hombre e incluso, uno de los primeros alimentos sometidos a procesos fermentativos debido a la facilidad con que sufre transformaciones microbianas que la acidifican; de esta manera el hombre de la antigüedad aprendió el arte de elaborar leches fermentadas y muy probablemente a partir de éstas, los primeros quesos (García *et al.*, 1993, Alais, 1998).

II.2. Fabricación de quesos.

Según la NOM-121-SSA1-1994, los quesos son productos elaborados con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, bacterias lácticas, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes (citratos y fosfatos que ayudan a disolver las proteínas y emulsificar las grasa para suavizar los quesos) e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser fresco, madurado o procesado.

Dentro del proceso de fabricación de los quesos se lleva a cabo el salado, cuyos objetivos son: completar el desuerado del queso, favoreciendo el drenaje de la fase acuosa libre de la cuajada; modificar la hidratación de las proteínas; intervenir en la formación de la corteza; actuar sobre el desarrollo de los microorganismos y la actividad enzimática, dar sabor salado para enmascarar el que aportan otras sustancias a lo largo de la maduración del queso (Chamorro & Losada, 2002).

II.3. Maduración de los quesos.

Los quesos frescos ya estarían listos para consumir llegados a este punto, sin embargo, a la mayoría de los quesos les queda un largo periodo de añejamiento y curado hasta estar completamente listos. Durante el añejamiento, nuevos microorganismos se introducen en el queso, intensificando su sabor. Lentamente la caseína y la grasa se convierten en una compleja red interna de aminoácidos, aminos y ácidos grasos (<http://www.es.wikipedia.org>).

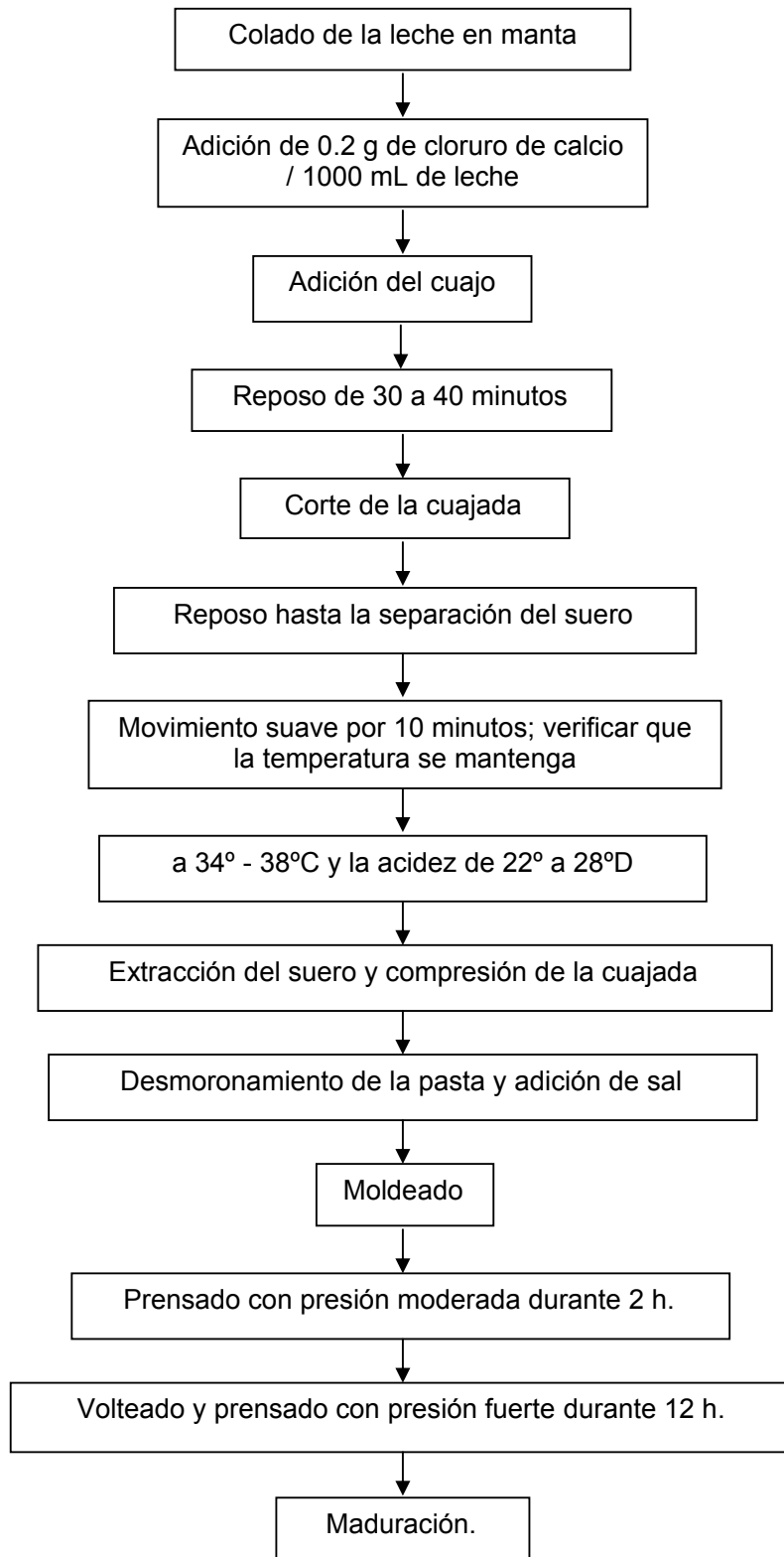
En México son pocos los quesos originarios madurados debido a la falta de higiene con la que se elaboran y a la temperatura ambiental. Por estas razones los quesos se pudren antes de un buen madurado, no obstante se tienen algunos quesos de maduración rápida, como el Doble Crema de Chiapas, el Sopero de Tabasco y el Sierra del Centro del país y de maduración tardía como el Balancam, el Añejo, el Cotija (Michoacán y Jalisco) y tipo cotija, el de Chincho, el Huasteco y el Bola de Chiapas (Villegas, 1993).

La humedad es uno de los factores más importantes en la conservación de quesos. Un queso húmedo permitirá un rápido crecimiento de las bacterias que contenga, en unos cuantos días la acidez habrá llegado a su máximo, cambiando las características de la cuajada. Este es el caso de los quesos tipo cotija y doble crema, que cuando se dejan acidificar a su máximo, toman un olor ácido nauseabundo (no putrefacto) por la gran acidez de los lactobacilos, posteriormente baja la acidez y aumenta el aroma, adquiriendo un penetrante olor, característico de estos productos (Villegas, 1993).

II.3.1. Queso Tipo Cotija.

Este queso es una variante del queso Ranchero y del Adobero, siendo un queso de presentación cilíndrica de 11 a 40kg, seco, salado, con sabor penetrante, de

consistencia firme y desmoronable. Se elabora principalmente en Guerrero, Michoacán y Morelos. Para su elaboración se emplea leche de vaca, entera o semidescremada, fresca o ácida. El cultivo láctico que se emplea debe ser muy ácido (Villegas, 1993). El proceso para su fabricación es el siguiente:



II.3.2 Queso Doble Crema.

Este producto, también conocido como queso de Chiapas, pertenece al grupo de quesos de pasta blanda, fresca y prensada. Se elabora con leche de vaca (por lo general procedente de ganado de doble propósito, cebú-pardo suizo), cruda o bronca, entera o parcialmente descremada.

En el mercado se presenta en piezas de formato pequeño, prismático-rectangulares y cilíndrico-planas; su peso oscila entre unos 250g y 1000g (Cervantes, *et al.*, 2006).

La pasta del queso crema tropical está altamente desmineralizada debido a un prolongado cuajado ácido-enzimático, que ocurre en varias horas a temperatura ambiente. El producto final, muestra una pasta blanquizca o ligeramente amarilla (según el contenido de la grasa), una consistencia blanda o friable, pero fácilmente tajable. Su sabor ácido y salado es agradable. Algunos de los pasos más notables en el proceso de fabricación de este queso son los siguientes (Cervantes, *et al.*, 2006):

- Maduración de la leche. La leche bronca, fresca, se deja reposar durante 3 a 5 horas a fin de que la microbiota natural se multiplique; también para descremar, parcialmente por flotación.
- Reposo de la cuajada o “dormido”. Después de adicionar el cuajo, se deja cuajar la leche en quietud, durante varias horas (hasta 20) a temperatura ambiente tropical. El propósito es producir una cuajada ácida, altamente desmineralizada.
- Cortado o “quebrado”. Después de que la leche ha cuajado, al día siguiente de la adición del cuajo, y cuando sobrenada una delgada capa de suero, se procede a cortar la cuajada con cuchillo o con una pala delgada de madera. Esta operación

facilita la extracción del suero por exudación. El corte es amplio (mayor de 2 cm.), y a veces tosco, empleándose las manos, por ello se habla de “quebrado” de la cuajada.

- Manteado o “bolseado”. La cuajada previamente cortada se coloca, con delicadeza, en una bolsa de algodón o plástico.
- Amasado y salado. La cuajada “seca” se coloca en una artesa de madera y se amasa manualmente incorporándole, al mismo tiempo, sal fina (10 – 15g/kg).
- Moldeado. Se efectúa en moldes prismático-rectangulares de madera, en ellos se colocan adecuadamente unos paños de tela y se introduce poco a poco la cuajada, presionándola manualmente.
- Prensado. Se lleva a cabo en prensas rústicas de tornillo, construidas con madera resistente.
- Acondicionamiento. Después del desaprensado, el desbordeado y el oreado, las piezas de queso son envueltas en papel encerado, estaño y celofán transparente (rojo o amarillo).

- ***II.4. Las bacterias lácticas.***

Las bacterias de las fermentaciones alimentarias son bacterias Gram (+). Normalmente se considera como un grupo a las bacterias lácticas (LAB), que se caracterizan por una gran producción de ácido láctico.

Tienen forma de bacilos o cocos y son catalasa (-). Sintetizan su ATP en la fermentación láctica de los carbohidratos.

El ácido láctico es en algunos casos el único producto final (homofermentación) y en otras ocasiones se producen además etanol, acetato y CO₂ (heterofermentación) (Bourgeois & Larpent, 1995).

Metabolismo de la lactosa en las bacterias lácticas homofermentativas

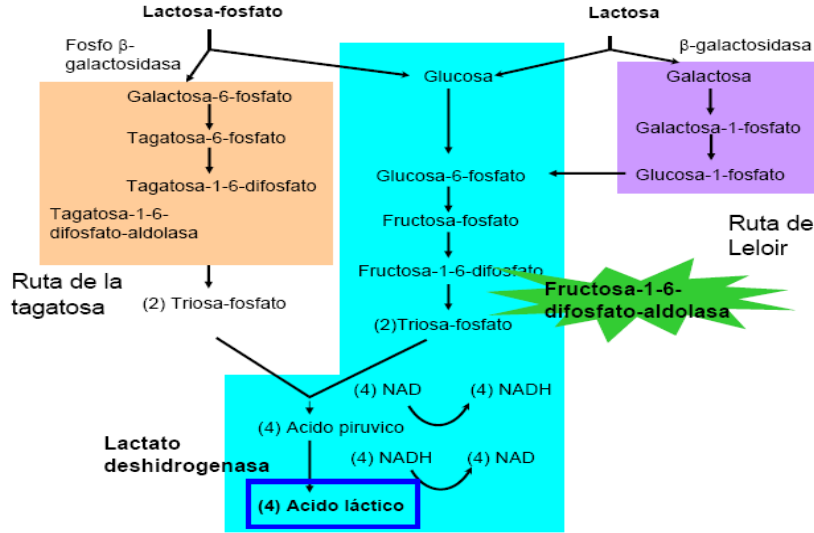


Fig. 1 Ruta metabólica de la lactosa en bacterias lácticas homofermentativas (www.biologia.edu.ar).

Metabolismo de la lactosa en las bacterias lácticas heterofermentativas

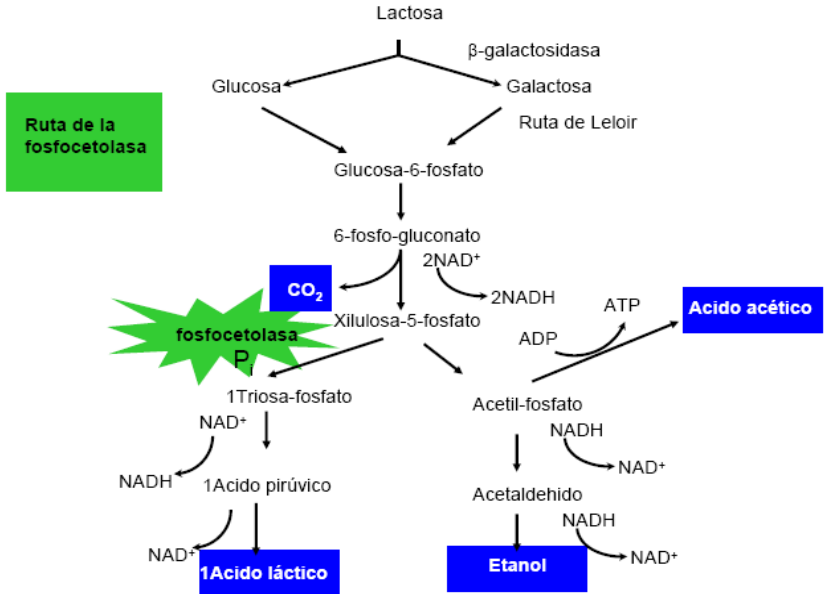


Fig. 2 Ruta metabólica de la lactosa en bacterias lácticas heterofermentativas (www.biologia.edu.ar).

II.4.1. Papel de las LAB en la fabricación de quesos.

Las bacterias ácido lácticas (LAB) modifican la composición química de la leche, mejorando la conservabilidad del producto y sintetizando moléculas aromatizantes que aportan cualidades sensoriales apreciadas o, en algunos casos, rechazadas por parte de la población.

La lipólisis que llevan a cabo es relativamente limitada, (a excepción del queso tipo cotija que no es limitada) pero la pequeña cantidad de componentes que en ella se producen tienen una gran influencia sobre el gusto y aroma. La degradación de las proteínas de la cuajada constituye el principal fenómeno de la maduración. Es el origen del ablandamiento de la pasta, de su cambio de opacidad y color y por los productos formados, participa en el desarrollo del sabor y del aroma. Muchas LAB poseen enzimas proteolíticas intracelulares o ligadas a sus paredes.

Entre estas microbiotas se producen fenómenos de antagonismo: algunos lactobacilos inhiben el desarrollo de *Clostridium tyrobutyricum*, *Lactococcus lactis* sintetiza nisina que inhibe los *Clostridium* y algunas bacterias Gram (+). La acidificación y liberación de peróxidos bloquean el crecimiento de microorganismos Gram (-), eventualmente productores de putrefacción (Bourgeois & Larpent, 1995).

II.5. Cultivos iniciadores.

Hasta 1880 la mayor parte de los queseros confiaban para la producción de ácido en el agriado natural de la leche. Algunos utilizaban para ello suero ácido, mientras que otros empleaban leche agriada espontáneamente procedente de su vaca sana favorita.

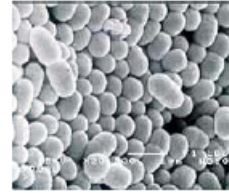
En la actualidad los cultivos iniciadores, se obtienen de muy diversos orígenes (bancos de cepas mantenidos por centros de investigación, organizaciones lecheras, laboratorios comerciales o instituciones de enseñanza). En quesería, un cultivo iniciador es una mezcla de uno o más microorganismos cuyo crecimiento en la leche o cuajada produce la maduración del queso con su actividad metabólica. La mayoría de los cultivos iniciadores en quesería son cultivos controlados de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *cremoris* (Scott, 1991).

CULTIVOS INICIADORES

Bacterias ácido-lácticas homofermentativas

Mesófilas (25-30°C)

Lactococcus lactis subesp. *lactis* →
Lactococcus lactis subesp. *cremoris*



Termofilas (37°-42°C)

Streptococcus thermophilus →
Lactobacillus delbrueckii subesp. *bulgaricus*
Lactobacillus helveticus

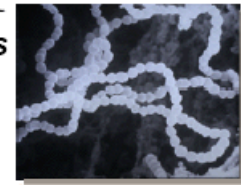
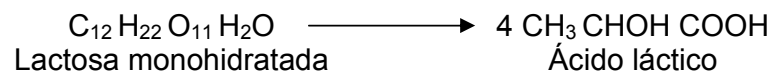


Fig. 3 Cultivos iniciadores de bacterias ácido-lácticas homofermentativas (www.biologia.edu.ar).

El desarrollo de las bacterias lácticas en la leche transforma la lactosa en ácido láctico, principalmente. Esta nueva acidez se llama acidez desarrollada y origina la desestabilización de las proteínas. Dependiendo de la utilización que se le vaya a dar a la leche, este tipo de acidez se puede desarrollar de forma voluntaria. El ácido láctico reduce el pH del medio facilitando toda la serie de reacciones que tienen lugar durante la elaboración del queso. La transformación de la leche por fermentación es una de las actividades biotecnológicas más antiguas. Se basa en la formación de ácido láctico por la reacción fundamental en la producción de lácteos fermentados (Amiot, 1991):



Las enzimas de los cultivos iniciadores bacterianos, vivos o muertos, provocan la degradación de los diversos componentes de la leche, permitiendo la producción de precursores de toda una serie de sustancias que son las responsables de la

textura, el sabor y el aroma del queso. Cuando los lactococos del cultivo iniciador mueren, libera a la cuajada diversas enzimas (Scott, 1991).

II.5.1. Funciones esenciales de los cultivos iniciadores.

En la industria láctea, las funciones esenciales de los cultivos lácticos iniciadores, se sintetizan como sigue:

- Para la producción de ácido láctico. Como resultado de la fermentación de la lactosa, al ácido láctico imparte un sabor distintivo y fresco (ácido), durante la manufactura de leches fermentadas. En la elaboración de queso, el ácido láctico es importante durante la coagulación y texturización de la cuajada.

- Para la producción de compuestos volátiles (v.g. diacetilo y acetaldehído), los cuales contribuyen al sabor y aroma de estos productos lácteos.

- Los cultivos lácticos pueden poseer una actividad proteolítica o lipolítica, la cual puede ser deseable, especialmente durante la maduración de algunos tipos de queso.

- Pueden ser producidos otros compuestos, por ejemplo alcohol, el cual es esencial durante la manufactura de kefir y kumis.

- La condición ácida de estos productos lácteos previene el crecimiento de patógenos y también de microorganismos alteradores (Cheesman, 1984).

II. 5.2.- Bacterias ácido lácticas no iniciadoras (NSLAB).

Muchas veces los campesinos fabrican quesos sin utilizar cultivos iniciadores, la fabricación del producto se realiza con las LAB que están presentes de manera natural en la leche; estos quesos son generalmente denominados artesanales (Cogan *et al.*, 1997). Los quesos fabricados a partir de leche sin pasteurizar y siguiendo los

procedimientos tradicionales de manufactura pueden contener una diversa y rica microbiota; la calidad de los quesos depende de la composición de la microbiota. Cuando los quesos son producidos siguiendo procesos tradicionales a partir de leche cruda, la microbiota juega un papel fundamental en la fermentación y es uno de los parámetros que más afecta la calidad del queso. Además, la biodiversidad de las bacterias involucradas en el queso puede considerarse el factor fundamental para la conservación de las características típicas de los productos de quesería tradicionales (Demarigny *et al.*, 1997).

Las NSLAB usualmente se incrementan desde un bajo número en la cuajada fresca hasta dominar la microbiota de los quesos maduros. Contrario a los iniciadores, las NSLAB toleran los ambientes hostiles del queso durante su maduración (32-39% de humedad, 4-6% de sal, pH de 4.9-5.3 a 13°C y una deficiencia de nutrimentos). El papel de las NSLAB en la maduración aun no ha sido resuelto satisfactoriamente, aunque la inclusión de cultivos adjuntos de algunas cepas de NSLAB o el uso de leche cruda durante la fabricación de quesos, incrementa el nivel de aminoácidos libres, péptidos y ácidos grasos libres, lo cual conduce a mejorar la intensidad de sabores y aromas y acelera la maduración de los quesos (Fitzsimons, *et al.*, 1999; De Angelis, *et al.*, 2001).

Aunque las NSLAB pueden ser aisladas a partir del queso, la mayoría de ellas son inactivadas por la pasteurización; su presencia en quesos fabricados con leche pasteurizada se puede deber a contaminación después de la pasteurización por la flora presente en el aire, en el equipo utilizado, en los ingredientes, o a variedades que sobreviven a la pasteurización (Martley & Crow, 1993).

II.5.3. Papel de los metabolitos de las bacterias lácticas en tecnología quesera.

Los productos resultantes del metabolismo de las bacterias lácticas, ejercen una serie de efectos sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas, sensoriales y de textura de los diversos tipos de queso.

II.5.3.1. Ácido láctico.

La producción de ácido láctico que realizan las bacterias del cultivo, acelera la coagulación de la leche por el cuajo, ya que el pH óptimo de actividad de las enzimas coagulantes es inferior al pH inicial de la leche (6.5). Por otra parte, el ácido láctico ocasiona una desmineralización del coágulo con pérdida de Ca^{2+} en el suero en forma de lactato de calcio soluble, lo que modifica notablemente las características del coágulo (Núñez, 1985). La producción de ácido láctico lleva aparejado un descenso del pH a niveles próximos a 5.0, lo que regula la velocidad de las reacciones de degradación de proteína y grasa que tienen lugar a lo largo de la maduración.

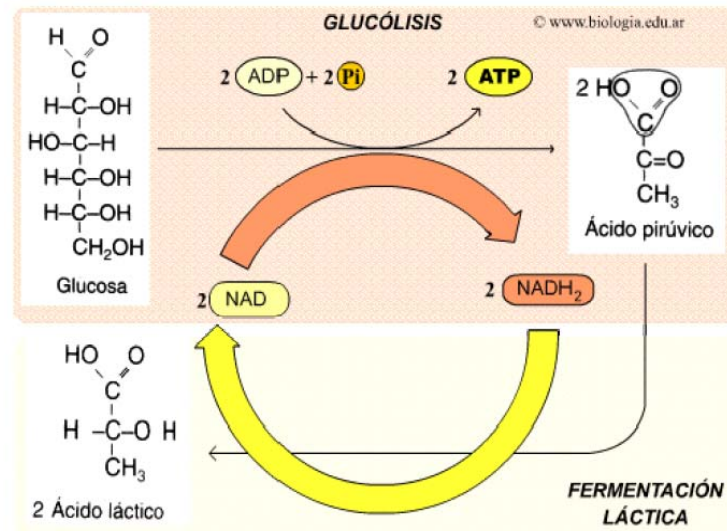


Fig. 4 Ruta metabólica para la producción de ácido láctico (www.biologia.edu.ar).

Además, el ácido láctico ejerce una fuerte acción antimicrobiana frente a la mayoría de los microorganismos patógenos que pueden contaminar accidentalmente al queso, tales como *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, etc. La combinación de concentración de ácido láctico y bajo nivel de pH es el principal agente responsable de la desaparición de los patógenos a lo largo de la maduración del queso (Núñez, 1985).

II.5.3.2. Péptidos, aminoácidos y productos derivados.

En la mayoría de los quesos, a partir de la segunda semana de maduración comienzan a descender los niveles de bacterias lácticas procedentes del cultivo. A su muerte estas bacterias se lisan, liberando al exterior las enzimas intracelulares localizadas en membrana y citoplasma, entre las que tienen especial importancia, las implicadas en la degradación de caseína. Estas enzimas, en combinación con las enzimas coagulantes, prosiguen la formación de péptidos cortos y aminoácidos libres. Estos péptidos cortos y aminoácidos forman parte del “sabor de fondo”, sobre el que resaltan en cada queso los compuestos característicos de su aroma (Núñez, 1985).

Una proteólisis demasiado fuerte, resultante de la acción de los fermentos o de los microorganismos contaminantes confiere al queso un gusto amargo. En el caso de los quesos tipo suizo, *Streptococcus thermophilus* elimina del medio los productos amargos originados en la proteólisis, lo que explica que en estos quesos aparezcan muy raramente gustos amargos a pesar de que en su elaboración se utilizan cuajos microbianos (Amiot, 1991).

Por lo tanto, el conocimiento de los sistemas proteolíticos y de transporte globales de estas bacterias ha sido el principal sujeto de investigación en las dos décadas pasadas (Piuri *et al.*, 2003).

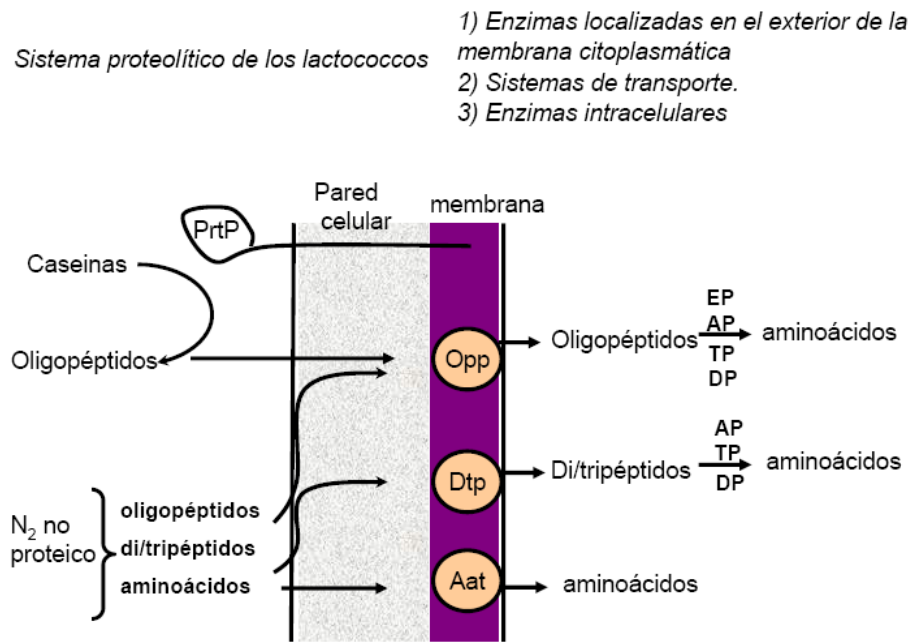


Fig.5 Ejemplo de la proteólisis esquematizado por el sistema proteolítico de los *lactococcos* (www.biologia.edu.ar).

II.5.4. Fuentes de las bacterias lácticas.

Comúnmente las fuentes conocidas para las comunidades de bacterias ácido lácticas (LAB) son los intestinos humanos y animales, productos lácteos y alimentos vegetales fermentados. En la suposición de que las fuentes para las LAB son más de las que se han estudiado hasta ahora, se han llevado a cabo aislamientos de LAB a partir de organismos marinos y se encontraron dos géneros nuevos de LAB halófilas (nombradas HALAB), y que han sido denominadas como *Marinilactibacillus* y *Halolactibacillus* (Ishikawa *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2005). Estos organismos son ligeramente halófilos, crecen preferencialmente bajo condiciones fisicoquímicas encontradas en el agua de mar (concentración total de sal: 3.2 - 3.8% (w/v)).

El agua marina contiene un 3% de NaCl, más pequeñas cantidades de muchos otros elementos y minerales por tanto los microorganismos aislados del mar, tienen normalmente requerimientos específicos para el sodio. El crecimiento de los halófilos requiere al menos algo de cloruro de sodio, pero la concentración óptima varía bastante de un microorganismo a otro; por tanto el término moderadamente halófilo

se reserva para aquellos que requieren 6-15% de NaCl y el término discretamente halófilo para los que requieren 1-6% de sal (Michael, T. 1978).

II.5.5. HALAB en quesos.

La presencia de bacterias Gram (-) típicamente marinas, tales como *Halomonas* spp. y *Vibrio* spp. en quesos madurados fue reportada por diversos autores (Maoz *et al.*, 2003; Feurer *et al.*, 2004; Bockelmann *et al.*, 2005; & Mounier *et al.*, 2005). Feurer *et al.*, (2004) aislaron la *Marinilactibacillus psychrotolerans* a partir de quesos suaves hechos de leche cruda (producidos en una granja) y leche pasteurizada (producidos industrialmente). Considerando estos descubrimientos y las características halofílicas de las bacterias HALAB, resulta improbable que éstas sean derivadas de la leche cruda. Podría ser considerado que estas HALAB hayan venido de ambientes marinos por vía de la sal de mar adicionada a los quesos y hayan encontrado ahí su origen en términos de salinidad, pH, temperatura, fuentes de carbono y los nutrientes orgánicos complejos de los quesos (Ishikawa *et al.*, 2006).

Recientemente se ha descubierto la presencia de LAB halófilas y alcalofílicas (llamadas HALAB) en diversos quesos producidos en Europa, principalmente *Marinilactibacillus psychrotolerans* y *Alkalibacterium olivapovliticus* (Ishikawa *et al.*, 2006). *Marinilactibacillus psychrotolerans* es una HALAB de hábitat marino, con un óptimo de crecimiento de 2.0 – 3.75% de NaCl y pH de 8.5 – 9.0 (Ishikawa *et al.*, 2003). *Marinilactibacillus psychrotolerans* (psy.chro.to'le.rans. Gr. adj. *psychros* cold; L. part. adj. *tolerans* tolerante; N.L. adj. *psychrotolerans* tolerante a temperaturas heladas). La especie tiene todas las características que definen a este género. Las colonias son profundas en medio de agar son amarillas claro, opacas y lenticulares con diámetros de 2-4 milímetros. Las células son 0.4-0.5 x 2.3-4.5 μm y alargadas en cultivos mayores. Crece uniformemente a través de una columna de medio agar

semisólido. El ácido se produce de una gama bastante amplia de carbohidratos, alcoholes de azúcar y compuestos relacionados de carbono.

El genero de *Marinilactibacillus* tiene las características de ser células Gram (+), no esporuladas, bacilos rectos, producción por separado, en pares o en cadenas cortas, son móviles con flagelos peritricos. Catalasa y oxidasa negativos. Reducción de nitrato y licuefacción en gelatina son negativos.

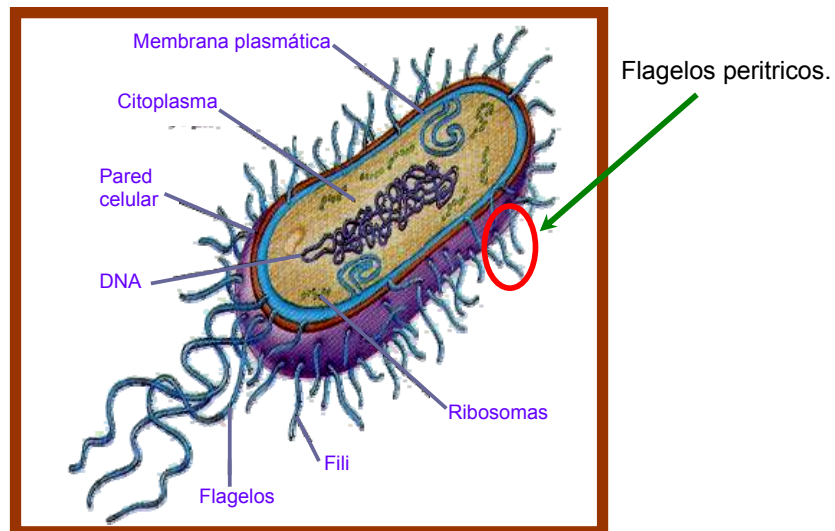


Fig.6 Imagen de una bacteria con flagelos peritricos.

Hay producción débil de amoníaco de L-arginina, es ligeramente halófilico y altamente halotolerante; la concentración óptima de NaCl para su crecimiento es de 2.0-3.75% (p/v) con un intervalo máximo de 17.0-20.5% (p/v) (dependiendo de la cepa). El crecimiento ocurre entre -1.8°C y 40-45°C con una temperatura óptima de 37-40°C.

El género *Alkalibacterium* se reportó primero como *A. olivapovliticus*, el cual fue aislado a partir de aguas alcalinas de lavado de aceituna comestible y fue halófilica y alcalofílica (Ntougias & Russell, 2001). Metaboliza carbohidratos mediante fermentación ácido láctica. Se ha reportado la presencia de *Marinilactibacillus psychrotolerans* en la corteza de quesos suaves alemanes y franceses como una flora menor (Maoz *et al.*, 2003; Feurer *et al.*, 2004) y en jamones curados deteriorados italianos, como flora dominante (Rastelli *et al.*, 2005). Considerando el

contenido de agua de los quesos suaves (generalmente entre 50-55% para quesos suaves madurados), la concentración real de NaCl en la fase acuosa de las muestras de queso, podría ser suficientemente elevado para producir condiciones osmóticas favorables para el crecimiento de las HALAB (Ishikawa *et al.*, 2006).

II.6. Aislamiento y caracterización de microorganismos.

La taxonomía tradicional de los microorganismos, basada fundamentalmente en criterios morfológicos y fisiológicos, se ha visto sometida a continuas reordenaciones y cambios. Esto se ha debido fundamentalmente a la aplicación de técnicas moleculares muy potentes al estudio taxonómico como son la hibridación DNA-DNA, la secuenciación de diferentes regiones del genoma bacteriano, etc. (Guillamón *et al.*, 2003).

II.6.1. Aislamiento y recuento.

La microbiología ha requerido el aislamiento y recuento de los microorganismos para poder llevar a cabo estudios sobre las poblaciones que se desarrollan en los diferentes procesos industriales. Para ello es necesario disponer de medios de cultivo donde crezcan los microorganismos fuera de su ambiente natural (Guillamón *et al.*, 2003).

En esta investigación se implementará una serie de medios de cultivo para el aislamiento de bacterias halófilas a partir de muestras de quesos. El medio del que se parte para esta investigación es el GYPF (Glucosa-Extracto de levadura-Peptona y Extracto de pescado el cual es sustituido por extracto de carne) al 7% de NaCl, sin embargo, la composición de este medio debe ser adaptada para el óptimo aislamiento de las bacterias lácticas halófilas presentes.

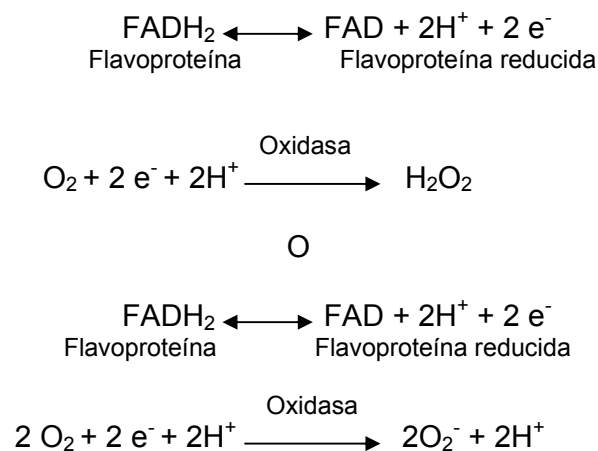
II.6.2. Características fisiológicas y bioquímicas.

Los métodos utilizados para la caracterización de las bacterias halófilas de nuestras muestras de quesos son las pruebas bioquímicas descritas a continuación: Prueba catalasa, Prueba de Oxidasa, Prueba de hidrólisis en almidón, Prueba de licuefacción de gelatina, Prueba de Voges-Proskuer (VP), Prueba de hidrólisis de caseína, Prueba de reducción de nitrato, Producción de gas a partir de glucosa, Prueba de fermentación de hidratos de carbono, Producción de amoníaco a partir de arginina, Determinación de la actividad lipolítica, Determinación de la actividad proteolítica, Prueba de Movilidad.

II.6.2.1 Prueba catalasa.

PRINCIPIO: Probar la presencia de la enzima catalasa. Esta prueba se ha usado como ayuda para la identificación de bacterias.

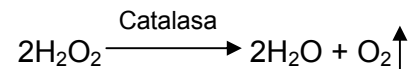
Cuando las flavoproteínas reducidas o las proteínas con azufre y hierro reducidas se unen con el oxígeno con la ayuda de las oxidasas presentes en la cadena respiratoria de todas las bacterias, se forman dos compuestos tóxicos: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical superóxido (O_2^-).



El H_2O_2 es un producto final oxidativo de la degradación aerobia de los azúcares. La flavoproteína reducida reacciona de manera directa con el oxígeno gaseoso por

vía de la reducción de electrones para formar H₂O₂, no por la acción directa entre el hidrógeno y el oxígeno molecular. Las catalasas eliminan en forma catalítica los intermediarios de la reducción del oxígeno.

La reacción química que ocurre durante la realización de la prueba de catalasa es expresada en la siguiente ecuación:



La catalasa esta presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas (aerotolerantes) que contienen citocromos. Los anaerobios obligados (estrictos) carecen de esta enzima; la mayoría de las bacterias anaerobias poseen peroxidasa en lugar de catalasa.

Las catalasas son consideradas “hidroperoxidadas”; las catalasas (peróxido de hidrógeno oxidorreductasas) están presentes en los animales y vegetales. El centro activo de la catalasa es una clase de proteínas hemo denominada citocromo, sin embargo los lactobacilos carecen de citocromos.

Los investigadores Taylor y Achanzar evaluaron la eficacia de la fuerza del peróxido de hidrógeno de 0.5 a 5% y establecieron que una gota al 3% de la concentración fue la más efectiva (Blazevic and Ederer, 1975; Mac. Faddin, 1991).

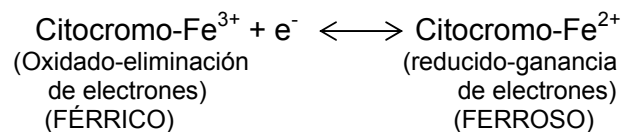
II.6.2.2 Prueba de oxidasa.

PRINCIPIO: Determinar la presencia de las enzimas oxidasas. Basándose en la producción bacteriana de una enzima oxidasa intracelular. Esta reacción de oxidasa se debe a un sistema de citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como un aceptor de electrones en la fase terminal del sistema de transferencia de electrones.

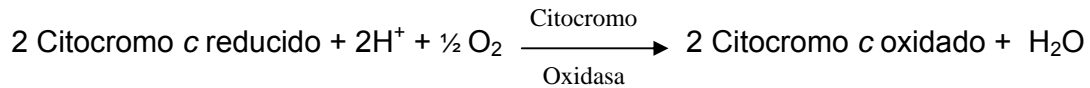
Los anaerobios obligados carecen de la actividad de oxidasa, no pueden vivir en presencia del oxígeno atmosférico y no poseen un sistema de citocromo oxidasa. Deibel y Evans mostraron que las especies de *lactobacillus* carecen de esta actividad enzimática.

El sistema citocromo oxidasa varía entre las especies bacterianas; algunos microorganismos poseen sólo una oxidasa mientras que otros pueden producir dos o tres. Los citocromos distintos de la citocromo oxidasa terminal son enzimas $b \rightarrow c_1 \rightarrow c$ responsables de un resultado positivo en la prueba de oxidasa; la producción de estas dos enzimas difiere de los diversos géneros. La citocromo oxidasa fue denominada con muchos otros nombres como son: Atmungsferment, citocromo c oxidasa, citocromo a_3 oxidasa y citocromo a oxidasa.

Los citocromos son pigmentos respiratorios que contienen compuestos ferroporfirina. El citocromo aa_3 contiene dos moléculas de hemo A y cada una contiene un átomo de Fe (hierro), que varía en sus valencias entre Fe^{3+} (férrico) y Fe^{2+} (ferroso) durante la oxidación y la reducción, y los átomos de Cu^{2+} (cobre) asociados con la actividad de citocromo oxidasa y la reacción de electrones con el oxígeno molecular.



Los electrones provenientes del citocromo c son captados por la citocromo oxidasa oxidada, que los transfiere a una molécula de oxígeno. El oxígeno libre es necesario para la regeneración indirecta del citocromo c oxidado. La prueba en realidad determina la presencia del citocromo c y los resultados son positivos sólo en las bacterias que contienen citocromo c como una enzima respiratoria.



Un resultado positivo de oxidasa consiste en una serie de reacciones, con un componente autooxidable del sistema citocromo como catalizador final. Los sustratos artificiales pueden ser sustituidos por los aceptores naturales de electrones en cualquier parte dentro de la cadena de transporte de electrones donde ellos reducen el sistema citocromo c-citocromo oxidasa. Los diversos colorantes reactivos de la prueba de oxidasa son aceptores artificiales de electrones; el reactivo *p*-fenilendiamina y el indofenol son tanto aceptores como dadores de electrones. Estos sustratos artificiales pueden ser incoloros o coloreados, lo cual depende de su estado; la reacción de oxidasa final brinda un producto coloreado (Mac. Faddin 1991).

II.6.2.3 Prueba de hidrólisis en almidón.

PRINCIPIO: Determinar la capacidad de un microorganismo de hidrolizar el almidón por medios enzimáticos y probar la desaparición del almidón por el uso de un reactivo de yodo.

El almidón es un homopolisacárido, un producto de condensación de muchos monómeros (unidades moleculares) de un único tipo de monosacárido, α -D-glucosa, que forma un polímero de muchas unidades unidas por puentes α -glucosídicos (acetal). Los polisacáridos $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ como el almidón y las dextrinas por definición se producen por la unión de más de seis moléculas de monosacáridos.

La estructura básica del almidón es una mezcla de dos moléculas de polisacárido poliglucosa: amilosa lineal (10-20%) y amilopectina ramificada (80-90%), por lo común en una relación 1:4 a 1:5. El almidón que sólo da glucosa con la hidrólisis se denomina *glucosán*.

El almidón es una clase de hidrato de carbono de alto peso molecular con una solubilidad baja en su estado nativo, sólo levemente soluble en agua e insoluble en etanol acuoso y por lo general en disolventes orgánicos.

Los residuos de glucosa (dextrosa) del almidón, α -amilosa y amilopectina, son todas moléculas de α -D-glucosa (glucopiranosas). La glucosa ($C_6H_{12}O_6$) es un monosacárido de 6 carbonos, una hexosa.

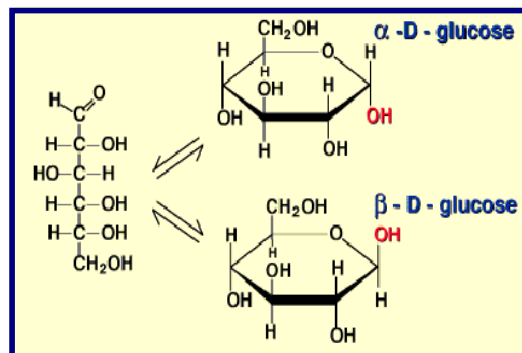


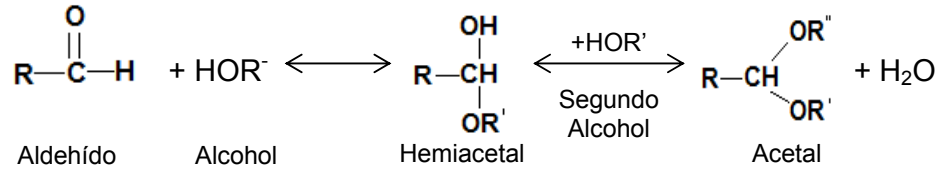
Fig.7 Molécula de Glucosa.

La diferencia estructural entre α -glucosa y β -glucosa es la posición (proyección) de los grupos OH en el carbono número 1: α , hacia abajo y β hacia arriba. La forma habitual encontrada en el almidón es α . En este caso la diferencia con la celulosa es la digestibilidad. La celulosa está compuesta de unidades de β -glucosa indigeribles; el almidón está formado por unidades α -digeribles.

La glucosa que aparece de manera natural es D-isómero; sin embargo, existen dos isómeros ópticos, D y L. Las dos formas son imágenes especulares pero no son idénticas; son asimétricas y no pueden superponerse. La forma D se presenta de manera natural; la forma L es artificial.

La forma aldehído es inestable y existe sólo como un intermediario transitorio en las reacciones de hidratos de carbono. Los aldehídos reaccionan con un grupo alcohol para formar un compuesto hemiacetal inestable que no involucra una pérdida de agua, o con dos grupos alcohol (p. ej., residuos de glucosa) con pérdida de agua por

la formación de acetal. La glucosa posee una ligadura hemiacetal a la cual se une una ligadura éter (-C-O-C-) y un grupo -OH; el OH en el hemiacetal es activado por una ligadura éter unida en el mismo sitio.



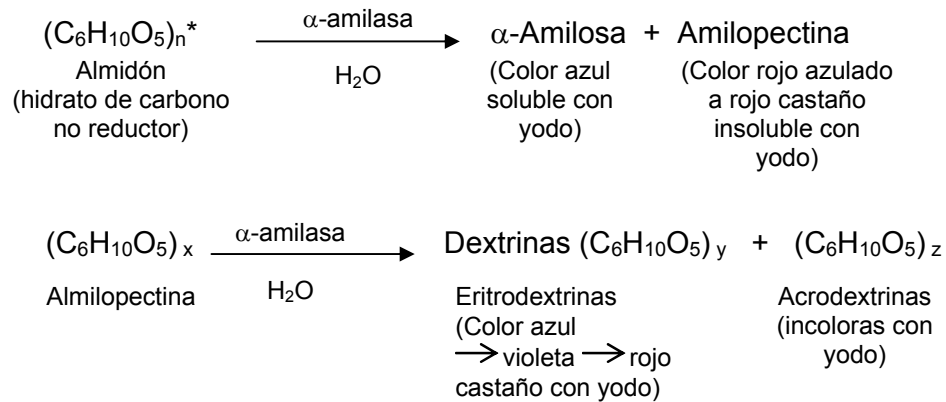
R' y R'' en el almidón son idénticos; residuos de α , D-glucosa.

En el almidón, los puentes de oxígeno acetal (-C-O-R) que unen las unidades de glucosa son hidrolizados con facilidad, en especial en presencia de ácidos y ciertas enzimas, por ejemplo amilasas. La hidrolasa, la enzima específica para la hidrólisis del almidón, fue denominada en un principio como *diastasa* y en la actualidad se denomina amilasa. Existen dos tipos de amilasas: α -amilasa o endoamilasa, excretada por muchas bacterias, y β -amilasa o exoamilasa, presente en los vegetales superiores. El pH óptimo para la actividad de la α -amilasa es de 6.9-7.2, pero varía de 5.5 a 6.5 con diferentes sustratos y es inestable por debajo del pH 4.5. Su temperatura óptima es de 50-55°C, pero la reacción parece satisfactoria a 37°C.

La hidrólisis enzimática ocurre en las uniones α -1,4-acetal y α -1,6-acetal que mantienen junto el polímero de almidón. La α -amilasa cataliza la hidrólisis de las uniones α -1,4-glucosídicas (acetal) de polisacáridos como el almidón. Ataca el interior de las cadenas de polisacárido, ya sea amilosa o amilopectina, en puntos al azar para formar una mezcla de fragmentos de 5 a 9 unidades de la configuración α . La amilosa es degradada por completo por la amilasa. La hidrólisis completa del almidón requiere otra enzima, que actúa en los puntos de ramificación 1,6 en la molécula de amilopectina, como la oligo-1,6-glucosidasa.

La amilasa convierte el almidón en productos distintos en las entidades que poseen hemiacetal (dextrina, maltosa, glucosa).

El almidón también puede ser hidrolizado por hidrólisis ácida, con la formación de los mismos productos intermedios y de glucosa como producto final; éste es un ejemplo de la acción catalítica del ion hidrógeno. La hidrólisis completa del almidón soluble forma residuos únicos de glucosa en un proceso de pasos secuenciales.



*La molécula se torna cada vez más pequeña a medida que progresa la hidrólisis; n es un número más grande que x, x es mayor que y e y mayor que z.

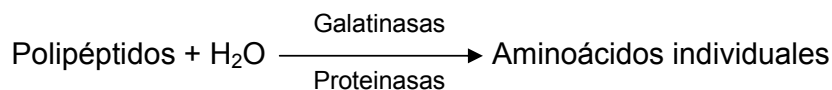
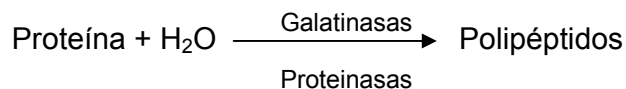
A medida que la hidrólisis progresa, el color del yodo ya no se produce más debido a la formación de acrodextrinas que son incoloras. Las moléculas terminales de maltosa son hidrolizadas de manera sucesiva con la degradación gradual, más o menos completa, de los intermedios dextrinas a maltosa y a una cantidad más pequeña de glucosa. Los monosacáridos como la glucosa no pueden convertirse en hidratos de carbono más simples por la hidrólisis.

Algunos azúcares reductores y sustancias fermentables son producidos a través de la reacción; sin embargo, el principal mecanismo de la reacción es la ruptura de polisacáridos primero a dextrinas, seguida por una fase más lenta de formación de maltosa (Mac. Faddin 1991).

II.6.2.4 Prueba de licuefacción de gelatina.

PRINCIPIO: Determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licúan/hidrolizan la gelatina o muestran cambios característicos debido a los productos de degradación.

La gelatina, es una proteína derivada del colágeno animal, se incorpora a diferentes medios de cultivo para determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas proteolíticas (proteinasas), detectadas por digestión o licuefacción de la gelatina. Las enzimas capaces de producir gelatinolisis se denominan gelatinasas. Estas enzimas proteolíticas a menudo son importantes factores de virulencia de algunos microorganismos. Las proteínas naturales son demasiado grandes para entrar en una célula bacteriana; por ende, para que una célula pueda usar las proteínas, éstas primero deben ser catabolizadas a componentes más pequeños. Ciertas bacterias segregan gelatinasas exocelulares para degradar las proteínas y esta capacidad ayuda a la identificación bacteriana. El catabolismo de las proteínas por parte de las gelatinasas es un proceso de dos pasos; el resultado final es una mezcla de aminoácidos aislados.



La gelatina es hidrolizada por la gelatinasa en sus aminoácidos constitutivos, con pérdida de sus características gelificantes (Mac. Faddin 1991).

Básicamente hay cinco medios/métodos para detectar la degradación de la gelatina por microorganismos:

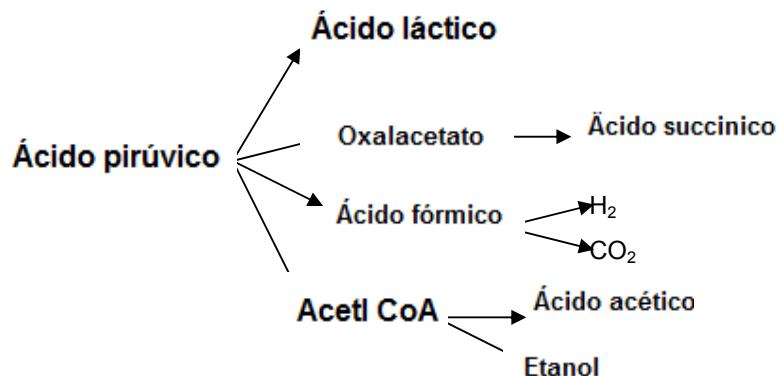
- ❖ Medio basal líquido: licuefacción.
- ❖ Medio sólido nutritivo: hidrólisis.

- ❖ Tiras de carbón-gelatina: hidrólisis.
- ❖ Película radiográfica: degradación de la gelatina.
- ❖ Agar gelatina: alcalinización.

II.6.2.5 Prueba de Voges-Proskauer (VP-MR).

PRINCIPIO: Determinar la capacidad de algunos microorganismos para producir un producto final neutro, acetilmetilcarbinol (AMC, acetoína), a partir de la fermentación de la glucosa. Voges-Proskauer (VP-MR) es un éponimo doble; Voges y Proskauer fueron los primeros bacteriólogos en observar una coloración roja en los medios de cultivo después del tratamiento con hidróxido de potasio.

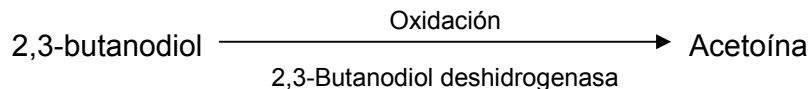
La prueba de Voges-Proskauer (VP-MR) se basa en la detección de acetoína, un producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa. La glucosa es metabolizada a ácido pirúvico, el principal intermediario en la glucólisis. A partir del ácido pirúvico, las bacterias pueden seguir muchos caminos metabólicos; la producción de acetoína es una de las vías metabólicas de la degradación de la glucosa en las bacterias. Los miembros de la familia Enterobacteriaceae se clasifican de manera característica como fermentadores de ácidos mixtos o del ácido fórmico lo que indica que los productos finales de la fermentación de la glucosa son ácidos: como el fórmico, acético, succínico, además de etanol, hidrógeno y dióxido de carbono.



Los fermentadores de ácidos mixtos con posterioridad pueden ser divididos en dos grupos: a) los que producen ácidos pero no 2,3-butanodiol (o 2,3-butileno glicol), y b) los que producen 2,3-butanodiol como sus principales productos finales.



La acetoína puede ser metabolizada por uno de dos medios: a) reducción a 2,3-butanodiol, el cual se acumula a menos que ocurra una reoxidación o b) raras veces por oxidación de diacetilo, el que puede ser metabolizado aún más. Stahly y Werkman encontraron que la formación de acetoína y 2,3-butanodiol es un sistema reversible de reducción u oxidación, acetoína a 2,3-butanodiol por reducción del 2,3-butanodiol oxidado a acetoína; la exposición al oxígeno atmosférico y a los álcalis revierte con lentitud la reacción (Mac. Faddin 1991).



II.6.2.6 Prueba de hidrólisis de caseína.

PRINCIPIO: Determinar la capacidad de un microorganismo para hidrolizar la caseína (<http://www.es.wikipedia.org>).

Para ello los microorganismos se desarrollan en un medio que contiene caseína y consta de dos fracciones:

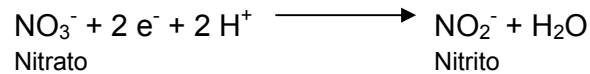
1. TSA: Agar tripton de soja, el propósito general de este medio de cultivo es para cultivo y aislamiento de microorganismos delicados y no delicados o para almacenamiento de cultivo. Usado para el precultivo y enumeración de microorganismos como *E.coli*. Este medio de cultivo es conveniente para el cultivo de microorganismos aerobios y anaerobios (<http://www.es.wikipedia.org>).

2. Leche descremada: Fuente de caseína. La caseína es la principal proteína de la leche, se encuentra fundamentalmente de forma micelar en la leche. La micela consiste en un complejo estructural de múltiples submicelas o unidades de caseína que, a su vez, están compuestas de cadenas de aminoácidos. Una unidad de caseína completa está compuesta, en peso, por aproximadamente el 40% de α -caseína, 35% de β -caseína, 15% de κ -caseína y 10% de componentes minoritarios. Por tanto para que ocurra la proteólisis o degradación de las cadenas proteicas en sustancias más simples, como peptonas, péptidos y aminoácidos, se requiere de una fuente de caseína, que en este caso la contiene la leche descremada (Scott, R. 1991).

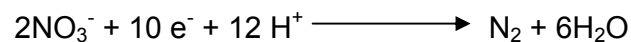
II.6.2.7 Prueba de reducción de nitrato.

PRINCIPIO: Determinar la capacidad de un microorganismo de reducir los nitratos o nitritos o gas nitrógeno libre.

La reducción de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) y a nitrógeno gaseoso (N_2) por lo común se produce en condiciones de anaerobiosis, en las cuales un microorganismo produce su oxígeno del nitrato. El oxígeno actúa como un aceptor de hidrógeno; es decir, el protón y el aceptor final de electrones. La mayoría de las bacterias aerobias son anaerobias facultativas y sólo pueden reducir los nitratos en ausencia de oxígeno. Esta respiración anaerobia es un proceso de oxidación en el que las sustancias inorgánicas (sobre todo nitrato y sulfato, rara vez carbonato) producen oxígeno para actuar como un aceptor de electrones a fin de proporcionar energía. En la reducción de nitratos, los citocromos bacterianos transportan electrones a moléculasceptoras específicas. Gunsalus y Stainer establecieron que el nitrato actúa como último oxidante en los sistemas de citocromos. La reducción de nitratos características de una especie particular es más o menos constante.

Reducción de nitratos a nitritos.

Las posibilidades del producto final en la reducción del nitrato son muchas: nitrito (NO_2^-), amoníaco (NH_3), nitrógeno molecular (N_2), óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) o hidroxilamina (R-NH-OH). El producto formado depende de la especie bacteriana. El producto final más común es el nitrógeno molecular (un gas) formado por la vía de la reducción del nitrito. De acuerdo con las condiciones ambientales, estos productos por lo común no son oxidados con posterioridad ni asimilados en el metabolismo celular, pero son excretados en el medio circundante. La reducción de nitrato a nitrógeno gaseoso (N_2) u óxido nitroso (N_2O) se denomina desnitrificación. El nitrato actúa como un aceptor de electrones; por cada molécula de nitrato reducido se aceptan cinco electrones.

**Nitrato a nitrógeno molecular.**

En el proceso de desnitrificación, puede acumularse óxido nitroso (un intermediario) si la concentración de nitrato es alta; cuando la concentración de nitrato es baja, el óxido nitroso es reducido con posterioridad a nitrógeno molecular. En la reducción de nitratos pueden ocurrir diversos procesos para la utilización de los productos finales obtenidos. El amoníaco o la hidroxilamina pueden ocurrir diversos procesos para la utilización de los productos finales obtenidos, pueden estar asimilados en los componentes celulares que contienen nitrógeno (proteínas y ácidos nucleicos) para la síntesis de nuevos compuestos. Por consiguiente, en la prueba de reducción de nitratos, la reducción se evidencia por la presencia de un producto final catabólico o por la ausencia de nitrato en el medio (Blazevic and Ederer, 1975; Mac. Faddin, 1991).

1. Si al realizar la prueba hay aparición de burbujas en el tubo no es necesario añadir nitrato si el microorganismo es no fermentador.
2. Si el microorganismo es fermentador (e.g. *Enterobacteriaceae*), el gas producido puede ser hidrógeno, de esta manera se debe añadir nitrato y la prueba ser interpretada como se describió en el número 1.

II.6.2.8 Producción de gas a partir de glucosa y pruebas de fermentación de hidratos de carbono.

PRINCIPIO: Determinar la capacidad de un microorganismo para fermentar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado en un medio basal y producir ácido o ácido con gas visible.

Los patrones de fermentación por lo general son característicos para grupos bacterianos específicos o especies, además de ayudar en la diferenciación entre géneros. Un ejemplo de un polisacárido es la inulina, que está compuesta por muchos polímeros del monosacárido de fructosa. Los alcoholes que se denominan en conjunto “azúcares” son: adonitol, dulcitol, manitol y sorbitol. Todos son alcoholes polihídricos, que son productos de la reducción de un monosacárido.



Los polisacáridos, trisacáridos y disacáridos son demasiado complejos para penetrar en una célula bacteriana para su degradación. Si pueden ser metabolizados por una especie bacteriana particular, primeros son catabolizados a monosacáridos menos complejos por enzimas exocelulares para que puedan ser incorporados al interior de la célula.

La fermentación es un proceso metabólico anaerobio de oxidación-reducción, en el cual un sustrato orgánico actúa como el aceptor final de hidrógeno (aceptor de

electrones) en lugar de oxígeno. La fermentación de sustratos orgánicos como los hidratos de carbono da por resultado productos finales reducidos y oxidados.

Algunas bacterias pueden fermentar la glucosa en anaerobiosis; otras oxidan la glucosa. Algunas pueden utilizar ambos mecanismos para su metabolismo, mientras otras no pueden utilizar la glucosa por ningún mecanismo.

La manera y la magnitud por las cuales un sustrato es catabolizado dependen de las especies bacterianas y de las condiciones de cultivo. La principal vía fermentativa de degradación de la glucosa es la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP).

Los productos finales característicos de la fermentación bacteriana son: a) ácido láctico, b) ácidos acético y fórmico, c) ácido láctico y alcohol etílico (etanol), d) etanol, e) acetilmetilcarbinol (acetoína) y CO₂, f) ácido succínico a ácido propiónico y CO₂, g) CO₂ y acetona a alcohol isopropílico (isopropanol) y h) ácido butírico a alcohol butílico (butanol). Las bacterias producen clases diversas de patrones de fermentación, de acuerdo con los productos finales formados característicos.

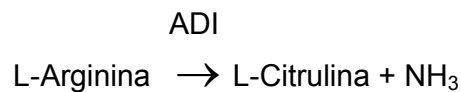
Las pruebas de fermentación de hidratos de carbono pueden utilizarse para determinar qué productos finales se han formado pero no las vías metabólicas utilizadas. Asimismo, el medio contiene otros constituyentes para el crecimiento que pueden degradarse para dar diversos productos finales similares a los producidos por la degradación de los hidratos de carbono mientras que el microorganismo está utilizando alguno de los carbonos producidos por la degradación del hidrato de carbono para producir nuevas células.

El indicador de pH utilizado con más frecuencia para demostrar la fermentación del hidrato de carbono es el rojo de fenol, ya que la mayoría de los productos finales del metabolismo de los hidratos de carbono son ácidos orgánicos. Con el rojo fenol, el cambio de color ocurre cerca del pH original del medio (pH ácido 6.8; medio pH 7.4).

La peptona en el medio también es degradada por las especies bacterianas y produce sustancias alcalinas. El ácido producido por la fermentación de un hidrato de carbono se observa por un cambio de pH sólo cuando se produce más ácido por la degradación del hidrato de carbono que sustancias alcalinas provenientes de la degradación de la peptona. La observación de un cambio de color que denota acidez está influenciada por dos factores: a) el indicador de pH utilizado y b) las propiedades buffer del medio (Mac. Faddin, 1991).

II.6.2.9 Producción de amoníaco a partir de arginina.

PRINCIPIO: Se basa en la degradación de la arginina por la vía de la Arginina Desaminasa (ADI) a través de la siguiente reacción (Liu, S.Q. and Pilonne, G.J. 1998):



II.6.2.10 Determinación de la actividad lipolítica.

PRINCIPIO: Determinar la capacidad de microorganismos para producir la enzima lipasa, que cataliza la hidrólisis de triglicéridos y diglicéridos a ácidos grasos y glicerol, evidenciada por un brillo aceitoso, iridiscente, sobre las colonias y alrededor de ellas en el medio en placa (Smeltzer, M., Hart, M. & Iandolo, J., 1992).

Lípido es un término abarcativo para describir un grupo de grasas o derivados de las grasas. Los lípidos se clasifican en tres grupos principales: a) las grasas simples (neutras), que por hidrólisis producen ésteres de ácidos grasos y alcohol; b) las grasas compuestas, que por hidrólisis dan productos diferentes de los alcoholes y ácidos grasos (p. ej., fosfolípidos y glucolípidos), y c) derivados grasos, que se obtienen por la hidrólisis de lípidos simples o compuestos. Las grasas neutras son ésteres de glicerol y de ácidos grasos de cadena larga R es una cadena carbonada de ácidos grasos (cadena lateral alquímica de ácidos grasos) esterificada al glicerol

(glicerina), un alcohol trihidratado (polihídrico). Los fosfolípidos son ésteres complejos de alcohol, ácido graso, ácido fosfórico y una base nitrogenada.

La enzima lipasa actúa sobre los ésteres emulsionados de glicéridos y/o lípidos. Los triglicéridos (triacilgliceroles) son hidrolizados a monoglicéridos (monoacilgliceroles), glicerol y una variedad de diferentes ácidos grasos saturados o no saturados. La lipasa es específica para las cadenas α y α_1 de triglicéridos.

Cuando se hidrolizan, las unidades éster (ligaduras carbonil-oxígeno) se rompen y elementos del agua se combinan con los fragmentos. Cuando las uniones éster de los glicéridos son hidrolizadas, los ácidos grasos se comportan como ácidos carboxílicos comunes y son insolubles en agua (Mac. Faddin, 1991).

II.6.2.11 Determinación de la actividad proteolítica.

PRINCIPIO: Determinar la capacidad de un microorganismo para degradar proteínas, para esta determinación se utilizó la prueba de hidrólisis de caseína y licuefacción de gelatina.



III. OBJETIVOS

III.1. Objetivo general.

Confirmar la presencia de bacterias ácido lácticas halófilas (HALAB) de origen marino en quesos mexicanos tipo cotija y doble crema, aislando y caracterizándolas parcialmente y de esta manera contribuir para entender el papel de la microbiota LAB en el proceso de maduración del queso.

III.2. Objetivos particulares.

- ❖ Aislar las bacterias halófilas presentes en los quesos tipo cotija y doble crema.
- ❖ Obtener las características fisiológicas de las bacterias halófilas.
- ❖ Determinar las características bioquímicas de las bacterias halófilas encontradas en los quesos.
- ❖ Determinar la actividad proteolítica y lipolítica de las bacterias halófilas.



IV. JUSTIFICACIÓN

Recientemente se ha descubierto la presencia de un grupo de bacterias lácticas, posiblemente de origen marino, en la corteza de algunos quesos madurados europeos, dando lugar a una serie de investigaciones en Europa y Japón para tratar de averiguar el posible papel de estos microorganismos en esos quesos.

En algunos estudios, se han usado métodos moleculares para cuantificar e identificar algunas HALAB a partir de la corteza de quesos maduros alemanes y franceses (Maoz *et al.* 2003; Feurer *et al.*, 2004). Los géneros principales identificados son: *Marinilactibacillus*, *Alkalibacterium* y *Halolactibacillus*.

Existe muy poca información acerca del análisis de la microbiota de los quesos cuando se cultivan en medios salinos, con el objetivo de cuantificar o aislar las LAB presentes en ellos.

En esta investigación se aislaron y caracterizaron fenotípicamente las bacterias lácticas halófilas (HALAB) presentes en muestras de dos quesos mexicanos: el queso doble crema y el queso tipo cotija, usando medios de cultivo salinos; así como para conocer su posible papel en la maduración de los quesos.



V. METODOLOGÍA.

V.1. Materia prima.

Se utilizó como materia prima, dos tipos de quesos que por sus características de sabor salado y maduración, se consideraban factibles de contener las bacterias ácido-lácticas halófilas de interés para la tesis, los cuales se obtuvieron de supermercados de la Ciudad de México:

- Doble crema, en estado fresco (de origen: Pijijiapan, Chiapas) y
- Tipo cotija, rallado.

V.2. Métodos de análisis.

V.2.1 Determinación de humedad.

Con el empleo de una termobalanza (marca Mettler, modelo LJ16 Moisture Analyzer), se determinó el contenido de humedad para cada queso. Se distribuyó homogéneamente una fina capa de muestra de queso sobre un plato metálico previamente tarado; de acuerdo a tablas de secado, al queso le corresponde una temperatura de 160°C, hasta peso constante.

V.2.2. Determinación de pH.

Se utilizó un potenciómetro (marca Orion, modelo 920 A) para medir en soluciones realizadas con aproximadamente 2.5g de queso en 5mL de agua destilada (ajustada a pH=7).

V.2.3. Determinación del contenido de NaCl.

Utilizando un ionómetro (Cardy Compact Ion Meter C-122, marca Horiba, Ltd), se llevó a cabo la determinación del contenido de sodio (Na^+) en cada una de las muestras de queso empleadas en la investigación.

Los cálculos llevados a cabo se realizaron de la siguiente manera:

Ejemplo:

$$31 \times 100 \rightarrow 3100\text{ppm} \rightarrow 3100\text{mg} / \text{L} \rightarrow 3100\text{mg} / \text{Kg}$$

- multiplicando por la dilución (1:10):

$$= 31000\text{mg} / \text{Kg}$$

$$= 31\text{g} / \text{Kg}$$

$$= 3.1\text{g} / 100\text{g}$$

$$= 3.1\% \text{ de Na}$$

- peso molecular del NaCl: $58.5\text{g} / \text{g}_{\text{mol}}$

$$\text{Na: } 22.9898\text{g} / \text{g}_{\text{mol}}$$

$$\text{Cl: } 35.453\text{g} / \text{g}_{\text{mol}}$$

- con regla de tres:

$$3.1\% \rightarrow 23\text{g}$$

$$x \rightarrow 58.5\text{g}$$

$$\therefore x = 7.88\% \text{ de NaCl}$$

V.3. Preparación de los medios de aislamiento de bacterias ácido-lácticas halófilas.

Por las características del hábitat marino de estos organismos se propuso el término “bacteria ácido láctica marina”. De acuerdo a su salinidad y alcalinidad se usó un medio de aislamiento con 7% de NaCl y un pH de 9.5 a 10 para excluir a las LAB comunes (CLAB), las cuales son relativamente ácido tolerantes y para su cultivo el pH óptimo va de neutro a ligeramente ácido permitiendo no competir a HALAB contra CLAB (Ishikawa et al., 2003, 2005). Estudios acerca de la flora LAB usando un medio no salino, neutral y ligeramente ácido demostró microorganismos latentes y hasta puede no estar reflejado en la microbiota actual de quesos.

El caldo de extracción que se requiere para aislar a HALAB contiene 7% NaCl, Glucosa - Extracto de levadura - Peptona - Extracto de pescado (GYPF) en cantidades determinadas (Ishikawa *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2006). Sin embargo durante el transcurso de la investigación fue modificándose de acuerdo a los ingredientes disponibles y a los resultados obtenidos de acuerdo a los requerimientos de HALAB. Así, la composición del caldo de aislamiento y los agares para la incubación en placa y tubos inclinados, se realizaron de la siguiente manera:

Caldo de aislamiento GYPF al 7% de NaCl (preparada con H₂O destilada a 1000mL; pH =7.5):

- 10g de glucosa.
- 5g de extracto de levadura.
- 5g de polipeptona.
- 5g de extracto de Bonito (pescado); este fue sustituido en la presente investigación por 5g de extracto de carne (por tanto este medio se abreviara como GYPC en vez de GYPF).
- 1g de K₂HPO₄.
- 70g de NaCl.
- 10mg de cicloheximida (inhibidor de levaduras).
- 10mg de colistina; este fue sustituido en la presente investigación por 10mg de polimixina E.
- 10mg de azida de sodio.
- 5mL de una solución de sales, que contiene (mL⁻¹):
 - 40mg de MgSO₄·7H₂O.
 - 2mg de MnSO₄·4H₂O; fue sustituido en la presente investigación por 1.5153mg de MnSO₄·H₂O.

- 2mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Agar base de aislamiento GYPC al 7% de NaCl:

Para el vaciado en placa y los tubos inclinados, se utilizó el caldo de aislamiento GYPC al 7% de NaCl más 1.5% de agar bacteriológico.

La preparación del caldo de aislamiento y del agar, se esterilizarón con autoclave a 121°C por 15 minutos.

V.4. Aislamiento de bacterias ácido-lácticas halófilas a partir de muestras de queso.

- Se pesaron 0.5g de muestra del interior de cada uno de los quesos y se colocaron en tubos.
- Se homogenizó la muestra de queso en 5mL de caldo de aislamiento GYPC 7% NaCl.
- Se incubaron las muestras durante 4 días a 30°C.
- Se vertieron en placas con agar GYPC-7%NaCl, 0.1mL de las suspensiones y fueron incubadas anaeróbicamente a 30°C por 24 horas.
- Paralelamente se sembró por estría cruzada placas con agar, a fin de aislar colonias de bacterias halófilas de cada uno de los quesos; se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias.
- Las colonias aisladas fueron resembradas en tubos inclinados con agar GYPC-7%NaCl, con el fin de fortalecer el crecimiento de las colonias; se incubaron a 30°C durante aproximadamente 4 días.
- Tomando con asa una colonia aislada, se inoculó un tubo con caldo de enriquecimiento GYPC -7%NaCl, y se incubó a 30°C durante 24 horas.

V.5. Características morfológicas y de cultivo.

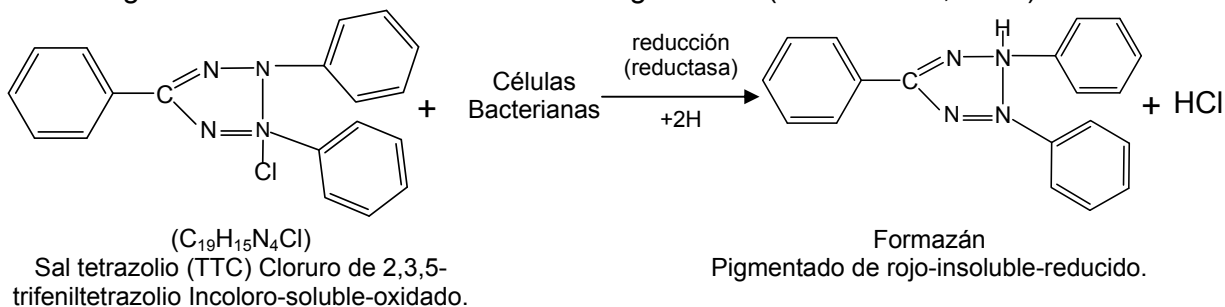
- Una vez aisladas las bacterias se inocularon en agar-GYPC-7%NaCl para observar su crecimiento y tipo de colonia característico de cada cepa.
- Se tomo una colonia y se realizaron tinciones de Gram para hacer observaciones microscópicas y determinar su morfología.

V.5.1. Prueba de Movilidad.

PRINCIPIO: Determinar si un microorganismo es móvil o inmóvil. Las bacterias son móviles por medio de flagelos. Los flagelos aparecen sobre todo entre los bacilos (bacterias con forma de bastoncillo); sin embargo, una pocas formas cocoides son móviles. Las bacterias móviles pueden contener un único flagelo o muchos flagelos y su ubicación varía según las especies bacterianas y las condiciones de cultivo. En ocasiones, las bacterias móviles producen varias inmóviles que parecen estables y en raras oportunidades revierten a las formas móviles. Los microorganismos inmóviles carecen de flagelos.

Las sales de tetrazolio son monotetrazoles que contienen dos grupos base azo (R-N=N-OH). El grupo azo (-N=N) es un cromóforo básico que imparte color al compuesto en el cual se encuentra. El tetrazolio (TTC) es una sal de una base coloreada, por lo común cloruro. El TTC posee un anillo benceno adherido a los átomos de nitrógeno, que puede actuar como un aceptor artificial de electrones para las enzimas ligadas al nucleótido piridina, es decir, succínico deshidrogenasa, citocromo oxidasa, NAD (DPN) y NADP (TPN), en la cadena biológica oxidativa. La sal es reducida por el citocromo **b** o por el **c** o puede competir por los electrones de la citocromo oxidasa. La oxidación es mediada por la reducción de deshidrogenasas específicas por el sistema de transporte de electrones.

El tetrazolio es un compuesto incoloro, soluble, que es captado por las células bacterianas y reducido en el sitio de las oxidaciones enzimáticas con la liberación del ácido formazán, un compuesto insoluble altamente pigmentado (rojo). Cuando se incorpora TTC al medio para movilidad es necesario un control no inoculado. Sin embargo este reactivo inhibe ciertos microorganismos (Mac. Faddin, 1991).



Reacción de reducción de la sal tetrazolio con células bacterianas para la formación del formazán (pigmento rojo).

V.6. Características de crecimiento en relación a [NaCl], temperaturas y tiempo óptimo de crecimiento.

- ◇ Se prepararon tubos que contenían 10mL de caldo de aislamientoGYPC, pero a diferentes concentraciones de NaCl (estas concentraciones fueron de 0% hasta 12% de NaCl), a los cuales se les inoculó con 1mL del caldo GYPC-7%NaCl incubado anteriormente, para determinar su densidad óptica a 590nm.
- ◇ De acuerdo a los resultados obtenidos en el punto anterior se determinó reducir el intervalo de concentraciones de NaCl, utilizando en este caso 0.5%, 1%, 1.5%, 2.0%, 2.5%, 3.0%, 3.5%, 4.0% y 4.5% de NaCl, determinando igualmente la densidad óptica de los tubos inoculados después de 24 y 48 horas de incubación, todo esto por triplicado.
- ◇ Una vez determinada la concentración óptima de NaCl se incubo a diferentes temperaturas (28°C, 30°C y 32°C) para obtener la temperatura adecuada para cada cepa.

-
-
- ◇ Así mismo se realizó una curva de crecimiento, de 24, 48, 72 y 96 horas, determinada por la densidad óptica a 590 nm.
 - ◇ Se midió el pH a las 24 y 48 horas del caldo GYPC antes y después de ser inoculado para determinar la capacidad de acidificación.

V.7. Características fisiológicas y bioquímicas.

De aquí en adelante se define a la cepa aislada del queso tipo cotija como QC y la cepa aislada del queso doble crema como QDC.

Una vez que se obtuvo desarrollo microbiano se midió el pH y se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas.

V.7.1. Prueba de Catalasa.

1. Para la realización de esta prueba se inoculo en agar-GYPC inclinado con la concentración de NaCl establecida para cada cepa aislada tanto de QC como de QDC y el organismo se incubó a su temperatura óptima de 24 a 48 horas.
2. Se introdujo 1 mL de peroxido de hidrógeno al 3%, permitiendo el flujo sobre el agar inclinado.

Positivo: Producción de burbujas.

Negativo: Sin producción de gas.

La prueba también se realizo en una caja de petri donde se eligió una colonia aislada del cultivo característica y se emulsiono con una gota de peróxido de hidrógeno, y se interpreto como en el número 2.

V.7.2. Prueba de Oxidasa.

Se realizó por el Método Indofenol.

1. Se inoculó en agar nutritivo (GYPC con la concentración correspondiente a la (s) cepa (s) aisladas de cada queso QDC y QC) inclinado, y se incubó a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo (30°C) de 24 a 48 horas.
2. Se añadieron 3 gotas de reactivo A y reactivo B al cultivo del agar (inclinado), y se inclinaron los tubos para mezclar los reactivos y para que su vez fluyan sobre el cultivo.

Positivo: Color azul en el crecimiento, antes de dos minutos.

Reacciones débiles o dudosas que ocurran después de dos minutos se ignoran.

REACTIVO A: Disolver 1g de α -naftol en 100 mL de etanol al 95%.

REACTIVO B: Disolver 1g de p-aminodimetilanilina/HCl en 100 mL de agua destilada.

Este reactivo debe ser almacenado en el refrigerador y debe ser preparado cada mes.

V.7.3. Prueba de hidrólisis de almidón.

Se preparó agar GYPC (apropiado para cada cepa con la que se trabajó) con 0.2% de almidón soluble en placas.

1. Se inoculó en el medio de almidón y se incubó en una atmósfera apropiada a 30°C de noche o hasta que ocurrió suficiente crecimiento.
2. A cada una de las placas se añadió unas pocas gotas de iodo Gram.

Positivo: Medio azul con el área alrededor incolora del crecimiento.

Negativo: Medio azul con crecimiento alrededor uniforme.

V.7.4. Prueba de licuefacción de gelatina.

Se preparó gelatina en caldo nutritivo GYPC (con [NaCl] requerida para cada cepa) al 12% y se separó en tubos anchos. Se esterilizó en autoclave a 121°C por 12 minutos.

1. Se inoculó en la gelatina por piquete y se incubó a 30°C por 30 días.

2. Para detectar la licuefacción, se colocaron los tubos en refrigeración por 30 minutos.

Positivo fuerte: Licuefacción en tres días.

Positivo Débil: Licuefacción después de tres días.

V.7.5. Prueba de Voges-Proskauer y Rojo de Metilo (VP-MR).

1. Se inoculó en medio VP-MR y se incubó a 30°C por 48 horas.
2. Se tomó 1mL del cultivo y se transfirió a un tubo limpio.
3. Se añadió 0.6 mL de α -naftol al 5% en etanol y se mezcló bien.
4. Después se añadió 0.2 mL de KOH al 40%.y se agito.

Positivo: Color rojo durante 5 minutos.

V.7.6. Prueba de hidrólisis de caseína.

Consta de dos fracciones:

1. TSA (Agar Triptona de Soya) se disolvieron 20g en 250 mL de agua destilada.
2. Leche descremada 10g disuelta en 250mL de agua destilada.

Cada fracción se esterilizó por separado, la solución de caseína se esterilizó a 115°C durante 30 minutos, luego se dejó enfriar hasta 45°C, se mezcló y se repartió el medio en placas petri.

Las cepas se sembraron mediante una estría central gruesa y la lectura de la prueba se realizó observando la aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano, cuando la bacteria es capaz de hidrolizar la caseína.

El periodo de incubación para las cepas fue de 5 días a 30°C.

También se sembró en agar TSA al cual no se le añadió peptona de caseína.

V.7.7. Prueba de reducción de nitrato.

Las bacterias pueden reducir el nitrato por más de un proceso.

1. Se preparo caldo nitrato como medio de cultivo y se distribuyo en tubos con campanas Durham invertidas.
2. Se inocularon las cepas en el medio nitrito y se incubaron de 24 a 48 horas a 30°C.
3. Se mezclo por partes iguales la solución A y la solución B y se añadió 0.1 mL de la mezcla del cultivo.

Positivo: Ausencia del color rojo en el cultivo.

Negativo: Desarrollo del color rojo.

SOLUCIÓN DE NITRATO A: Se disolvieron 0.8g de ácido sulfónilico en 100mL de ácido acético 5N (esto es 1 parte de ácido acético glacial en 2 ½ partes de agua destilada).

SOLUCIÓN DE NITRATO B: Añadir 0.6mL de N,N-dimetil-1-naftalamina en 100mL de ácido acético 5N. Almacenar esta solución a 4°C.

Un método rápido puede ser:

1. Inocular 0.5 mL de caldo nitrato con una gota grande del medio de cultivo con desarrollo de las cepas a trabajar.
2. Incubar en un baño de agua caliente a 37°C.
3. Añadir una gota de la solución A y una gota de la solución B, y observar.

Positivo: Color rojo.

Si la prueba es negativa, añadir al minuto una cantidad pequeña de polvo de zinc y agitar.

Positivo: Ausencia del color rojo.

V.7.8. Producción de gas a partir de glucosa.

1. Se preparó caldo GYPC a las [NaCl] determinadas para cada cepa aislada de estudio (2.5% para la cepa aislada del queso tipo cotija y 4% para la cepa aislada del queso doble crema).
2. Se repartió en tubos con campanas Durham y se incubó a 30°C de 24 a 48 horas.

Positivo: Presencia de burbujas en la campana.

V.7.9. Producción de amoníaco a partir de arginina.

Se usó la prueba de la arginina desaminasa.

1. Se preparó el medio que contiene: extracto de levadura, rojo de fenol, agar y sales.
2. La L-arginina se esterilizó por filtración añadiéndola al medio estéril a 55-60°C.
3. La siembra se realizó en picadura y los tubos se cubrieron con una capa de aceite mineral estéril de un centímetro de grosor.
4. La incubación se realizó a 37°C durante 7 días y transcurrido este tiempo la presencia de un color rojo en los tubos indica una reacción positiva debida a la liberación de aminas por descarboxilación (Koneman y col. 1983).

Positivo: Viraje del indicador (rosa), ocasionado por la producción de amoníaco a partir del aminoácido.

V.7.10. Determinación de la actividad lipolítica, se realizó en agar de tributirina.

1. Se preparó agar de tributirina base.

2. Se añadió 1 g de tributirina neutral (gliceril-tributirato) Merck (I tem 1958) esterilizada por filtración, al agar antes de vaciar a las placas.
3. Se inocularon las bacterias aisladas (QDC y QC) y se incubaron a 29 °C hasta desarrollo microbiano.

Positivo: Formación de un halo transparente alrededor de la colonia, lo cual indica actividad lipolítica.

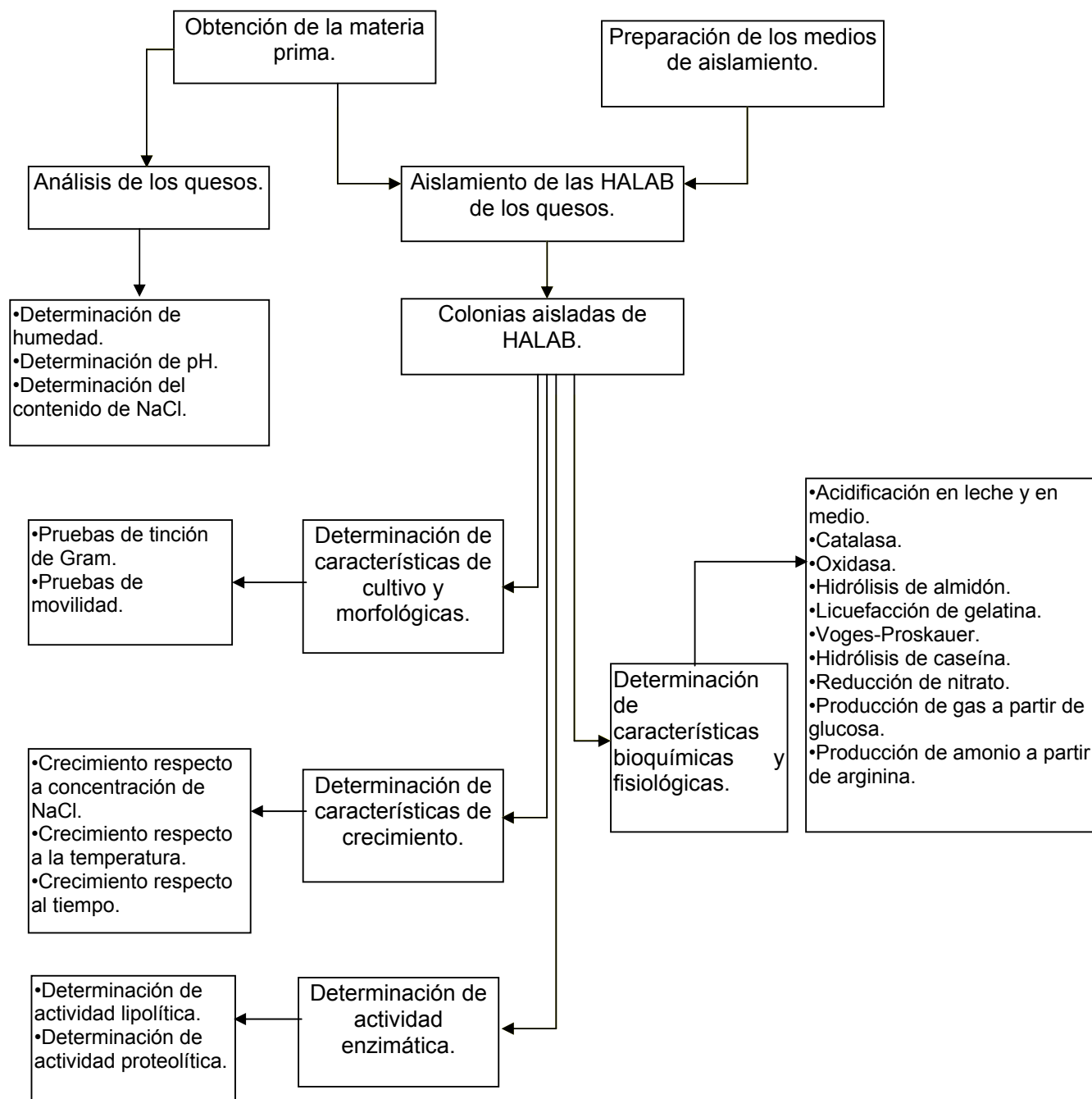
Negativo: No hay formación de halo.

V.7.11 Determinación de la actividad proteolítica.

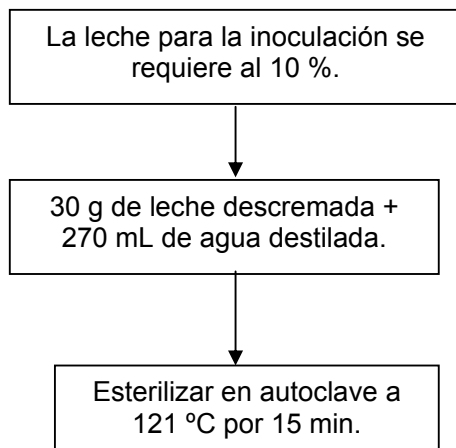
Esta se determino mediante la prueba de hidrólisis de caseína y licuefacción de gelatina.

VI. Diagrama de Bloques

VI.1. Esquema general del aislamiento y caracterización de las cepas aisladas del queso tipo cotija (QC) y queso doble crema (QDC).



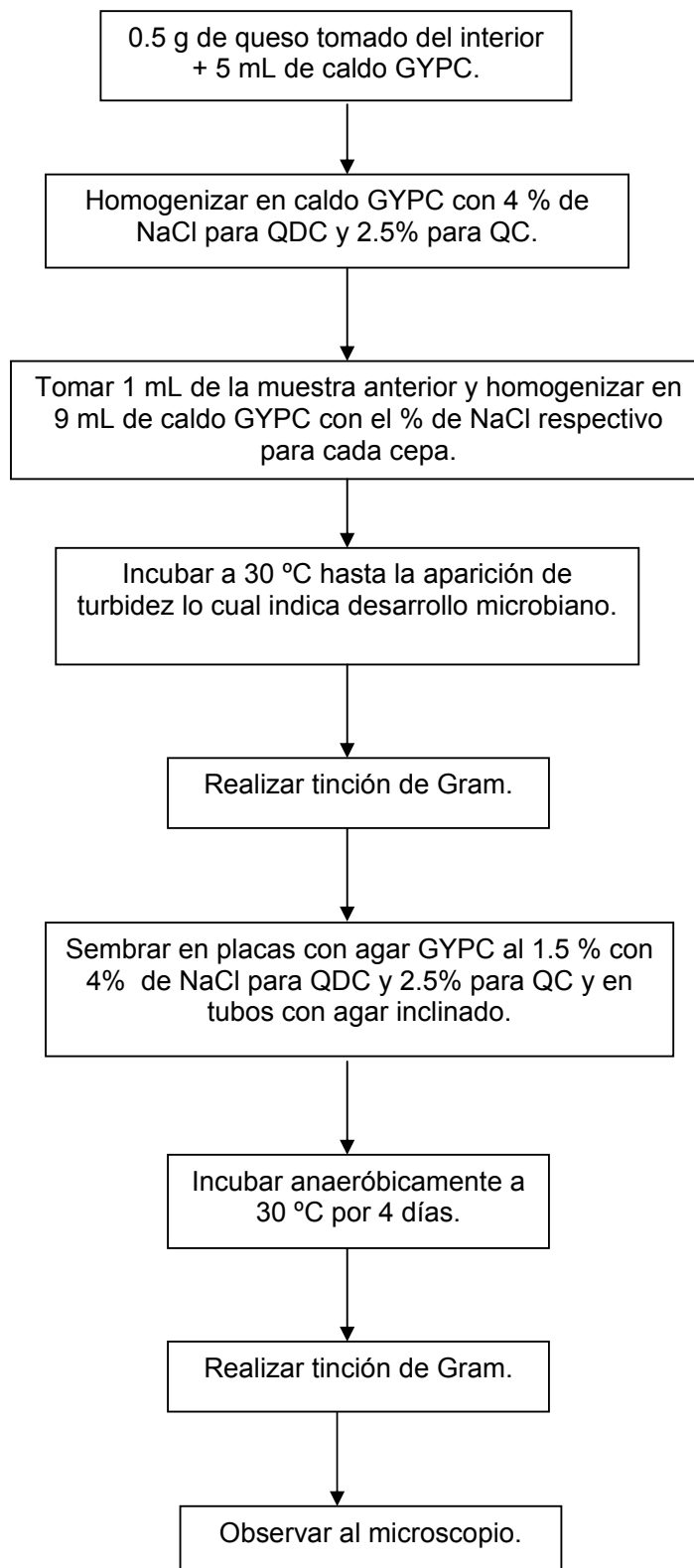
VI.2. Preparación de la leche para inocular.



Después de inocular los tubos con caldo se determinara crecimiento mediante la presencia de turbidez y tinción de Gram, y se inoculan en las cajas con agar al 1.5 % por estría cruzada o por agotamiento y posterior a esto se inocularan en tubos inclinados con agar.

Una vez que se presenten las colonias características se procederá a realizar las demás pruebas como son determinación de temperatura óptima, tiempo de desarrollo, etc.

VI.3 Aislamiento de las bacterias presentes en los quesos utilizados (queso tipo cotija y queso doble crema).



VII. Equipo y Reactivos.

Equipo:

- Termobalanza (Marca Mettler, modelo LJ16).
- Potenciómetro (Marca Orion, modelo 920 A).
- Ionómetro para determinación de Na⁺ (Cardy Compact Ion Meter C-122, marca Horiba, Ltd).
- Espectrofotómetro UV/Vis (Marca Jenway, modelo 5405).
- Microscopio óptico.
- Microcentrífuga (Marca Hettich, modelo Universal 30RF).
- Balanza digital (Marca Mettler, modelo AE100).
- Autoclave (Marca Brinkmann, modelo 2540E).
- Campana de flujo laminar.
- Estufa de temperatura constante (Marca Mapsa).
- Membranas de nylon.
- Puntas para micropipetas automáticas.
- Micropipetas automáticas de 2, 20, 200y 1000 µL.
- Material común de laboratorio.

Reactivos:

- Dextrosa anhidra (Reproquifin) CH₂OH(CHOH)₄CHO, PM: 180.16.
- Extracto de levadura (Sigma) N^o. 232-387-9.
- Extracto de carne (BD Bioxon) código 211802.
- Fosfato de Potasio monobásico (Reactivos analíticos) KH₂PO₄ PM: 154.098.
- Ciclohexamida (3[2(3,5-Dimetil-2-oxociclohexil)-2-hidroxietyl]glutarimida).
- Polimixina B Sulfato EEC No. 215-774-7.
- Polipeptona (Bioxon) CAT 217700.
- Agar bacteriológico (Bioxon) código 215000.
- Sulfato de Magnesio (Monterre) MgSO₄7H₂O PM: 246.50.
- Sulfato Manganoso (J.T.Baker) MnSO₄H₂O PM: 169.01.
- Sulfato Ferroso (Monterre) FeSO₄7H₂O PM: 278.03.
- Cloruro de Sódio (Fermont) NaCl PM: 58.44.
- Azida de Sódio (Sigma) NaN₃ PM: 65.0099.
- Agua oxigenada (Jaloma) anticéptico.
- Colorantes Gram (Hycel) CAT. 541.
- α-naftol (mercks reagenzien) C₁₀H₈O. PM: 144.17.
- P-amino (DMPPDA/2HCl), C₅H₁₂N₂·2HCl, (Fluka) PM: 209.12.
- Almidón Soluble (Reasol).
- Gelatina (Reagenzien merck).
- Medio Voges-Proskauer (MR-VP), (Bioxon de México).
- Hidróxido de Potasio (Fermont) PM: 56.11.
- Peptona de caseína (BD Bioxon) Ref: 232200.
- Peptona de soya (BD Bioxon) Ref: 211811.
- Tributirina neutral (gliceril-tributirato) Merck (I tem 1958).
- Ácido Sulfónilico (Sigma), C₆H₇NO₃S minimum 99.0%, PM:173.19.
- Ácido acético glacial (Baker Analyzed J.T.) CH₃COOH, PM: 60.0520.
- L-Arginina (Merck) C₆H₁₄N₄O₂, PM: 174.20.



VIII. Resultados y discusión.

VIII.1. Análisis de los quesos tipo cotija y doble crema.

Se llevaron a cabo las determinaciones de humedad y pH de los quesos a fin de caracterizar las condiciones iniciales de la materia prima que se empleó en la investigación. Los datos se observan en la Tabla 1:

Tabla 1. Datos de humedad y pH de los quesos tipo cotija y doble crema.

	Queso doble crema fresco			Queso doble crema seco			Queso tipo cotija rallado		
	R ₁	R ₂	Promedio	R ₁	R ₂	Promedio	R ₁	R ₂	Promedio
Peso de la muestra (g)	8.6	6.4	7.5	3.0	4.2	3.6	10.9	7.8	9.3
Contenido de humedad (%)	51.2	53.7	52.5	24.7	27.5	26	45	45	45.3
pH	4.4		4.4	4.4		4.4	5.6		5.6

Destaca que el queso doble crema es un producto más ácido que el queso tipo cotija, tanto en estado fresco como seco.

En la presente investigación, los quesos utilizados para el aislamiento de las cepas halófilas o halotolerantes, fueron comprados directamente en un supermercado, de tal manera que la obtención de los valores de pH y contenido de humedad, son parte de la caracterización de la materia prima.

Las condiciones de acidez de cada queso, son propias de las características organolépticas de éstos, que debido a su proceso de fabricación implican una etapa de descenso del pH a causa de la acción de las bacterias LAB y HALAB y otra etapa de maduración antes de llegar al mercado.

VIII.2. Determinación del contenido de NaCl.

Por su parte, la determinación del contenido de NaCl en los quesos indicó que además de ser un producto ácido, el queso doble crema fresco contiene un elevado porcentaje de sal, seguido por el queso tipo cotija.

Con estos datos, siendo productos lácteos de elevado contenido salino, fue posible establecer como hipótesis la presencia de bacterias lácticas de carácter halófilo, responsables de la maduración de éstos (Tabla 2).

Tabla 2. Datos del contenido de NaCl de los quesos tipo cotija y doble crema (fresco y seco).

	Queso doble crema fresco	Queso doble crema seco	Queso tipo cotija rallado
Lectura del ionómero (Na ⁺)	31x100	16x100	20x100
NaCl (%)	7.884	4.069	5.086

No se llevó a cabo la aplicación de ningún método estadístico, debido a que en el caso de la determinación del contenido de NaCl se hizo con un equipo que en pruebas preliminares mostró una constante repetición en las lecturas.

VIII.3. Pruebas de acidificación.

Se aisló una colonia bacteriana halófila de cada uno de los quesos tanto del queso tipo cotija como del queso doble crema y luego, se le realizaron algunas pruebas para confirmar su carácter acidificante en el medio, de tal manera que se determinó el pH inicial (sin inocular) y el pH final (inoculado), tanto en caldo de aislamiento GYPC-7%NaCl como en leche descremada estéril.

Se inocularon solo las colonias bacterianas aisladas de cada uno de los quesos tipo cotija y doble crema (una colonia aislada de cada queso).

Los resultados obtenidos fueron positivos, en el sentido que se pudo corroborar el descenso del pH de ambos medios, tal como se muestra en la siguiente Tabla 3:

Tabla 3. Datos de pH en caldo GYPC y en leche descremada inoculados con las cepas aisladas de los quesos tipo cotija y doble crema.

Muestra	Medio	pH			
		inicial	24 h	48h	7 días
Queso doble crema.	Caldo de aislamiento	5.562	5.379	4.180	-
	Leche descremada	6.367	-	-	3.896
Queso tipo cotija.	Caldo de aislamiento	5.670	5.465	4.344	-
	Leche descremada	6.367	-	-	4.659

VIII. 4. Características microscópicas y macroscópicas a partir de las cepas aisladas del queso tipo cotija (QC) y queso doble crema (QDC).

VIII. 4.1. Observaciones microscópicas:

Se realizaron tinciones de Gram para observar las características microscópicas de las bacterias aisladas del queso tipo cotija y queso doble crema en estudio, utilizando un microscopio óptico. La Figura 8 es la observación microscópica de la tinción de Gram hecha a las bacterias aisladas halófilas de QC, en la cual se pueden observar bacilos alargados Gram (+) que a su vez forman ramificaciones pero también se presentan alineados.

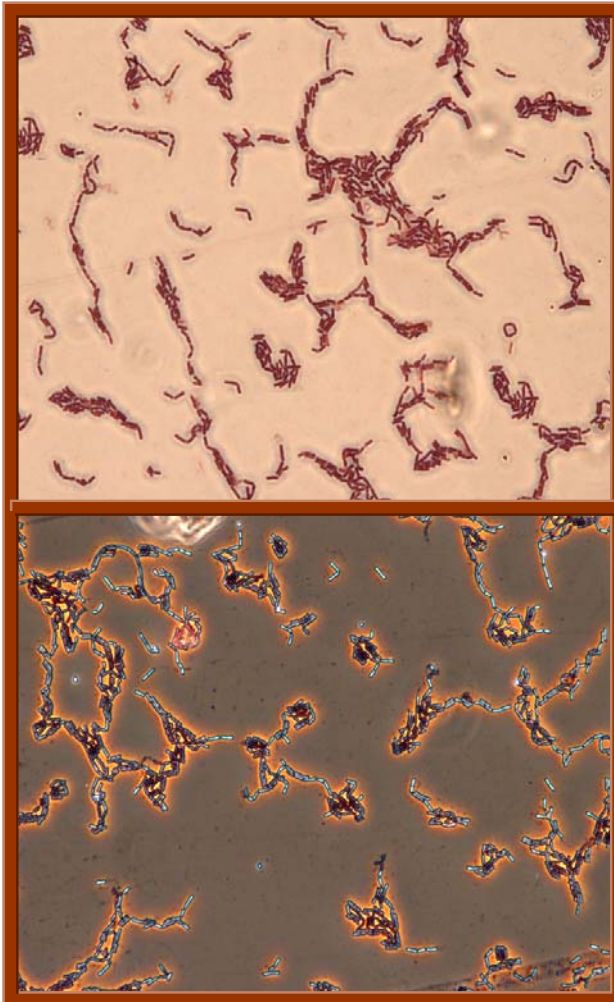


Fig. 8 Tinción Gram de las bacterias aisladas halófilas aisladas del queso tipo cotija [bacterias Gram (+)].

La Fig. 9 es la observación microscópica de la tinción de Gram realizada a las bacterias halófilas aisladas de QDC donde a diferencia de QC estos bacilos son más

cortos y gruesos y forman agrupaciones en vez de ramificaciones, a estos bacilos los definimos también como bacilos de forma cilíndrica.

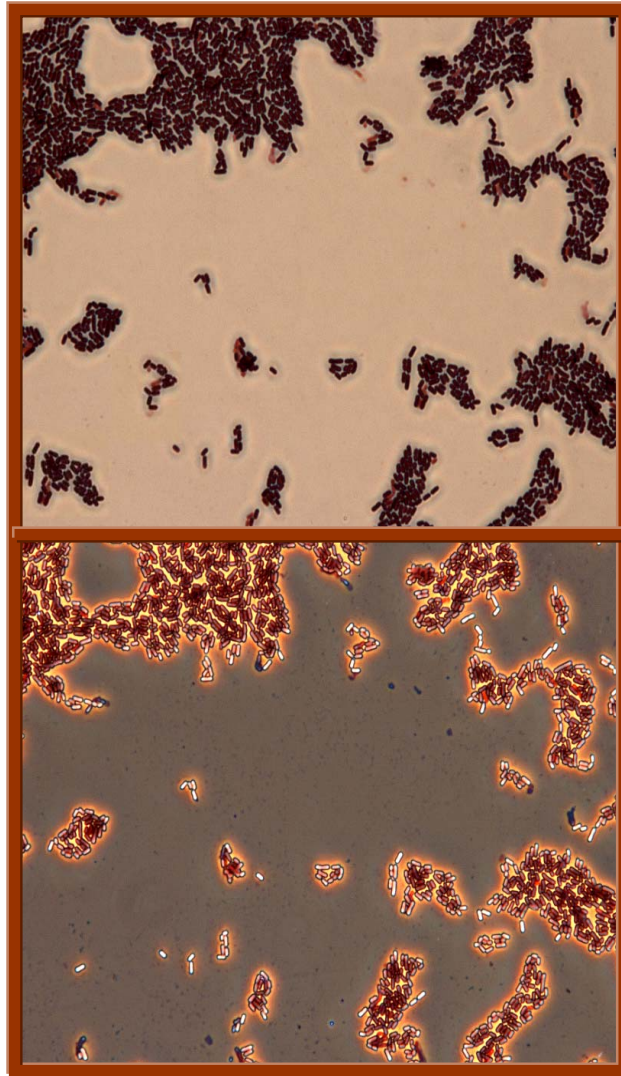


Fig. 9 Tinción Gram de las bacterias aisladas halófilas aisladas del queso doble crema [bacterias Gram (+)].

VIII.4.2. Observaciones macroscópicas:

Las cepas aisladas del QDC y QC se sembraron en caldo GYPC y se incubaron a 30°C por 24 (Fig. 10) y 48 horas (Fig. 11), transcurrido este tiempo hubo desarrollo de las cepas aisladas del QDC y QC, sin embargo a las 48 horas hay más crecimiento, esto se define por la presencia de turbidez (Fig. 11), las cepas aisladas de cada queso se inocularon en tubos de cultivo con medio GYPC y se les realizó la tinción de

Gram (Fig. 8 y 9), y posterior a esto fueron sembradas en cajas con agar (al 1.5%) GYPC e incubadas a 30°C por 48 horas (Fig. 12) como se describió anteriormente y se observó el crecimiento en las cajas para determinar sus características físicas, además de realizar también la prueba de movilidad.



Fig. 10 Cepas del QDC y QC inoculadas en caldo GYPC a las 24 h. a) caldo GYPC sin inocular, b) caldo GYPC inoculado con la cepa aislada de QDC y c) caldo GYPC inoculado con la cepa aislada del QC.



Fig. 11 Cepas del QDC y QC inoculadas en caldo GYPC a las 48 h. d) caldo GYPC sin inocular, e) caldo GYPC inoculado con la cepa de QC y f) caldo GYPC inoculado con la cepa de QDC.

Las características del desarrollo en cajas de las colonias de las bacterias aisladas de QC son convexas, dispersas, de color blanco opaco y lenticulares (Figura 12), las

colonias aisladas de QDC en agar inclinado se pueden observar en la Figura 13 y su desarrollo en caja muestra que las características de estas colonias son convexas, blancas opaco, lenticulares, pero a diferencia de las del QC su desarrollo es más abundante y las colonias están más juntas (Figura 14).

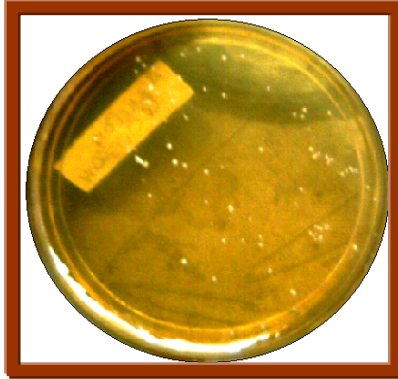


Fig. 12 Colonias de queso tipo cotija en agar GYPC a las 48 h. de inoculación.



Fig.13 Colonias de QDC en agar GYPC inclinado.

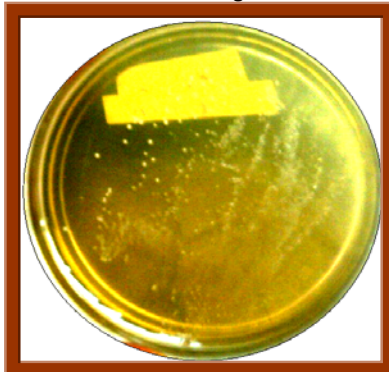


Fig. 14 Colonias de queso doble crema en agar GYPC a las 48 h. de inoculación.

De acuerdo con la prueba de movilidad el resultado será positivo (móvil) debido a que microorganismos móviles migran desde la línea de siembra y se difunden en el medio, lo que produce turbidez. Pueden mostrar estrías de crecimiento velloso [Fig. 14 (g) y Fig. 15 (i)]. Y cuando al medio se le agrega TTC el resultado dará positivo (móvil) si los microorganismos móviles producen una nube turbia rosa [Fig. 14 (h) y Fig. 15 (k)] que se difunde en todo el medio. Por lo tanto la prueba de movilidad dio positiva para ambas cepas (QDC y QC) como se muestra en las figuras 14 y 15.



Fig.14 Prueba de movilidad de la cepa del queso doble crema. g) Medio sin TTC y h) Medio con TTC.



Fig.15 Prueba de movilidad de la cepa del queso tipo cotija. i) Medio sin TTC y j) Amplificación de la imagen j k) Medio con TTC.

VIII.5. Determinación de [NaCl], Temperatura y tiempo óptimo de crecimiento para cada cepa aislada.

Con el objeto de determinar la magnitud de crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl en el medio, se leyó la absorbancia después de 24 y 48 horas de incubación a 28, 30 y 32°C luego de ser inoculados con las bacterias halófilas y también se realizó una curva de crecimiento.

En una primera inoculación, los resultados obtenidos indicaron que la cepa aislada del QDC posiblemente tenga un carácter moderadamente halófilo dado el tipo de curva observada en la Figura 16. Sin embargo, el carácter real de la cepa sólo podría observarse en un medio mínimo desprovisto totalmente de sal y en el cual en teoría un microorganismo halofílico estricto no debería mostrar crecimiento. En los medios no definidos como el usado en este trabajo, no es posible definir claramente el comportamiento ya que normalmente los ingredientes de los mismos tienen sal residual. En el caso de las bacterias aisladas de QC, y tal como se aprecia en la Figuras 17, el comportamiento es de halotolerancia.

Se obtuvo la máxima absorbancia alrededor del 2 a 4% de NaCl en el medio (señalado por el círculo rojo), por lo cual, posteriormente se redefinieron los intervalos de concentración de sal ([NaCl]) en el medio.

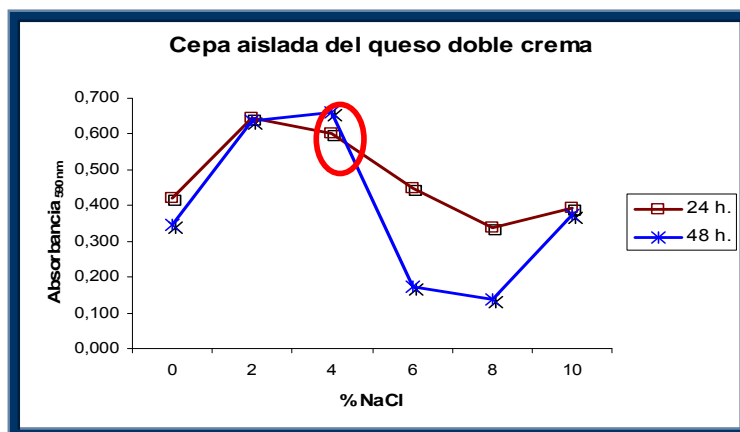


Fig. 16 Curva de crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl para la cepa aislada del QDC a 24 y 48 horas de incubación.

QDC	24 h.	48 h.
-----	-------	-------

% NaCl	Abs. 590 nm	Abs. 590 nm
0	0.420	0.345
2	0.600	0.636
4	0.645	0.661
6	0.449	0.172
8	0.340	0.138
10	0.395	0.375

Círculo rojo →

Datos de la figura 16.

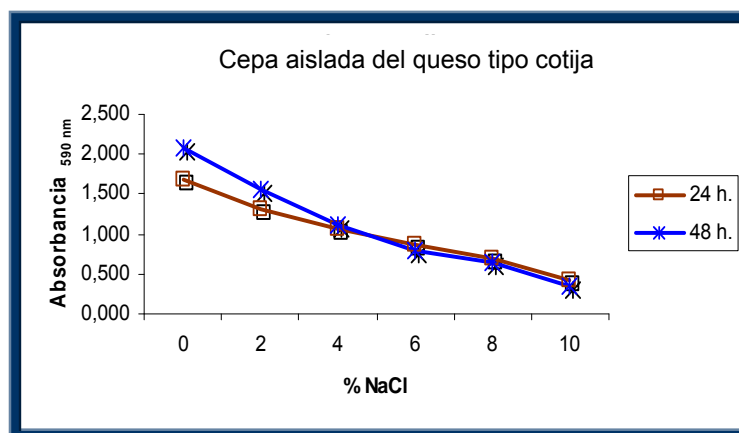


Fig. 17 Curva de crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl para la cepa aislada del QC a las 24 y 48 horas de incubación.

QC	24 h.	48 h.
% NaCl	Abs. 590 nm	Abs. 590 nm
0	1.678	2.083
2	1.320	1.558
4	1.064	1.108
6	0.855	0.795
8	0.692	0.633
10	0.417	0.344

Datos de la figura 17.

De acuerdo a los resultados obtenidos con las nuevas concentraciones de sal probadas, indican un óptimo de crecimiento de 4% de NaCl para QDC (Fig. 16) y 2.5% de NaCl para la cepa QC señalado por el círculo rojo (Fig. 18).

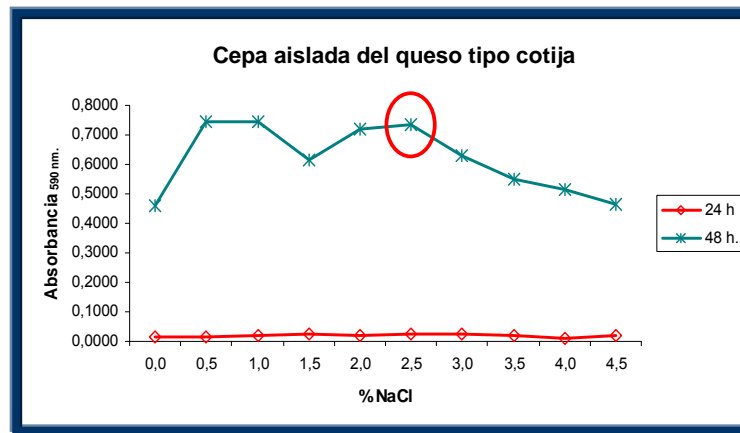


Fig. 18 Curva de crecimiento a la concentración óptima de NaCl para la cepa aislada del QC, la cual es al 2.5% y a las 48 horas.

Queso	tipo cotija	24 h.		48 h.
%NaCl	Promedio	Desviación	Promedio	Desviación
0.0	0.0130	0.012530	0.460	0.167475
0.5	0.0133	0.000577	0.735	0.009866
1.0	0.0217	0.004933	0.743	0.022030
1.5	0.0240	0.011269	0.613	0.105192
2.0	0.0190	0.007550	0.722	0.011136
2.5	0.0263	0.003055	0.745	0.032047
3.0	0.0230	0.005292	0.630	0.029513
3.5	0.0187	0.005774	0.548	0.026026
4.0	0.0123	0.005033	0.514	0.012767
4.5	0.0177	0.005508	0.467	0.016258

← Círculo rojo

Datos de la figura 18, los datos usados para la grafica fueron los del promedio.

Para determinar la temperatura óptima se realizaron diferentes curvas de crecimiento para QDC y QC (Fig. 19), donde el resultado para ambas cepas fue de una temperatura óptima de 30°C.

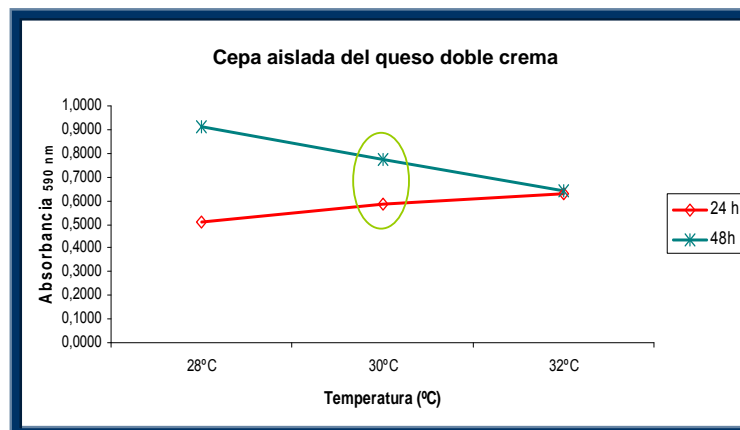


Fig. 19 Curva de crecimiento a diferentes Temperaturas para determinar la Temperatura óptima para la cepa aislada de QDC con 4% NaCl.

24 h			48 h		
Temperatura	DS	Promedio	Temperatura	DS	Promedio
28°C	0,0115902	0,510333	28°C	0,175432	0,913667
30°C	0,0343560	0,587333	30°C	0,024947	0,772667
32°C	0,0051962	0,628000	32°C	0,014933	0,639000

← Círculo verde

Datos de la figura 19.

Para la determinación del tiempo óptimo de crecimiento se realizaron mediciones de absorbancia por triplicado para cada cepa, determinando para QDC las 48 horas de incubación como tiempo óptimo ya que a este tiempo se obtuvo el máximo desarrollo de crecimiento (Fig. 20). El promedio de las tres mediciones anteriores indica con más claridad que el tiempo óptimo de crecimiento es a las 48 horas para la cepa QDC (Fig. 21).

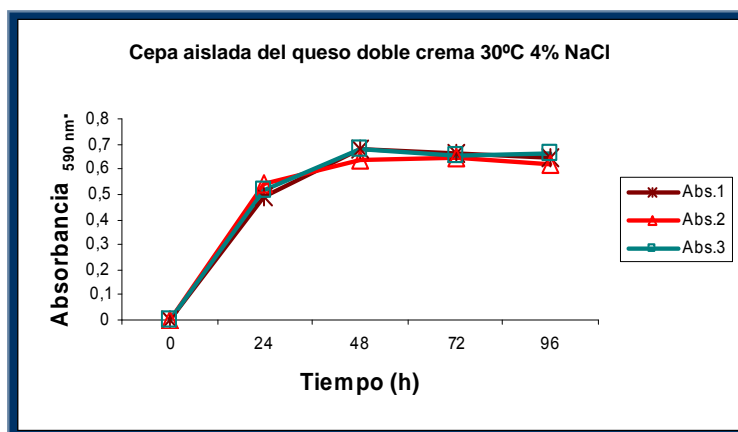


Fig. 20 Curva de crecimiento que como se observa el tiempo de desarrollo óptimo es a las 48 horas.

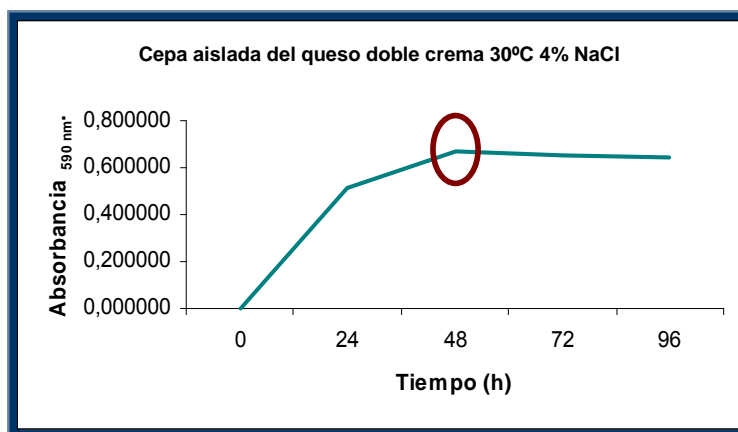


Fig. 21 Curva de crecimiento promedio de las absorbancias de la fig. 20 en relación al tiempo de desarrollo óptimo el cual es a las 48 horas (círculo color vino).

Queso	doble crema	30°C	4%NaCl		
Tiempo (h)	Abs.1	Abs.2	Abs.3	Promedio	DS
0	0	0	0	0.000000	0.0000000
24	0.491	0.545	0.514	0.516667	0.0270986
48	0.680	0.634	0.683	0.665667	0.0274651
72	0.662	0.642	0.653	0.652333	0.0100167
96	0.645	0.621	0.666	0.644000	0.0225167

← Círculo vino

Datos de la figura 20 y 21.

Para QC se obtuvo la máxima absorbancia a las 48 horas, como lo indica en la Fig. 22. Realizando también el promedio del gráfico anterior, obteniendo el tiempo óptimo a las 48 horas también para QC Fig. 23.

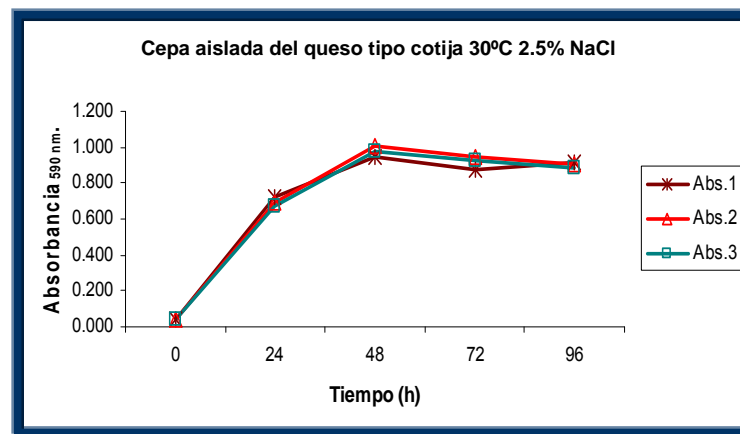


Fig. 22 Curva de crecimiento en relación al tiempo de desarrollo óptimo para el QC el cual es a las 48 horas.

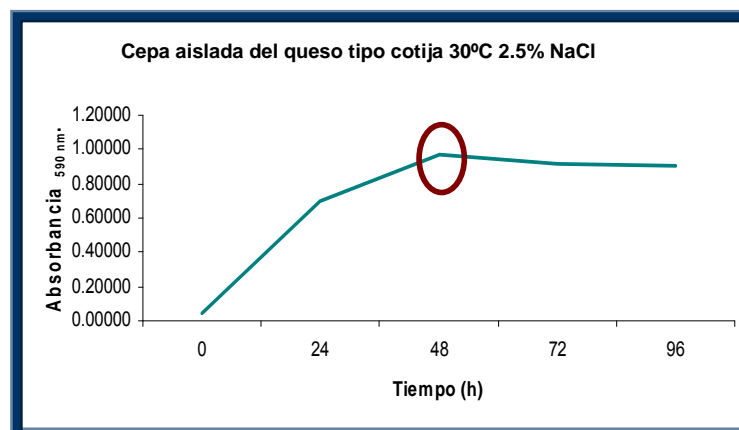


Fig. 23 Curva de crecimiento en relación al tiempo de desarrollo óptimo (círculo color vino) para la cepa aislada de QC el cual es a las 48 horas (promedio de la grafica fig. 21).

Queso tipo	cotija	30°C	2.5% NaCl		
Tiempo (h)	Abs.1	Abs.2	Abs.3	Promedio	Desviación
0	0.037	0.040	0.042	0.03967	0.0025166
24	0.726	0.694	0.667	0.69567	0.0295353
48	0.943	1.004	0.980	0.97567	0.0307300
72	0.872	0.942	0.926	0.91333	0.0366788
96	0.917	0.906	0.882	0.90167	0.0178979

← Círculo vino

Datos de las figuras 22 y 23.

VIII.6. Pruebas bioquímicas.

En el Cuadro 1 se observan los resultados de las pruebas bioquímicas llevadas a cabo para ambas cepas aisladas en esta investigación.

Cuadro 1. Pruebas bioquímicas.

Prueba Bioquímica.	Cepa aislada del QDC.	Cepa aislada del QC.
Catalasa	Negativa	Negativa
Oxidasa	Negativa	Negativa
Hidrólisis en almidón	Positiva	Positiva
Licuefacción de gelatina	Positiva	Negativa
Voges-Proskauer (VP)	Negativa	Negativa
Hidrólisis de caseína	Negativa	Negativa
Reducción de nitrato	Positiva	Positiva
Gas a partir de glucosa	Negativa	Negativa
Amoníaco a partir de arginina	Negativa	Negativa
Actividad lipolítica	Negativa	Negativa
Actividad proteolítica	Positiva	Negativa

La literatura reporta a *Marinilactibacillus psychrotolerans* y a *Alkalibacterium olivapovliticus* aislados a partir de quesos europeos (Ishikawa *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2005) con las siguientes características (Cuadro 2):

Cuadro 2. Características bioquímicas y fisiológicas de las bacterias aisladas de los quesos europeos reportados en la literatura.

<i>Marinilactibacillus psychrotolerans</i>	<i>Alkalibacterium olivapovliticus</i>
Bacilos Gram (+)	Bacilos Gram (+)
Catalasa (+)	Catalasa (-)
Oxidasa (-)	Oxidasa (-)
No esporulados	No esporulado
T máxima 40-45 °C	T máxima 37 °C
T óptima 37-40 °C	T óptima 27-32 °C
Móvil con flagelos peritrico	Flagelado
Ligeramente halofílico	Anaerobio facultativo
Altamente halotolerante	Halotolerante
Psicotolerante	Psicotolerante
Alcalofílico	Alcalofílico obligado
pH óptimo de crecimiento 8.0-9.5	pH óptimo 9.0-9.4
Intervalo de pH 6.0-10.0	Intervalo de pH 8.0-11.0
[NaCl] óptimo 2.0-3.75 % (p/v)	[NaCl] óptimo 3.0-5.0 % (p/v)
[NaCl] intervalo 0-17.0-20.5% (p/v)	[NaCl] intervalo 0-5.0-10.0% (p/v)
Forma cilíndrica	Forma cilíndrica

Sin embargo las características de crecimiento de nuestras cepas aisladas de QDC y QC fueron las siguientes (Cuadro 3):

Cuadro 3. Características bioquímicas y fisiológicas de las cepas aisladas.

Cepa aislada del QDC	Cepa aislada del QC
Bacilos Gram (+)	Bacilos Gram (+)
Catalasa (-)	Catalasa (-)
Oxidasa (-)	Oxidasa (-)
No esporulados	No esporulado
Moderadamente halofílico	Halotolerante
Forma cilíndrica	Forma alargada
T óptima 30 °C	T óptima 30 °C
Móvil	Móvil
Anaerobia facultativa	Anaerobia facultativa
[NaCl] óptimo 4.0 % (p/v)	[NaCl] óptimo 2.5 % (p/v)
[NaCl] intervalo 0-4.0-12% (p/v)	[NaCl] intervalo 0-2.5-10% (p/v)

Comparando los resultados obtenidos de nuestras cepas aisladas (Cuadro 3.) con los reportados en la literatura (Cuadro 2) no podemos decir que sean los mismos microorganismos, sin embargo, algunas de las características son similares pero para definir bien el genero y el tipo de microorganismo que aislamos se requiere de técnicas moleculares de identificación de microorganismos, como sería PCR, por mencionar uno.

Prueba de fermentación de carbohidratos Cuadro 4:

Cuadro 4. Resultados de la prueba de fermentación de carbohidratos.

Carbohidrato	QDC	Tiempo de fermentación	QC	Tiempo de fermentación
Arabinosa	+	8 días	+	8 días
Celobiosa	+	24 horas	+	Más de 3 días
Fructosa	+	48 horas	+	48 horas
Galactosa	+	24 horas	+	Más de 3 días
Glucosa	+	24 horas	+	24 horas
Lactosa	+	48 horas	+	48 horas
Malibiosa	+	Mas de 3 días	+	24 horas
Manitol	+	8 días	+	8 días
Ramnosa	+	24 horas	+	24 horas
Rafinosa	+	8 días	+	Más de 3 días
Sacarosa	+	8 días	+	8 días
Sorbitol	+	8 días	+	8 días
Xilosa	+	8 días	+	8 días

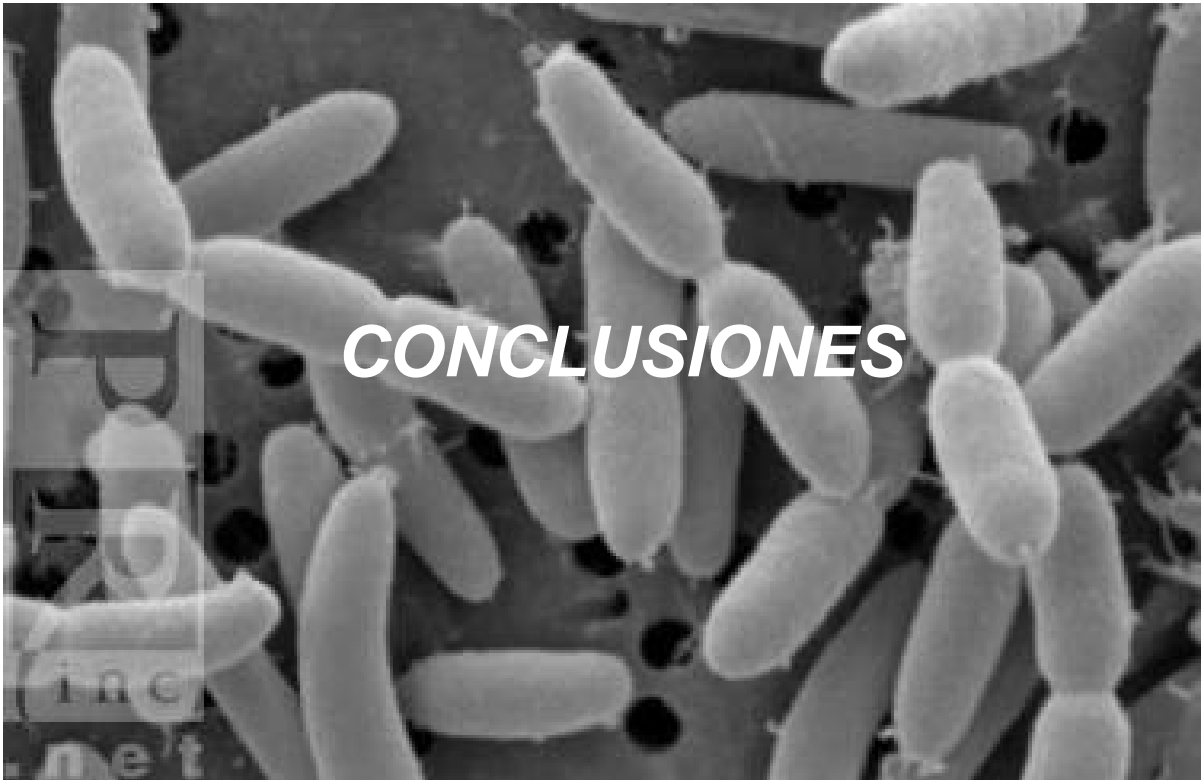
Para el caso de la prueba de fermentación de carbohidratos en todos los casos dio positivo lo único que varió fue el tiempo que tardo en realizarse la fermentación, por lo tanto se podría decir que tanto la cepa aislada del queso doble crema (QDC) como la

cepa aislada del queso tipo cotija (QC) pueden usar cualquier carbohidrato del Cuadro 4 como fuente de carbono y quizá lo que varíe es el tiempo de desarrollo.

En el caso de los positivos que se obtuvieron después de ocho días lo único que se tomo en cuenta fue el cambio de vire para determinar que se realizó la fermentación sin tomar en cuenta un tiempo de incubación establecido.

La cepa aislada de QDC mostró actividad proteolítica y de licuefacción de gelatina, lo cual indica que podría participar en una etapa tardía de la maduración del queso doble crema. No es probable que participe desde el inicio ya que la prueba de utilización de la caseína resultó negativa.

La cepa aislada de QC aparentemente no participaría en el proceso de maduración del queso tipo cotija ya que no presentó actividades ni proteolítica ni lipolítica.



IX. CONCLUSIONES

- Se logró aislar dos tipos de bacterias lácticas: una con un posible carácter moderadamente halófilico y otra halotolerante de los quesos utilizados (queso doble crema y tipo cotija respectivamente) encontrándose dos cepas con características morfológicas diferentes pero con características fisiológicas muy similares.
- Las bacterias aisladas de los dos quesos fueron inoculadas en leche a la cual la acidificaron, y coagularon por lo que se puede decir que tienen la característica de ser bacterias ácido lácticas.
- No pertenecen al género de *Lactobacillus* ya que la prueba de reducción de nitrato la cual identifica a este género dio positiva, por su parte tampoco tienen las características de *Marinilactibacillus psychrotolerans* ni las de *Alkalibacterium olivapovliticus*.
- Para el caso de las bacterias aisladas a partir del queso tipo cotija (QC) presentan las características de ser bacilos alargados Gram (+), móviles, no esporuladas, halotolerantes, con una temperatura óptima de 30°C, anaerobia facultativa y [NaCl] óptimo 2.5 % (p/v). Así mismo no presento actividad proteolítica, ni actividad lipolítica. De acuerdo a las pruebas bioquímicas realizadas.
- Debido a que la cepa aislada del queso tipo cotija (QC) no presentó actividad proteolítica, ni lipolítica, se presume que ésta no participa activamente en el proceso de maduración de este tipo de quesos.
- Para la cepa de bacterias aisladas a partir del queso doble crema (QDC) presentan las características de ser bacilos cilíndricos Gram (+), no esporulados, con posible carácter moderadamente halófilico, T óptima de crecimiento 30°C, móvil, anaerobia facultativa, [NaCl] óptimo 4.0 % (p/v) y de acuerdo a las pruebas

bioquímicas que dieron positivas a diferencia y en comparación a la del queso tipo cotija fue la de licuefacción de gelatina y la actividad proteolítica.

- Debido a su actividad proteolítica y de licuefacción de gelatina, la cepa aislada del QDC, si podría indicar participación en una etapa tardía de la maduración del queso doble crema. Sin embargo no es probable que participe desde el inicio ya que la prueba de utilización de la caseína resultó negativa.
- El comportamiento del pH durante la maduración de los quesos; se comporta con un descenso de pH debido a que las LAB siguen trabajando y produciendo ácido láctico; sin embargo después de este periodo, el pH aumenta debido principalmente a la lisis de algunas bacterias que provocan algunas reacciones que involucran la formación de sustancias nitrogenadas (amoníaco), con el consecuente aumento del pH.



X. GLOSARIO.

Bacterias lácticas homofermentativas= Relativo a bacterias del ácido láctico y que originan ácido láctico como único producto final de fermentación.

Bacterias lácticas heterofermentativas= Relativo a bacterias del ácido láctico, capaces de originar más de un producto de fermentación.

°D=Grados Dornic. Existen diversos métodos para determinar la acidez de la leche. En México y en los Estados Unidos se emplea el sistema de expresión en términos de ácido láctico y en Europa se usan diversos sistemas como son los grados Dornic (°D) (mL de NaOH N/9 por 100mL). La conversión de % de ác. láctico a °D puede hacerse en base a la siguiente relación:

$$\% \text{ ácido láctico} = \frac{mL_{NaOH} \times N_{NaOH} \times \text{peso meq del ác. láctico}}{mL_{muestra}} \times 100 = 1.1 \text{ °D}$$

Glucólisis= Ruta bioquímica mediante la cual se fermenta la glucosa para producir energía (ATP) y varios productos resultantes de la fermentación. También se denomina ruta de Embden-Meyerhof.

Kefir=Producto lácteo fermentado de fácil elaboración artesanal, del cual se obtiene un filtrado que tiene un aspecto parecido al de la leche pero con burbujas y espuma como la cerveza. En el comercio hay cultivos liofilizados de kefir cuya duración es casi ilimitada.

Kumis=También se conoce como nata ácida, se encuentra en el comercio en forma de gel untuoso con un ligero gusto ácido.

Lipólisis= Es la hidrólisis de los enlaces éster de los lípidos (lipólisis) se produce por acción enzimática o por calentamiento en presencia de agua y tiene por consecuencia la liberación de ácidos grasos.

Proteólisis=Conversión de proteínas en peptonas solubles por descomposición o hidrólisis.

Starters= Es un cultivo de microorganismos cuyo crecimiento en la leche o cuajada produce con su actividad metabólica, la maduración del queso.

Tetrazolio= Sal de una base coloreada que por lo común es cloruro.

Tinción de Gram= Coloración diferencial que incorpora dos colorantes con colores contrastantes; inventada en 1847 por Christian Gram, de allí su nombre. Las bacterias son clasificadas como Gram positivas o Gram negativas, lo que depende de su capacidad de retener o perder el colorante primario (violeta cristal) cuando se las somete a un agente decolorante.

X.1. Abreviaturas.

CLAB= Bacterias ácido-lácticas comunes.

GYPC= Medio de cultivo para aislamiento de LAB El cual contiene Glucosa, Extracto de levadura, Peptona y Extracto de carne.

HALAB= Bacterias ácido-lácticas halofílicas y alcalofílicas.

LAB= Bacterias ácido-lácticas.

[NaCl]= Concentración de NaCl (cloruro de sodio).

NSLAB= Bacterias ácido-lácticas no iniciadoras.

QDC= Cepa aislada del queso doble crema.

QC= Cepa aislada del queso tipo cotija.

TSA=Agar Triptona de Soya.



XI. BIBLIOGRAFÍA.

- Alais, C. (1998). Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. Ed. Continental, S.A. México.
- Amiot, J. (1991). Ciencia y Tecnología de la leche. Ed. Acribia. España.
- Blazevic DJ, Ederer GM. Principles of Biochemical Tests in Diagnostic Microbiology. New York: John Wile and Sons, 1975: 13-15, 45-50, 79-81, 91-94, 99-101, 105-108.
- Bockelmann, W.; Willems, K.P.; Neve, H. & Heller, K. H. (2005). Cultures for ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal*. 15, 719–732.
- Bourgeois, C.M. & Larpent, J. P. (1995). Microbiología alimentaria. Volumen 2. Fermentaciones alimentarias. Ed. Acribia. Zaragoza, España.
- Cervantes, E. F.; Villegas, G. A.; Cesín, V. A. & Espinoza, O. A. (2006). Los quesos mexicanos genuinos: un saber hacer que se debe rescatar y preservar. Comunicación aceptada por el Comité Científico del III Congreso Internacional de la Red SIAL “Alimentación y Territorios”.
- Chamorro, M. C. & Losada M. M. (2002). El análisis sensorial de los quesos. Colección Tecnología de alimentos. Ed. Mundi-Prensa. Madrid España.
- Cheesman (1984). Los cultivos lácticos. Traducido por Villegas en 1988. Curso dado en Veracruz, México.
- Cogan, T. M.; Barbosa, M.; Beuvier, E.; Bianchi-Salvadori, B.; Cocconcelli, P. S.; Fernández, I.; Gómez, J.; Kalantzopoulos, G.; Ledda, A.; Medina, M.; Rea, M. C. & Rodríguez, E. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *J. Dairy. Res.* 64, 409-421.
- De Angelis, M.; Corsetti, A.; Tosti, N.; Rossi, J. Corbo, M. R. & Gobbetti, M. (2001). Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic and cell wall protein analyses. *Applied and Environmental Microbiology*. 67, 2011-2020.
- Demarigny, Y.; Beuvier, E.; Buchin, S.; Pochet, S. & Grappin, R. (1997). Isolation of raw mil microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses. II. Biochemical and sensory characteristics. *Lait*. 77, 151-167.

-
-
- Feurer, C.; Irlinger, F.; Spinnler, H. E.; Glaser, P. & Vallaey, T. (2004). Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. *Journal of Applied Microbiology*. 97, 546–556.
 - Fitzsimons, N. A.; Cogan, T. M.; Condon, S. & Beresford, T. (1999). Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 3418-3426.
 - García G.; Quintero, R. & López - Munguía, C. (1993). *Biología alimentaria*. Ed. Limusa, México, D.F.
 - Guillamón, J. M.; González, A.; Hierro, N.; Rozès, N.; Mas, A. & Poblet, M. (2003). Técnicas de identificación de bacterias acéticas. Unitat d'Enologia del Centre de Referència de Tecnologia d'Aliments. Depto. Bioquímica y Biotecnología. Facultad d'Enologia de Tarragona. Universitat Rovira i Virgili. Tarragona, España.
 - <http://www.es.wikipedia.org>.
 - <http://www.ssa.gob.mx/nom/121ssa14.html>. NOM-121-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Quesos: Frescos, Madurados y Procesados. Especificaciones Sanitarias.
 - Ishikawa, M; Nakajima, K.; Yanagi, M.; Yamamoto, M. & Yamasato, K. (2003). *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53, 711-720.
 - Ishikawa, M.; Nakajima, K.; Itamiya, Y.; Furukawa, S.; Yamamoto, Y. & Yamasato, K. (2005). *Halolactibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov. and *Halolactibacillus miurensis* sp. nov., halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacteria constituting a phylogenetic lineage in Bacillus rRNA group 1. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55, 2427–2439.
 - Ishikawa, M; Kodama, K.; Yasuda, H.; Okamoto-Kainuma, A.; Koizumi, K. & Yamasato, K. (2006). Presence of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria in various cheeses. *Journal compilation. The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*. 44, 308-313.

-
-
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, et al. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, ed 4. Philadelphia: JB Lippincott, 1992: 123-124, 133,140, 147, 198, 452.
 - Liu, S.Q. and Pilone, G.J. (1998). A review: arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance. *Journal of Applied Microbiology* 84: 315-327.
 - Mac. Faddin, Jean, (1991). Pruebas Bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica. Editorial panamericana.
 - Maoz, A.; Mayr, R. & Scherer, S. (2003). Temporal stability of two complex antilisterial cheese-ripening microbial consortia. *Applied Environmental Microbiology*. 69, 4012-4018.
 - Martley, F. G. & Crow, V. L. (1993). Interactions between no-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *International of Dairy Journal*. 3, 461-483.
 - Michael, T., Madigan, John M. Martinko (1978). Brock Biología de los microorganismos. 2da edición. Ed. Pearson Educación, Madrid España.
 - Mounier, J.; Gelsomino, R.; Goerges, S.; Vancanneyt, M.; Vandemeulebroecke, K.; Hoste, B.; Sherer, S. & Swings, J. (2005). Surface microbiota of four smear-ripened cheeses. *Applied Environmental Microbiology*. 71, 6489–6500.
 - Ntougias, S. & Russell, N. J. (2001) *Alkalibacterium olivoapovliticus* gen. nov., sp. nov., a new obligately alkaliphilic bacterium isolated from edible-olive wash-waters. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51, 1161–1170.
 - Núñez, G. (1985). Los fermentos lácticos y su influencia sobre los distintos quesos. *Revista Española de Lechería*. N°6. España.
 - Piuri, M.; Sánchez-Rivas, C. & Ruzal, S.M. (2003). Adaptation to high salt in *Lactobacillus*: role of peptides and proteolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*. 95, 372-379.
 - Rastelli, E.; Giraffa, G.; Carminati, D.; Parolari, G. & Barbuti, S. (2005). Identification and characterization of halotolerant bacteria in spoiled dry-cured hams. *Meat Sciences*. 70, 241–246.
 - Scott, R. (1991). Fabricación de queso. Ed. Acribia. España.

- Smeltzer, M., Hart, M. & landolo, J. (1992). Quantitative spectrophotometric assay for Staphylococcal lipase. *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 2815-2819.
- Villegas, de G. (1993). *Los quesos mexicanos*. CIESTAAM, UCh. México.