

300627

35

1^o



UNIVERSIDAD LA SALLE

ESCUELA DE QUIMICA
INCORPORADA A LA U.N.A.M.

**"GENERALIDADES SOBRE LA IMPORTANCIA Y LOS
AVANCES DE LA INGENIERIA GENETICA SOBRE EL
GENERO *Lactobacillus* PARA LA PRODUCCION DE
DERIVADOS LACTEOS"**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A

MARIA DOLORES VERGARA OCARIZ

DIRECTOR DE TESIS: Q.F.B. MARTHA MUSTRE DE LEON

MEXICO, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

OBJETIVOS	1
CAPITULO I: IMPORTANCIA DE LOS DERIVADOS LACTEOS.	
1.1 IMPORTANCIA NUTRICIONAL DE LOS DERIVADOS LACTEOS	2
1.2 IMPORTANCIA DEL GENERO <u>Lactobacillus</u> EN LA PRODUCCION DE DERIVADOS LACTEOS	7
CAPITULO II. LACTOBACILOS COMO MICROORGANISMOS INDUSTRIALES.	
2.1 CARACTERIZACION MORFOLOGICA	10
2.1.1 Subgéneros.	10
2.1.1.1 <u>Thermobacterium</u>	13
2.1.1.2 <u>Streptobacterium</u>	13
2.1.1.3 <u>Beebacterium</u>	13
2.2 CARACTERIZACION POR DETERMINANTES ANTIGENICOS	19
2.3 RELACIONES GENOTIPICAS	20
2.3.1 Determinación de la composición del ADN de los lactobacilos.	20
2.4 HABITATS.	21
2.5 AISLAMIENTO	22
2.5.1 Medios de cultivo.	23
2.6 CULTIVO Y MANTENIMIENTO	28
2.6.1 Cultivo	28
2.6.2 Conservación de cultivos.	28
2.6.3 Secado por congelación.	27

CAPITULO III. ACTIVIDAD BIOQUIMICA DE LOS LACTOBACILOS

3.1	HIDROLISIS Y TRANSPORTE DE AZUCARES	30
3.2	FERMENTACION HOMOLACTICA	35
3.3	FERMENTACION HETEROLACTICA	44

CAPITULO IV. PROCESOS INDUSTRIALES

4.1	LACTOBACILOS COMO CULTIVOS INICIADORES	49
4.1.1	Preparación de los cultivos iniciadores de uso comercial	50
4.1.2	Aspectos biológicos de la asociación de cultivos iniciadores.	51
4.1.2.1	Metabolitos que regulan el crecimiento de los microorganismos.	51
4.1.2.2	Metabolitos que ejercen efectos antibióticos y bactericidas.	52
4.1.2.3	Metabolitos con efectos probióticos y terapéuticos.	53
4.1.3	Factores que interfieren el crecimiento de los cultivos.	53
4.2	PRODUCTOS LACTEOS EN DONDE SE EMPLEAN LACTOBACILOS	55
4.2.1	Leches fermentadas.	55
4.2.1.1	Yogurt	58
4.2.1	Quesos	61
4.2.2.1	Maduración del queso.	62
4.2.2.2	Queso Grana	64

CAPITULO V. INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA EN EL MEJORAMIENTO DE LAS CEPAS DE LACTOBACILOS.

5.1	INTRODUCCION	87
5.1.1	Recombinación genética.....	88
5.1.1.1	Transformación.....	88
5.1.1.2	Transducción.....	89
5.1.1.3	Conjugación.....	70
5.1.2	Plásmidos.....	71
5.1.3	Clonación.....	71
5.2	INGENIERIA GENETICA DE LOS LACTOBACILOS.....	72
5.2.1	Desarrollo de sistemas de transferencia genética.....	73
5.2.2	Metabolismo de la lactosa.....	74
5.2.3	Actividad proteolítica.....	78
5.2.4	Construcción de cepas que aceleren la maduración del queso.....	78
5.2.5	Producción de proteínas antagonicas.....	79
5.2.6	Resistencia a bacteriófagos.....	81
5.2.7	Fortificación de alimentos.....	84
5.2.8	Resistencia a antibióticos.....	85
5.2.9	Construcción de vectores.....	86
5.2.10	Futuro de la investigación sobre el género <u>Lactobacillus</u>	81
CAPITULO VI.	CONCLUSIONES	89
CAPITULO VII.	BIBLIOGRAFIA	98

INDICE DE TABLAS

1. Composición de diferentes clases de leche.....	2
2. Necesidades alimenticias del hombre y su satisfacción por la leche y los productos lácteos.....	3
3. Valor nutritivo de la leche y algunos productos lácteos.....	4
4. Contenido de aminoácidos en la leche y algunos productos lácteos fermentados.....	4
5. Consumo continental, global y per capita de productos lácteos fermentados.....	9
6. Subdivisión del género <u>Lactobacillus</u>	12
7. Características de diferenciación en las especies de <u>Thermobacterium</u> (Grupo I A).....	14
8. Caracteres de diferenciación de las especies de <u>Streptobacterium</u> (Grupo I B).....	15
9. Caracteres de diferenciación de las especies de <u>Betabacterium</u> (Grupo II A).....	18
10. Caracteres de diferenciación de las especies de <u>Betabacterium</u> (Grupo II B).....	17
11. Antígenos del género <u>Lactobacillus</u>	19
12. Composición media de bases del ADN de los lactobacilos.....	21
13. Leches fermentadas que se consumen en el mundo.....	55
14. Productos lácteos fermentados y tipo de bacterias ácido-lácticas empleadas como cultivo iniciador.....	57
15. Nombres del yogurt en los países donde se produce.....	59
16. Cultivos iniciadores y flora asociada de las variedades de queso duro.....	65

INDICE DE FIGURAS

1. Mecanismo enzimático de la hidrólisis de la lactosa.....	30
2. Mecanismo de liberación de la lactosa.....	31
3. Ruta glucolítica de Embden-Meyerhof para la degradación de la glucosa.	35
4. Fermentación homoláctica.	43
5. Ruta de la fermentación heteroláctica de la lactosa.....	48
6. Diagrama de la preparación del cultivo iniciador.....	50
7. Proceso de manufactura del yogur.	60
8. Proceso de manufactura del queso Grana.....	66
9. Mecanismo de transformación genética.....	68
10. Mecanismo de transducción especializada.....	69
11. Mecanismo de conjugación genética.....	70
12. Clonación de tres genes involucrados en el catabolismo de la D-xilosa en un vector <i>Lactobacillus</i>	77
13. Secuencia de aminoácidos de la parte carbono-terminal de la lactocina 8.	81
14. Mapa de restricción del plásmido pLY101.....	83
15. Mapa de restricción del plásmido pLJ1 del <i>L. helveticus</i> subsp. <i>Jugurti</i>	88
16. Mapas de restricción de los plásmidos pLP825, pLP3537, pLPE317 y pLPE323.....	89

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Destacar la importancia del proceso bioquímico de la fermentación láctica en la obtención de derivados de la leche.
2. Destacar la importancia que tiene el género Lactobacillus en la producción de derivados lácteos fermentados.
3. Recopilar los datos acerca de los avances de la importancia de la ingeniería genética y de la biotecnología sobre el género Lactobacillus aplicados al mejoramiento de la producción de derivados lácteos.

CAPITULO I

**IMPORTANCIA DE LOS
DERIVADOS LACTEOS**

IMPORTANCIA DE LOS DERIVADOS LACTEOS

1. IMPORTANCIA NUTRICIONAL DE LOS DERIVADOS LACTEOS.

La leche es un líquido segregado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos, tras el nacimiento de la cría. De composición compleja, color blanco opaco, de sabor dulce y pH cercano al neutro. (2)

Químicamente, la leche es una emulsión de materia grasa en forma globular en agua. A la vez, la materia proteica forma una suspensión en el suero constituido por una solución que contiene, principalmente, lactosa y sales minerales.

Las necesidades nutricionales de las diversas especies animales varían, de tal modo que la leche de los diferentes mamíferos es distinta en su composición. (Tabla 1).

Tabla 1. COMPOSICION DE DIFERENTES CLASES DE LECHE EN 100 g. DE PRODUCTO

	Extracto seco total	Materia grasa	Lactosa	Sales	Materias Nitrogenadas		
					Total	caseína %	N.N.P%*
Humano	11.70	3.50	6.50	0.25	1.40	28	17
Yegua	10.00	1.50	5.90	0.40	2.20	50	---
Vaca	12.50	3.50	4.70	1.80	3.50	78	5
Cabra	13.80	4.30	4.70	0.80	4.00	75	7
Oveja	19.10	7.50	4.50	1.10	6.00	77	5
Búfalo	17.80	7.50	4.70	0.80	4.80	80	---
Cebú	13.45	4.97	4.59	0.74	3.18	75	---

* Materias nitrogenadas no proteicas.
Fuente: Aleis, 1984. (2)

La importancia de la leche se basa en su alto valor nutritivo, ya que sus componentes se encuentran en forma y proporción adecuados para ser el alimento más balanceado en la dieta del niño y del adulto. Además, proporciona la mayoría de los nutrimentos y contiene diferentes sustancias que actúan en el sistema inmunológico (Tablas 2, 3 y 4). Por ejemplo, la leche humana contiene el llamado "factor bifidus" que propicia el crecimiento del *Lactobacillus bifidus* en el intestino del bebé produciendo ácido láctico que aumenta la acidez e inhibe el crecimiento de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas. El bacilo desaparece al cabo de algunos meses y lo reemplaza el *Lactobacillus acidophilus*.

Tabla 2. NECESIDADES ALIMENTICIAS DEL HOMBRE Y SU SATISFACCION POR LA LECHE Y LOS PRODUCTOS LACTEOS.

	Niño		Adulto		
	Necesidades ^a	1 l leche aporta	Necesidades ^b	1 l leche aporta	100 g. queso ^c
Energía	1,500.0 cal.	40 %	2,800.0 cal.	22 %	13 %
Proteínas	50.0 g.	70 %	70.0 g.	45 %	38 %
Calcio	0.8 g.	d	0.8 g.	d	d
Fósforo	0.8 g.	d	1.0 g.	100 %	60 %
Hierro	10.0 mg.	10 %	15.0 g.	d %	5 %
Retinol	5,000.0 U.I.	40 %	5,000.0 U.I.	40 %	30 %
Vitamina D	450.0 U.I.	5 %			
Tiamina	0.7 mg.	60 %	1.5 mg.	30 %	1.5 %
Riboflavina	1.3 mg.	d	2.5 mg.	60 %	8 %
Vitamina PP	9.0 mg.	12 %	15.0 mg.	8 %	
Ascórbico	50.0 mg.	40 %	75.0 mg.	25 %	

a Necesidades de un niño de cinco años en buen estado de salud.

b Necesidades de un adulto en buen estado de salud con un trabajo moderado.

c Queso de leche entera de pasta dura

d Más del 100%

Fuente: Alais, 1984. (2)

Tabla 3. Valor nutritivo de la leche y algunos productos lácteos. (Valores en 100 g de porción comestible; peso neto)

Producto	Energía (Kcal)	Proteínas (g)	Grasa (g)	Carbohidratos (g)	Calcio (mg)	Hierro (mg)	Tiamina (mg)	Riboflavina (mg)	Niacina (mg)	Ascórbico (mg)	Retinol (mcgEq)
Leche fresca de vaca	58	3.5	3.4	3.5	113	0.3	0.05	0.10	0.1	1	28
Leche hervida de vaca	63	3.5	3.8	3.9	113	0.3	0.04	0.09	0.1	0	17
Queso amarillo	384	34.2	26.0	2.5	829	1.7	0.06	0.61	0.1	0	280
Queso chihuahua	458	28.8	37.0	1.9	795	5.8	0.06	0.94	0.0	0	184
Queso oaxaca	317	25.7	22.0	3.0	469	3.3	0.09	0.79	0.2	0	271
Queso holandés	374	33.7	26.0	-	829	1.7	0.06	0.61	0.1	0	283

Fuente: Hernández, Chavez y Bourges, 1987. (47)

Tabla 4. Contenido de aminoácidos en la leche y algunos productos lácteos. (g. de aminoácido por 100g de proteína)

Producto	Lisina	Isoleucina	Treonina	Valina	Leucina	Triptofano	Metionina	Fenilalanina
Leche fresca de vaca	7.78	5.54	4.52	8.32	8.68	1.40	2.48	5.12
Leche pasteurizada	7.20	6.38	4.45	7.41	12.51	-	2.50	6.84
Queso Cheddar	7.48	6.86	3.79	7.32	9.05	1.39	2.65	5.47

Fuente: Hernández, Chavez y Bourges, 1987. (47)

En las tablas 2, 3 y 4 puede apreciarse que la leche es un excelente alimento para el hombre, aunque no puede cubrir todas las necesidades, con las cantidades que normalmente se ingieren. Sin embargo, suministra más sustancias alimenticias esenciales que cualquier otro alimento natural. Una ventaja más de la leche es que es uno de los alimentos más económicos para el hombre, suministrando proteínas de alto valor biológico, aún más económicas que las de la carne, el huevo y el pescado; al mismo tiempo aporta calcio y vitaminas A, B1 y B2. Tomando en cuenta los hábitos alimenticios del hombre, la leche puede considerarse un alimento "seguro y protector". Estas denominaciones se aplican también al queso.

La prevención de la contaminación de la leche es importante para su conservación. Se trata de un producto muy lábil al ataque de los microorganismos (m.o.), es por esto que existen numerosos procesos cuyo objetivo principal es prolongar el período de vida de anaquel de la leche. Para conservarla se emplea el calor por medio de la pasteurización y ultrapasteurización; y se emplean temperaturas bajas en la refrigeración y congelación. Otros procesos utilizados son la desecación para obtener productos condensados y en polvo; la adición de conservadores, la radiación y la fermentación.

Los productos lácteos fermentados se dividen en dos grupos: los quesos y las leches fermentadas. Cada grupo incluye una amplia gama de subproductos que varían en cuanto a su sabor, consistencia y composición.

Hoy en día existen métodos de conservación superiores a la fermentación, sin embargo, la importancia de los derivados lácteos fermentados radica en la variedad con que contribuyen a la dieta. De esta manera, los quesos y las leches fermentadas son importantes por los siguientes puntos:

1. Varios productos finales de la fermentación, particularmente los ácidos y los alcoholes, son inhibidores de m.o. patógenos.
2. A menudo los alimentos fermentados son más nutritivos que sus equivalentes no fermentados. La razón de esto se debe a que los m.o. no solo degradan compuestos complejos, sino que también sintetizan vitaminas y otros factores de crecimiento.
3. La fermentación produce cambios en la textura y sabor del alimento inicial. Este punto es importante, en cuanto a la aceptación de un producto, ya que mientras algunas personas no consumen leche debido a su sabor, sí aceptan los productos derivados de ellas.
4. Hay individuos que presentan intolerancia a la lactosa. Estas personas son incapaces de digerir este azúcar, por que no pueden sintetizar la enzima lactasa, la cual se requiere para degradar el azúcar de la leche. Sin embargo, en los productos lácteos fermentados, la lactosa se encuentra presente en cantidades relativamente bajas y en ocasiones es degradada por completo por medio de los m.o. seleccionados especialmente para cada producto.

2. IMPORTANCIA DEL GENERO Lactobacillus EN LA PRODUCCION DE DERIVADOS LACTEOS

Los m.o. pertenecientes al género Lactobacillus pueden ser encontrados todos los días en los productos lácteos como el yogurt, leches ácidas y quesos duros. Junto con ellos, se encuentran bacterias del género Streptococcus (S. cremoris, S. lactis, S. diacetylactis, S. thermophilus) y algunas especies de estreptococos heterofermentativos o Leuconostoc (L. cremoris, L. lactis). El valor exacto de los productos fermentados por lactobacilos en el mercado mundial es difícil de determinar, pero probablemente totaliza los 10 billones de dólares. (Tabla 5).(16)

Las razones de la gran difusión de los lactobacilos en la producción de derivados lácteos fermentados son:

1. Pueden ser cultivados en gran escala.
2. No son patógenos.
3. No producen toxinas ni sustancias tóxicas.
4. Son aerotolerantes.
5. No requieren aereación para su cultivo.
6. Resisten pH bajo.
7. Sus productos terminales de fermentación, reprimen la contaminación y deterioro ocasionado por otros m.o.
8. Fermentan diferentes fuentes de carbohidratos. (Suero de leche, ensilados, almidones, etc.)

9. Su crecimiento es rápido y abundante.
10. Los cultivos son estables y viables.
11. No forman esporas.

Estas razones justifican la realización de un estudio que recopile la información sobre el uso de los lactobacilos como cultivos iniciadoras; las condiciones necesarias para su crecimiento en medios de cultivo de laboratorio y en fermentadores industriales; las rutas metabólicas que llevan a cabo durante el proceso de fermentación; los procesos en los que intervienen y los avances que se han hecho con el fin de mejorar la producción de los derivados lácteos.

Tabla 5. CONSUMO CONTINENTAL, GLOBAL Y PER CAPITA DE PRODUCTOS LACTEOS FERMENTADOS.
(valores en 1000 toneladas métricas)

		Yogurt	Otros
Global		1,748.4	2,492.1
Continental	Norteamérica	296.3	----
	Sudamérica	61.0	21.0
	África	----	----
	Europa ^a	1,031.2	2,223.0
	India, Japón e Israel	371.8	238.1
	Australia.	24.0	----
Países^b	Alemania	6.1	1.3
	Austria	5.3	2.2
	Canadá	1.7	----
	C.E.I.	----	6.5
	Dinamarca	9.2	7.8
	E.U.A.	1.2	----
	Finlandia	8.0	27.0
	India	3.5	----
	Japón	1.0	1.7
	México	2.7	1.2
	Noruega	2.0	7.6
	Suecia	3.9	19.4

^a Incluyendo la Comunidad de Estados Independientes

^b per cápita (kg)

Fuente: Kilara y Trekl, (57)

CAPITULO II

**LACTOBACILOS COMO
MICROORGANISMOS INDUSTRIALES**

LACTOBACILOS COMO MICROORGANISMOS INDUSTRIALES

1. CARACTERIZACION MORFOLOGICA

El género *Lactobacillus* es miembro de la familia *Lactobacillaceae*. Son bacilos rectos o curvos, Gram-positivos, que no forman esporas, rara vez son móviles y pueden fermentar la glucosa. Pueden ser homofermentativos, produciendo más del 85% de ácido láctico a partir de la glucosa, o bien, heterofermentativos, produciendo ácido láctico en un 70% y el 30% restante consiste en bióxido de carbono, etanol y/o ácido acético. (117)

SUBGENEROS

El género *Lactobacillus* se divide en tres subgrupos de acuerdo a las temperaturas óptimas de crecimiento y a los productos finales de fermentación. Estos subgrupos son *Thermobacterium*, *Streptobacterium* y *Betabacterium*. Los dos primeros son homofermentativos y el último corresponde a organismos heterofermentativos.

Las especies que pertenecen a los *Thermobacterium* y *Streptobacterium* contienen la enzima fructosa-1,6-difosfato aldolasa (FDP-aldolasa), mientras que las especies de *Streptobacterium* contienen también glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y 6-fosfogluconatodeshidrogenasa (6PGDH), en el caso de las termobacterias, algunas especies contienen tanto G6PDH como 6PGDH, mientras que en otras (*L. delbrueckii*, *L. lactis* y *L. leichmanii*), estas dos enzimas están presentes en cantidades muy pequeñas o no son detectadas. (144)

Los tres subgéneros se encuentran bien definidos y en la tabla 6 se muestran las pruebas bioquímicas empleadas para clasificarlos. En la práctica, las betabacterias se distinguen de los lactobacilos homofermentativos por la producción de bióxido de carbono a partir de la glucosa. Se obtiene una confirmación posterior por el requerimiento de tiamina para su crecimiento, la ausencia de FDP-aldolasa y por la producción de manitol como producto terminal de la fermentación de fructosa. También muchos lactobacilos heterofermentativos producen amoníaco a partir de arginina.

A las cepas homofermentativas, es decir, termobacterias y estreptobacterias, para fines prácticos se les ha designado como grupos I A y I B, respectivamente. El subgénero *Betabacterium* se divide en los grupos II A y II B; este último es menos activo bioquímicamente. Dentro de cada subgrupo se encuentran clasificadas las diferentes especies de los lactobacilos. (Tabla 6). (117)

Las especies pueden diferenciarse mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas simples (Tablas 7 a 10). La determinación de los isómeros de ácido láctico formados a partir de glucosa es extremadamente útil para la identificación. La cantidad total de ácido láctico puede ser determinada por pruebas químicas y la de ácido L(+)-láctico se determina por pruebas enzimáticas, tomándose como diferencia el ácido D(-). Las cepas que no se han podido identificar a nivel especie, han sido designadas al menos, dentro del subgrupo apropiado. En algunos casos, una identificación posterior es innecesaria, pero sí debe hacerse una agrupación funcional, es decir, la detección de todas las cepas que produzcan: lama, peróxido de hidrógeno o que muestren una tolerancia extrema a la acidez o al etanol. (37)

Tabla 6. Subdivisión del género Lactobacillus.

Prueba	I Homoláctico		II Heteroláctico	
	Fermenta glucosa casi completamente (más del 85%) hasta ácido láctico (AL.)		Fermenta glucosa hasta AL. (50%) + CO ₂ + ácido acético + etanol	
CO ₂ a partir de glucosa		-		+
Requiere timina para el crecimiento		-		+
FDP-aldolasa presente		+		-
Fermenta fructosa para producir manitol		-		+
	<u>Thermobacterium IA</u>	<u>Streptobacterium IB</u>	<u>Bifidobacterium II</u>	
Crecimiento a 45 C	+	± ^a		Depende de la especie
Crecimiento a 15 C	-	+		Depende de la especie
Fermenta almidón	-	+		+ (generalmente)
CO ₂ a partir de gluconato		+		+
			IIA	II B
	<u>L. acidophilus</u>	<u>L. casei</u>		Acidófilos, toleran etanol, inactivos a la mayoría de los carbohidratos
	<u>L. helveticus</u>	<u>L. plantarum</u>		
	<u>L. bulgaricus</u>	<u>L. xylosus</u>		
	<u>L. lactis</u>	<u>L. curvatus</u>	<u>L. fermentum</u>	<u>L. hilgardii</u>
	<u>L. delbrueckii</u>	<u>L. cornificans</u>	<u>L. cellobiosus</u>	<u>L. trichodes</u>
	<u>L. salivarius</u>	<u>L. yamanashiensis</u>	<u>L. brevis</u>	<u>L. fructivorans</u>
	<u>L. jensenii</u>	<u>L. farciensis</u>	<u>L. buchneri</u>	<u>L. desulfurans</u>
		<u>L. silvaticus</u>	<u>L. vitidacens</u>	<u>L. heterohiochi</u>
	<u>L. ruminis</u>		<u>L. confusus</u>	
	<u>L. vitifinus</u>	} anaerobios		

^a

Reacción variable

Fuente: Shpea, 1983. (117)

THERMOBACTERIUM

Hay diez especies reconocidas (tabla 7), dos de ellas son anaerobias. Se ha sugerido que *L. lactis* y *L. bulgaricus* pueden ser variantes de una misma especie. La presencia de gránulos púrpuras con azul de metileno distingue rápidamente estas dos especies del *L. helveticus*. (117)

STREPTOBACTERIUM

Además de las especies clásicas *L. plantarum* y *L. casei* con sus subespecies *alactosus* y *thamnosus*, se reconocen dos subespecies más de *L. casei* que son: *L. casei* subsp. *tolerans*, un organismo termoresistente aislado de la leche pasteurizada; y *L. casei* subsp. *pseudopantarum*, que ha diferencia del *L. casei* subsp. *tolerans*, produce ácido DL-láctico. Hay cinco especies más dentro de este subgénero, pero que son menos activas que las anteriores (Tabla 8); *L. xylosus*, *L. curvatus*, *L. coryniformis*, *L. homohiochi* y *L. yamanashiensis*. (1)

BETABACTERIUM

El grupo II A contiene especies muy activas en cuanto a sus patrones de fermentación (Tabla 9). *L. fermentum* y *L. cellobiosus* están muy relacionadas. Se considera que *L. buchneri* podría ser una especie de *L. brevis*; lográndose distinguir principalmente por la fermentación de melazitosa. Existen muchas propiedades en común entre *L. viridescens* y *L. confusus*, incluyendo la formación de lama y los patrones de fermentación de azúcares, por lo que se considera que estas especies están muy relacionadas. El grupo II B (tabla 10)

Tabla 7. Características de diferenciación en las especies de *Lactobacillus* (Grupo IA).^a

Especie de <u>Lactobacillus</u>	Presencia de gránulos NH ₃ a partir de arginina	Número de ác. láctico	Hidrólisis de esculina	Requisitos de vitaminas ^b															
				Arribidulosa	Celobiosa	Galactosa	Lactosa	Maltosa	Maltitol	Melibiosa	Salicilina	Sorbitol	Sacarosa	Trehalosa	Riboflavina	Prifidoal	Ac. fólico	Triamina	n
<u>L. delbrueckii</u>	-	d	D (-)	-	-	-	w	-	d	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<u>L. leichmannii</u>	+	d	D (-)	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-
<u>L. lactis</u>	+	-	D (-)	d	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
<u>L. bulgaricus</u>	+	-	D (-)	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<u>L. helveticus</u>	-	-	DL	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	d	+	+	-	-
<u>L. acidophilus</u>	-	-	DL	+	+	+	+	+	+	-	d	+	-	+	+	+	-	+	-
<u>L. salivarius</u>	-	-	L (+) y DL	d	-	-	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	-	+	-
<u>L. jensenii</u>	-	+	D (-)	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-
<u>L. ruminis</u>	-	-	DL ^c	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
<u>L. vitulinus</u>	-	-	D (-)	+	+	+	+	+	+	-	+	+	d	+	d	-	-	-	+

^a Ninguno fermenta ribosa, estabiosa, xilosa, melicitosa; todos fermentan glucosa; +, reacción positivo; -, .. Reacción negativa; d, Reacción variable; w, Reacción débil; _ no hay datos disponibles

^b +, Requisito; -, No hay requisito.

^c Ácido meso - diamino pámico en la pared celular.

^e L(+), 85%; D(-), 5%.

Fuente: Sharpe, 1983 (117)

TABLA 8. Caracteres de diferenciación de las especies de Streptobacterium (Grupo I B).^a

Especie de <u>Lactobacillus</u>	Crecimiento a 45 ° C	Número de ác. láctico	Hidrólisis de esculina	Amigdalina	Arabinosa	Celobiosa	Glucosa	Lactosa	Maltosa	Mentol	Melazitosa	Melobiosa	Rafinosa	Ranosa	Ribosa	Xilosa	Requerimiento de vitaminas			Ac. láctico ^e
																	Pridoxal	Ac. láctico		
<u>L. casei</u> subsp. <u>casei</u>	-	L ₁ ⁽⁺⁾ ^b	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-
<u>L. casei</u> subsp. <u>ranosus</u>	+	L ₁ ⁽⁺⁾ ^b	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
<u>L. plantarum</u>	+	DL	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
<u>L. zysoua</u>	-	L (+)	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	.	.	.	-
<u>L. curvatus</u>	-	DL	+	-	-	+	+	w	+	-	-	-	-	-	+	+	.	.	.	-
<u>L. coryniformis</u>	-	DL o D (-)	-	-	-	-	+	-	+	+	-	d	d	d	-	+	.	.	.	-
<u>L. honoflochi</u>	-	D (-)	.	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	.	.	.	-
<u>L. yanasei</u> ^b	-	.	+	.	-	d	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	.	.	.	+
<u>L. fermentis</u> ^c	-	DL o L (+)	d	.	-	d	+	d	w	-	-	-	-	-	-	-	.	.	.	-
<u>L. alimentarius</u>	-	L (+)	+	.	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	.	-	.	.	.	-

^a Todos fermentan sacarosa, glucosa y manosa. +, Reacción positiva; -, Reacción negativa; d, Reacción variable; w, reacción débil; ., No hay datos disponibles.

^b Pueden formar una pequeña cantidad (1 - 5 %) de ácido D(-) láctico

^c Ninguna excepto algunas cepas de L. fermentis, produce NH₃ a partir de arginina bajo las condiciones.

^e Ácido meso-diamino plasmico en la pared celular.

Fuente: Sharpe, 1983, (117).

Tabla 9. Caracteres de diferenciación de las especies de *Bifidobacterium* (Grupo II A).^a

Especie de <u>Lactobacillus</u>	Crecimiento a 15° C.	Crecimiento a 45° C.	NH ₄ a partir de arginina	Lama a partir de sacarosa	Hidrolisis de succina	Amígdalina	Arabinosa	Celobiosa	Manitol	Melazitosa	Melobiose	Rafinosa	Xilosa	Requisierientos de vitaminas	
														Riboflavina	Acido fólico
<u>L. fermentum</u>	-	+	+	-	-	-	d.	-	-	-	+	+	d.	-	-
<u>L. cellulosus</u>	±	±	±	-	+	+	+	+	-	-	+	+	d.	-	+
<u>L. brevis</u>	+	-	+	-	d.	-	+	-	±	-	+	±	d.	-	+
<u>L. buchneri</u>	+	-	+	-	d.	-	+	-	±	+	+	±	d.	d.	+
<u>L. vitifecans</u>	+	-	-	d.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<u>L. confusus</u>	+	+	d.	+	+	+	±	+	-	-	-	-	+	d.	+

^a Todos fermentan almidón, meliños y fructosa. Ninguno fermenta ramosa ni sorbitol.
Misma leyenda de la Tabla 7.

Fuente: Shaper, 1983. (117)

Tabla 10. Caracteres de diferenciación de las especies de *Bacteroides* (Grupo II B).^a

Especie de <u>Lactobacillus</u>	Crecimiento a 15 C.	Crecimiento a 25 C.	Crecimiento en etanol 15%	Crecimiento a pH < 4	Arabinosa	Fructosa	Glucosa	Maltosa	Ribosa	Xilosa	Desasimilación	
											Malato	Citrato
<u>L. nigridi</u> ^b	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ ^c	+
<u>L. nicholsoni</u>	w	+	+ ^b	+	-	+	+	d	.	-	+ ^c	-
<u>L. fuchsinus</u> ^b	-	+	+	+	-	+	w	d	-	-	+ ^c	-
<u>L. desulfonius</u>	+	+	+	+	+	w	w	-	.	-	+ ^c	d
<u>L. heterochi</u>	.	+	+	.	-	+	+	-	+	-	.	.

a Ninguno crece a 45 C; ninguno fermenta arribidina, celobiosa, lactosa, manitol, melcoziosa, rafinosa, ramnosa, salicina, sorbitol, ni trehalosa; no hidrolizan esculina. Leyendas de la tabla 7

b Crece en grandes cantidades estimulado por CO₂ por el aislamiento inicial.

c Desasimilan malato, particularmente a pH menor de 3.8.

d El etanol es un gran estimulante para el crecimiento, muchas cepas sólo crecen en pequeñas trazas sin él.

Fuente: Sharpe, 1963 (177)

comprende especies inertes a la mayoría de los carbohidratos, capaces de crecer a pH menores de 3.2 y son tolerantes a los ácidos orgánicos y al etanol. Han sido menos estudiados que los otros géneros y están presentes en habitats más restringidos.

(37, 144)

La clasificación de las especies dentro de los tres subgéneros debe ser confirmada posteriormente y por datos genotípicos. La mayoría de los estudios taxonómicos confirman la identidad de las especies de Lactobacillus como se muestra en las tablas 6 - 10; es decir, todas las cepas de una especie reaccionan de la misma forma y muestran las mismas características. Sin embargo, en algunos casos se ha demostrado que una especie fenotípicamente homogénea contiene más de un genotipo. (28, 103)

2. CARACTERIZACION POR DETERMINANTES ANTIGENICOS

Los estudios serológicos en lactobacilos han mostrado que muchas cepas pueden clasificarse dentro de siete grupos basados en determinantes antigénicos específicos. Como se muestra en la tabla 11, los polisacáridos liberados en esta determinación y que son responsables de la especificidad de los grupos A - F, son de tres tipos: polisacáridos de la pared celular, ácidos teicoicos de la pared celular y ácidos teicoicos de la membrana celular. (109)

La separación de los lactobacilos en diferentes grupos serológicos ha sido una confirmación útil de las especies caracterizadas fisiológicamente.

Tabla 11. ANTIGENOS DEL GENERO *Lactobacillus*.

Especie	Grupo	Antígeno	Localización	Determinante
<i>L. helveticus</i>	A	AGT	Pared-membrana	Alfa-Glc
<i>L. casei</i>	B	Polisacárido	Pared	Alfa-Rha
<i>L. casei</i>	C	Polisacárido	Pared	Beta-Glc
<i>L. plantarum</i>	D	ATR	Pared	Alfa-Glc
<i>L. lactis</i>	E	AGT	Pared	
<i>L. bulgaricus</i>	E	AGT	Pared	
<i>L. brevis</i>	E	AGT	Pared	
<i>L. buchneri</i>	E	AGT	Pared	
<i>L. fermentum</i>	F	AGT	Membrana	Alfa-Gal
<i>L. salivarius</i>	G	---	---	---

■ AGT, ácido glicero-teicoico; ATR, ácido ribito-teicoico; Glc, D-glucosil; Rha, L-rhamnosil; Gal, D-galactosil.
Fuente: Sharpe, 1983 (117)

3. RELACIONES GENOTÍPICAS

DETERMINACION DE LA COMPOSICION DEL ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO DE LOS LACTOBACILOS

Los estudios sobre la composición del ADN de los lactobacilos permiten una mejor identificación de las especies y la confirmación de los grupos genotípicos. La diferencia en el contenido Guanina y Citocina (G + C) indica que los organismos no se relacionan entre sí, sin embargo, la similitud o igualdad en este contenido, no significa necesariamente que las cepas se relacionen. En el caso de los lactobacilos, al determinarse la composición de las bases del ADN se han confirmado las especies fenotípicas.

En la tabla 12 se muestra una recopilación del contenido G + C en los lactobacilos.

Las especies de *Thermobacterium* se pueden dividir en dos grupos; uno con un contenido G + C del 34 - 38 mol %; el otro con un contenido más alto, 48 - 50 %. De éstas últimas especies, tres (*L. leichmanii*, *L. lactis* y *L. delbrueckii*) comprenden el grupo de homofermentativos obligados. La mayoría de las estreptobacterias tienen valores entre 39 y 46 mol %. *L. yamanashiensis*, que taxonómicamente no se puede clasificar dentro de alguno de los tres subgéneros, fenotípicamente es una estreptobacteria. En cuanto a las betabacterias, *L. fermentum* y *L. cellobiosus*, especies que se encuentran en habitats animales, tienen valores más altos que el resto de las especies heterofermentativas.

(117)

Tabla 12. COMPOSICION MEDIA DEL ADN DE LOS LACTOBACILOS.
(Mol% G + C)

Homofermentativos		Heterofermentativos		Homofermentativos	
<i>Thermobacterium</i>		<i>Betabacterium</i>		<i>Streptobacterium</i>	
<i>L. salivarius</i>	34.7	<i>L. fructivorans</i>	39.4	<i>L. yamanashiensis</i>	32.0
<i>L. jensei</i>	36.1	<i>L. hildergii</i>	40.3	<i>L. xylosus</i>	39.4
<i>L. acidophilus</i>	37.6	<i>L. confusus</i>	41.0	<i>L. curvatus</i>	43.9
<i>L. helveticus</i>	39.3	<i>L. trichodes</i>	42.7	<i>L. corvniiformis</i>	45.0
<i>L. bulgaricus</i>	50.3	<i>L. viridescens</i>	37-42	<i>L. plenterum</i>	45.0
<i>L. lactis</i>	50.3	<i>L. brevis</i>	42-46	<i>L. homohiochi</i>	46.0
<i>L. delbrueckii</i>	50.0	<i>L. buchneri</i>	44.3	<i>L. casei</i>	46.4
<i>L. ruminis</i>	43.7	<i>L. fermentum</i>	53.4		
<i>L. vitulinis</i>	34-37	<i>L. cellobiosus</i>	53.1		

Fuente: Sharpe, 1983. (117)

4. HABITATS

Los lactobacilos tienen requerimientos nutricionales muy complejos, necesitan de la suplementación de carbohidratos, amoniácidos, péptidos, ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos, sales, derivados de ácidos nucleicos y vitaminas. Su metabolismo generador de trifosfato de adenosina (ATP) es fermentativo y produce grandes cantidades de ácido láctico y otros productos.

Los lactobacilos crecen en una gran variedad de habitats, las diferentes especies se han adaptado para crecer en diversas condiciones ambientales.

Entre los habitats donde se desarrollan estos m.o. se encuentran la cavidad oral y el tracto intestinal del hombre y algunos animales formando parte de la flora microbiana normal; y en la vagina de la mujer.

Además, los lactobacilos se desarrollan en una gran cantidad de alimentos como son la leche y sus derivados, en donde pueden aparecer sin provocar efecto alguno, o bien, ocasionar reacciones deseables o indeseables; esto es, pueden obtenerse nuevos productos como leches fermentadas (yogurt, yakult, etc.) y quesos; o en caso contrario, pueden deteriorar el alimento. Lo mismo sucede en el caso de las carnes y productos cárnicos, en los vegetales y ensilados, en los jugos de frutas, y en una amplia variedad de bebidas alcohólicas fermentadas como vino, sidra, cerveza y bebidas de granos.

5. AISLAMIENTO

Cuando se va a utilizar un medio de aislamiento para lactobacilos deben tomarse en cuenta su naturaleza acidófila y sus requerimientos nutricionales. Todos los medios deben contener factores de crecimiento adecuados, que usualmente incluyen extracto de levadura, peptona, vitaminas, manganeso, acetato y con frecuencia Tween 80 como estimulante. Para favorecer el crecimiento, el pH debe ajustarse entre 4.5 y 6.2.

MEDIOS DE CULTIVO

Cuando los lactobacilos son la flora mayoritaria, puede utilizarse el medio no selectivo MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) cuya composición se da a continuación: (29)

AGAR MRS NO SELECTIVO PARA AISLAMIENTO DE LACTOBACILOS

Peptona oxoide	10 g.
Extracto de carne	10 g.
Extracto de levadura	5 g.
K_2HPO_4	2 g.
Citrato de diamonio	2 g.
Glucosa	20 g.
Tween 80	1 g.
Acetato de sodio	5 g.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.58 g.
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.28 g.

Ajustar el pH de 6.7 a 7.0. Distribuir el medio en cantidades convenientes y esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Cuando los lactobacilos se encuentran junto con otros organismos se requiere de un medio de cultivo selectivo. El más utilizado es el medio de acetato SL. La acción selectiva se basa en un pH bajo, 5.4; en una alta concentración de iones de acetato (inhibidores de muchos organismos) y en la presencia del Tween 80 como estimulante del crecimiento. (108)

MEDIO SELECTIVO SL PARA EL AISLAMIENTO DE LACTOBACIOS

Para un litro de medio:	
BBL tripticasa	10 g.
Extracto de levadura	5 g.
K_2HPO_4	6 g.
Citrato de diamonio	2 g.
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.58 g.
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.28 g.
Glucosa	10 g.
Arabinosa	5 g.
Sacarosa	5 g.
Tween 80	1 g.
Acetato de sodio $\cdot 3H_2O$	2.5 g.
Acido acético glacial (para ajustar el pH a 5.4)	99.5%
Agar	15 g.

Para el aislamiento de lactobacilos que crecen en la cavidad oral y en el tracto Intestinal se utiliza el medio SL. En algunas ocasiones pueden crecer bifidobacterias y estreptococos, por lo que debe hacerse una identificación posterior de las colonias desarrolladas.

El medio SL también se utiliza para aislar lactobacilos de la leche, el queso y muchas leches fermentadas. Algunas especies de Leuconostoc y pediococos encontrados con frecuencia en la leche y queso, no son inhibidas y las colonias deben ser identificadas. El medio SL puede no ser óptimo para el aislamiento selectivo a partir del yogurt, para el que se ha utilizado con éxito al agar M16 ajustando el pH a 5.6 con ácido acético 1.0 M.
(108, 130)

Para aislar *L. viridescens* y otros lactobacilos en la carne, suele utilizarse el medio APT más por tradición que por necesidad. También puede usarse el medio MRS agregando acetato taloso al 0.1 % y ajustando el pH a 5.5, o medio SL con el pH ajustado a 5.8. En el caso de las bebidas fermentadas, el medio depende del tipo de producto del que se trate. Por ejemplo, para aislar lactobacilos de crecimiento en los vinos, un medio a base de jugo de tomate como estimulante de crecimiento es el adecuado. En las sidras se utiliza un medio a base de jugo de manzana y para las cervezas se usa el medio de agar-sacarosa. (117).

La mayoría de los lactobacilos crecen mejor, ya sea anaeróbicamente, o en la presencia de una tensión elevada de CO₂, particularmente durante el primer aislamiento. Las placas de agar deben incubarse bajo una atmósfera del 90% de H₂ + 10 % CO₂. La superficie de las placas debe cuidarse de tal modo que puedan ser observados los diferentes tipos de colonias si es que están presentes, los cuales indican con frecuencia la presencia de más de una especie o genotipo. (55)

Cuando se utilizan medios selectivos, en particular el medio SL, se debe tener cuidado de no secar por mucho tiempo las placas pues la concentración de acetato en la superficie del agar podría inhibir a los lactobacilos.

Los lactobacilos aislados de animales y de algunos productos lácteos se incuban a 37°C y de otros habitats a 30°C, o a 22°C cuando las fuentes son de baja temperatura.

6. CULTIVO Y MANTENIMIENTO

CULTIVO

Una vez aislado, a menos de que existan requerimientos especiales, muchas especies de lactobacilos pueden ser cultivadas en caldo MRS o mantenerse por periodos cortos en agar MRS inclinado. Para lactobacilos anaerobios debe agregarse un 0.05% de cisteína. El medio debe ser calentado antes de utilizarse y cultivar los organismos bajo el 90 % H₂O + 10 % CO₂. Para algunas especies, en particular las heterofermentativas, se da un mejor crecimiento, con otros carbohidratos además de glucosa, como maltosa o fructosa.

CONSERVACION DE CULTIVOS

Las cepas pueden conservarse de 3 a 6 meses en el medio leche-levadura-glucosa-tornasol (YGLM) + carbonato de calcio. Se utiliza leche en polvo descremada reconstituida o leche descremada fresca a la que se le agrega indicador tornasol en una concentración final del 0.01%, extracto de levadura al 0.2%, glucosa al 1%, extracto de hígado al 0.25% y carbonato de calcio al 5%. Se llenan tubos con 10 ml y se esterilizan a 121°C por 10 minutos. Antes de utilizarse se debe revisar la esterilidad de los tubos durante una semana. (14)

SECADO POR CONGELACION

Se han sugerido varios métodos para liofilizar bacterias ácido lácticas adicionando varios agentes protectores para las células. El método más utilizado consiste en resuspender los paquetes celulares centrifugados (que se obtienen de caldos de cultivo con crecimiento abundante); en 1 ml de suero estéril de caballo que contenga 7.5% de glucosa. Esto se seca por congelamiento y las ampolletas obtenidas se sellan al vacío y se almacenan a 6 - 10°C. Esta técnica es excelente para conservar las cepas, pues muchas llegan a ser viables aún después de 10 - 20 años; aunque otras requieren de una reofilización más frecuente. (92)

CAPITULO III

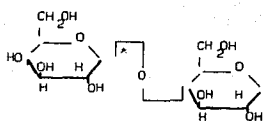
**ACTIVIDAD BIOQUIMICA
DE LOS LACTOBACILOS**

ACTIVIDAD BIOQUÍMICA DE LOS LACTOBACILOS

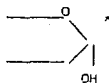
La actividad bioquímica del género *Lactobacillus* consiste en la fermentación de la lactosa hasta su conversión en ácido láctico. Este proceso puede llevarse a cabo siguiendo dos rutas diferentes, dependiendo de la especie de lactobacilo. Estas rutas son la fermentación homoláctica y la fermentación heteroláctica. Ambos procesos difieren en la cantidad de producto final obtenido, ya que la ruta metabólica de cada uno es diferente.

La lactosa es el único glúcido libre que existe en cantidad importante en todas las leches (50 g/l en leche de vaca), es también el componente soluble más abundante, el más simple y el más constante en proporción. Además, es el componente de la leche más lábil frente a la acción microbiana, esto quiere decir que la leche es presa fácil de bacterias de diversos tipos que transforman la lactosa en ácido láctico y en otros ácidos alifáticos. (2).

La lactosa, $C_{12}H_{22}O_{11}$, o O-Beta-D-galactopiranosil-(1-4)-Beta-D-glucopiranosido; es un disacárido reductor de peso molecular 342 u.m.a y sabor dulce débil. Existe en dos formas isoméricas, alfa y beta que se distinguen únicamente por la posición de un grupo oxhidrilo (-OH) en el carbono 1 (C-1) de la glucosa.



Beta - lactosa



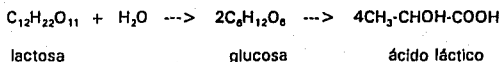
Alfa - glucosa

* C 1

La lactosa está formada, por lo tanto, por la unión de una molécula de Beta-galactosa y una molécula de glucosa alfa o beta. El grupo aldehído de la primera está unido al enlace y el de la segunda está libre en su forma enólica.

La lactosa puede fermentarse por rutas bioquímicas muy diversas; en estos procesos, el azúcar es utilizado como fuente energética por diferentes m.o. La importancia bioquímica de la degradación de este carbohidrato es de dos tipos: primero, proporciona a la célula energía que se produce durante el rompimiento del azúcar para formar compuestos de menor contenido energético. Esta energía se produce en forma de enlaces altamente energéticos, principalmente en el enlace fosfato terminal del ATP. Segundo, como resultado de este rompimiento, la célula se enriquece de compuestos de carbono que sirven para la síntesis de sustancias que se canalizan al metabolismo del m.o.

Este capítulo se relaciona con los mecanismos involucrados en la obtención de los productos de fermentación de los lactobacilos, en específico, con la obtención del ácido láctico a partir de lactosa. Esta fermentación tiene el siguiente esquema teórico:



HIDROLISIS Y TRANSPORTE DE LOS AZUCARES

Antes de ser asimilada, la lactosa es hidrolizada extracelularmente por la acción de la enzima lactasa o Beta - galactosidasa hasta formar glucosa y galactosa. Un mecanismo propuesto para la acción de esta enzima se muestra en la figura 1. (131, 142)

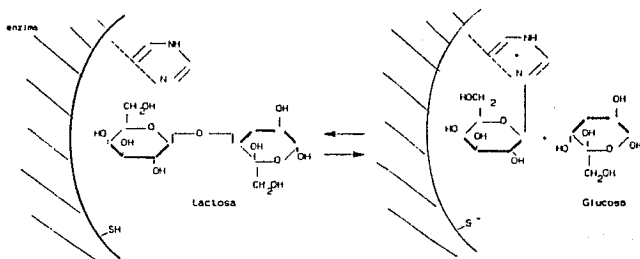


Figura 1. Mecanismo enzimático de la hidrólisis de lactosa. (142)

El grupo sulfhidrido actúa como ácido al protonar el oxígeno glucosídico, y el grupo imidazol actúa como nucleófilo al atacar al C-1 de la galactosa. Se ha propuesto la existencia de un intermediario covalente que es el enlace carbono-nitrógeno. Para remover la galactosa, el anión sulfhidrido (S⁻) actúa como base para sustraer un protón del agua que ayuda al ataque de un grupo oxhidrilo (-OH) en la posición 1. (Figura 2).

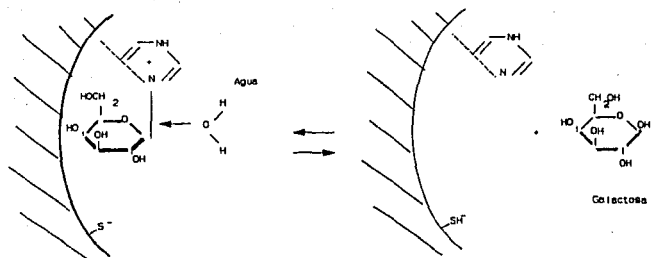


Figura 2. Mecanismo de liberación de la galactosa. (142)

Después, para que los azúcares sean metabolizados, deben pasar el citoplasma de la célula. Esto requiere de un mecanismo de transporte altamente especializado. La galactosa, glucosa y lactosa poseen un sistema de transporte específico para cada uno, que es inducido por el sustrato.

Para la glucosa y lactosa, el transporte es por medio de **fosfotransferasas**, que requieren de fosfoenolpiruvato (intermediario en el metabolismo de la glucosa), e introducen y fosforilan los azúcares, siendo entonces hidrolizados para seguir con la ruta metabólica.

Para la galactosa existen dos mecanismos de transporte que son; uno por medio de **fosfotransferasa** y el otro es el sistema **adenosin-5'-trifosfato-permeasa energizada**. (91)

En este punto los azúcares empezarán a ser metabolizados. La glucosa es degradada por la ruta de la glucólisis de Embden-Meyerhof (EM) hasta obtener ácido láctico. Este es el proceso de la fermentación homoláctica.

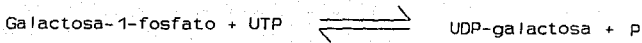
La galactosa se incorpora al ciclo de la glucólisis después de su fosforilación, lo que requiere de ATP, en una reacción catalizada por galactoquinasa:



La D-galactosa-1-fosfato se epimeriza en el C-4, es decir, se convierte en D-glucosa-1-fosfato. Esto sucede a través de una serie de reacciones que requieren de trifosfato de uridina (UTP) como coenzima. La reacción global es:

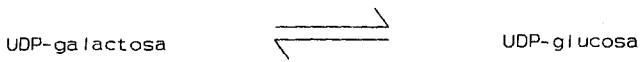


Las reacciones suceden de la siguiente manera; la D-galactosa-1-fosfato se transforma en UDP-galactosa por medio de la UDP-galacto-fosforilasa que requiere de UTP para su activación:

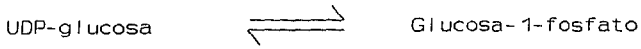


P = grupo fosfato ($-\text{O}-\text{PO}_3$)

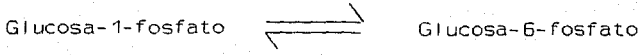
La UDP-galactosa se convierte en su epímero UDP-glucosa por medio de la **UDP-glucosa-epimerasa**:



El UDP es liberado y la glucosa se fosforila en el C-1, con la intervención de la enzima **UDP-glucosa-1-fosforilasa**:



Para que la glucosa-1-fosfato se incorpore al mecanismo de degradación de la glucosa debe pasar por una mutación en la que el grupo fosfato del C-1 pase al C-6. Esta reacción es catalizada por la **fosfoglucomutasa**:



La molécula de glucosa es degradada por una serie de reacciones

enzimáticamente catalizadas, generalmente, después de la incorporación de fosfato inorgánico, hasta obtener moléculas más pequeñas. En el transcurso de estas reacciones se produce energía en forma de ATP que se utiliza en reacciones de síntesis subsecuentes que lo requieran.

FERMENTACION HOMOLACTICA

La ruta de la glucólisis EM (Figura 3) consta de 10 enzimas que provocan la conversión de la glucosa en ácido pirúvico. Este proceso puede ser aerobio o anaerobio; aeróbicamente se lleva a cabo junto con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Anaeróbicamente, como es el caso de los lactobacilos, el piruvato debe ser reducido enzimáticamente hasta la formación de lactato. Los detalles de esta secuencia serán considerados ahora.

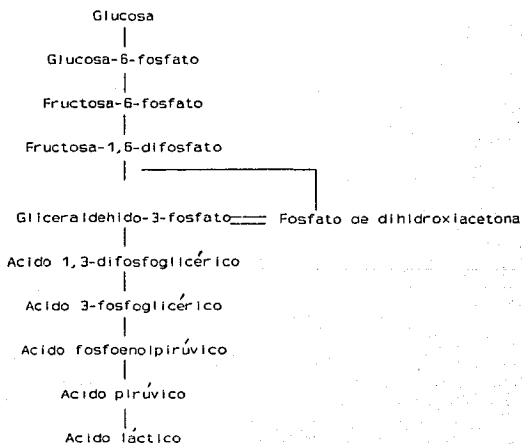
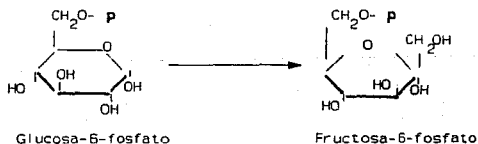


Figura 3 Ruta glucolítica EM para la degradación de la glucosa (74)

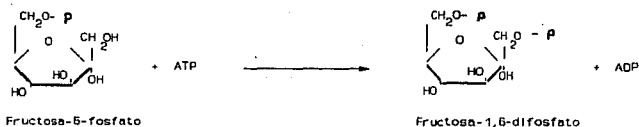
Inicialmente, la glucosa debe ser fosforilada en el C-6. Las bacterias aerobias emplean la enzima hexoquinasa que requiere Mg^{+2} para activarse, utilizando un mol de ATP. Los organismos facultativos (lactobacilos) llevan a cabo la fosforilación de la glucosa durante el transporte hacia el interior de la célula.



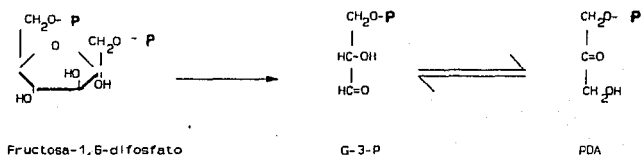
Sigue una isomerización de la glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato, catalizada por la glucosa-fosfato isomerasa.



Después se introduce un segundo grupo fosfato en el C-1 de la fructosa por la acción de la fosfofructoquinasa que requiere de ATP y Mg^{+2} . Hasta este punto de la glucólisis se han utilizado dos moles de ATP.



En el siguiente paso, la molécula de sustrato es dividida por la **fructosa-difosfato aldolasa** en dos unidades de 3 carbonos; los fosfatos de triosa: **gliceraldehído-3-fosfato (G-3-P)** y el fosfato de **dihidroxiacetona (PDA)**.



Los fosfatos de triosa se producen en cantidades equivalentes, pero debido a la acción de la **fosfato-triosa isomerasa** que cataliza su conversión, se establece un equilibrio que favorece en un 95% al fosfato de dihidroxiacetona. El rompimiento del azúcar ocurre de tal forma que el fosfato de dihidroxiacetona se derivará de los átomos de C-1, 2 y 3 y el gliceraldehído-3-fosfato de los átomos 4, 5 y 6 de la molécula.

A pesar de el hecho de que el equilibrio de la enzima favorece al fosfato de

dihidroxiacetona, el gliceraldehído-3-fosfato es el sustrato para el siguiente paso de la glucólisis; una oxidación que da lugar a la formación de el ácido 1,3-difosfoglicérico. La enzima responsable, gliceraldehído-fosfato deshidrogenasa, requiere de adenosinodinucleótido (NAD^+) y fosfato inorgánico que se incorpora al producto, formándose un enlace de alta energía.



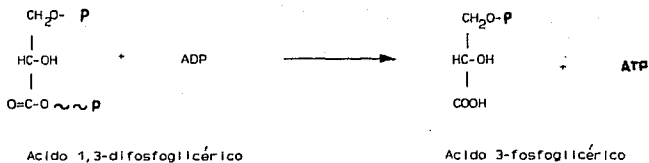
Gliceraldehído-3-fosfato

Ácido 1,3-difosfoglicérico

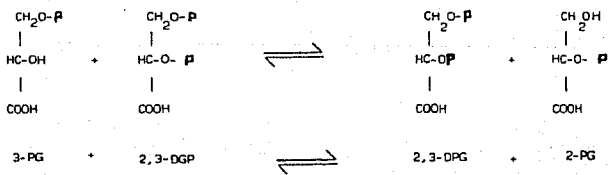
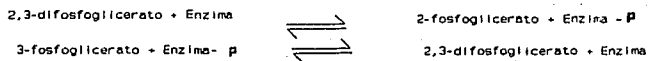
($\sim \sim$ = Enlace de alta energía)

El NADH debe ser oxidado; aeróbicamente ocurre mediante el sistema citocrómico. Anaeróbicamente (lactobacilos), esto ocurre junto con la reducción de un compuesto orgánico, es decir, en la conversión de piruvato a lactato.

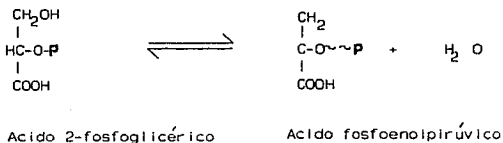
La siguiente reacción es la transferencia de un grupo fosfato al ADP por la acción de la fosfoglicerato quinasa, produciendo 3-fosfoglicerato. En este caso, también se requiere de Mg^{+2} como cofactor de la enzima. Este es el primer paso donde se produce energía en el proceso de la glucólisis.



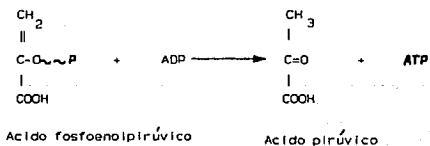
El 3-fosfoglicerato (3-PG) es convertido ahora en 2-fosfoglicerato (2-PG) por la acción de la enzima fosfoglicero-mutasa. Esta reacción requiere de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) en pequeñas cantidades y se cree que el mecanismo involucra un intermediario fosforilado de la enzima.



El paso que sigue consiste en la eliminación de agua para producir ácido fosfoenolpirúvico mediante la intervención de la enzima **enolasa** que requiere un ion metálico divalente, como Mg^{+2} , Mn^{+2} o Zn^{+2} .



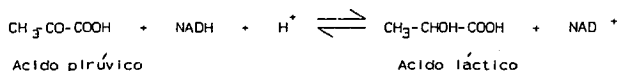
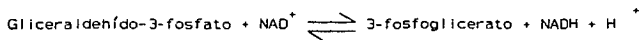
El propósito de la deshidratación es producir otro enlace fosfato de alta energía, en este caso, **enol**fosfato que es transferido al ADP por la enzima **piruvato quinasa**. De esta forma la energía producida en la deshidratación se acopla a la síntesis de otra molécula de ATP; éste es el segundo paso donde se produce energía durante la glucólisis.



Ya que cada molécula de fructosa-1,6-difosfato da lugar a dos fosfatos de triosa, se producirán cuatro moléculas de ATP por cada mol de fructosa-difosfato fermentado. Como se utiliza un mol de ATP para la fosforilación de la glucosa y otro para

la fosforilación de la fructosa-6-fosfato, el rendimiento neto es de dos moles de ATP por mol de glucosa fermentado.

El derivado del ácido pirúvico obtenido al final del proceso varía dependiendo de la especie de organismo y de las condiciones ambientales. Las bacterias homolácticas producen dos moles de ácido láctico por mol de glucosa fermentado. La enzima involucrada en la reducción del piruvato, la lactato deshidrogenasa, utiliza NADH que se produce en la reacción de la fosfato-triosa-deshidrogenasa, permitiendo la oxidación anaeróbica del gliceraldehído-3-fosfato. Las reacciones que se llevan a cabo son:



Un punto importante del mecanismo de la fermentación homoláctica es que el rompimiento de la fructosa-1,6-difosfato ocurre de tal manera que los grupos carboxilos de las moléculas de piruvato resultantes derivan de los C-3 y C-4 de la molécula de la glucosa original. Por lo tanto, los grupos carboxilo del lactato se derivarán de los carbonos 3 y 4.

Algunas especies de lactobacilos producen ácido D(-) láctico, mientras que otras producen una mezcla racémica de los ácidos D(-) y L(+) láctico. Hay dos factores que

parecen determinar el tipo de ácido láctico producido:

1. La estereoespecificidad de la lactato deshidrogenasa involucrada.
2. La presencia o ausencia de lactato racemasa.

Aunque la estereoespecificidad de la lactato deshidrogenasa puede determinar el tipo de ácido producido por la mayoría de las bacterias; en algunos casos hay una enzima presente que cataliza la racemización de los isómeros del ácido láctico.

En la figura 4 se muestra un esquema completo de la fermentación homoláctica.

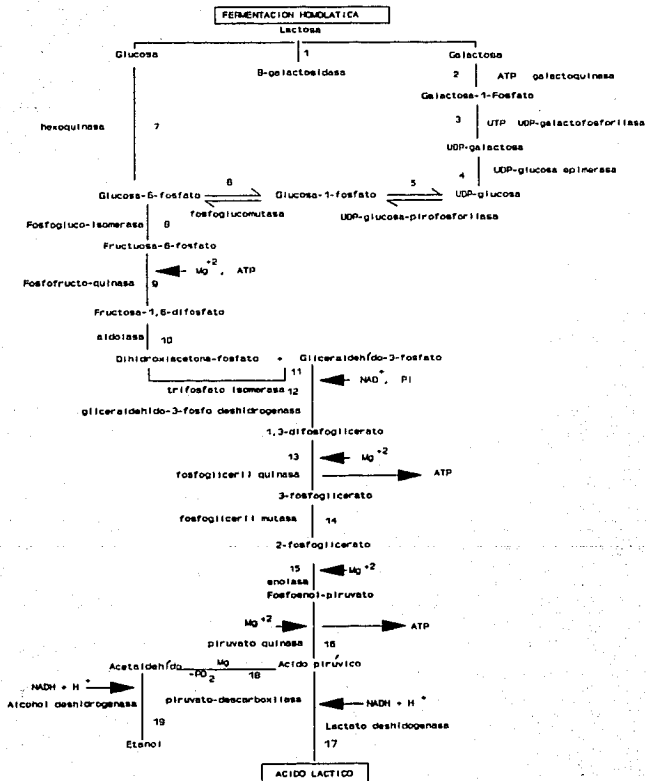
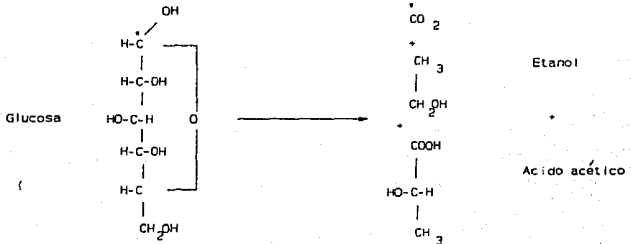


Figura 4. Fermentación homoláctica. (91)

NOTA: La numeración indica el orden en que las reacciones son llevadas a cabo

FERMENTACION HETEROLACTICA

Algunas especies de lactobacilos, bajo condiciones normales y otras en condiciones especiales únicamente, son capaces de producir otros compuestos además de ácido láctico en una fermentación heteroláctica, esto principalmente en presencia de galactosa. (91)

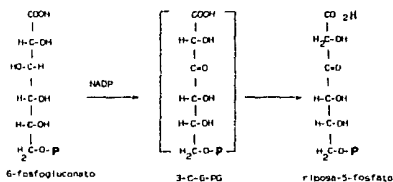


Los principales productos en la fermentación heteroláctica de la lactosa por los lactobacilos son: ácido láctico, bióxido de carbono, etanol y/o ácido acético. (74)

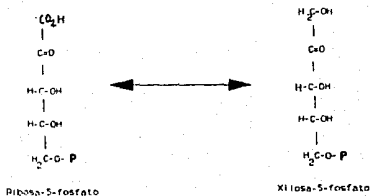
Como se mencionó antes, al primer paso de la fermentación es la hidrólisis de la lactosa para formar glucosa y galactosa que son transportados al interior de la célula. La galactosa es transformada en glucosa que posteriormente sufre una fosforilación para

obtener glucosa-6-fosfato.

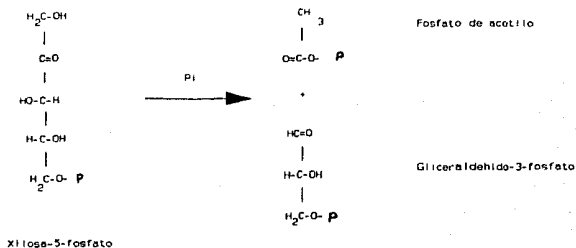
A partir de la formación de este compuesto se lleva a cabo la fermentación heteroláctica. La glucosa-6-fosfato es oxidada por medio de la **6-fosfogluconato deshidrogenasa** (6-fosfogluconato: NADP óxido-reductasa [descarboxilante]) para formar D-ribulosa-5-fosfato y bióxido de carbono. La enzima requiere NADP (fosfato de adenosin dinucleótido) como cofactor, formándose como intermediario inestable el 3-ceto-6-fosfogluconato (3-C-6-PG).



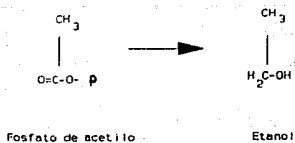
La D-ribulosa-5-fosfato es epimerizada en el C-3 mediante la enzima **D-ribulosa-5-fosfato-3-epimerasa** convirtiéndose en D-xilulosa-5-fosfato.



La siguiente reacción es el rompimiento de la D-xilulosa-5-fosfato por la enzima **fosfocetolasa** (D-xilulosa-5-fosfato:D-gliceraldehído-3-fosfato liasa [fosfato acetilante]), que requiere fosfato inorgánico para producir fosfato de acetilo y gliceraldehído-3-fosfato.



El fosfato de acetilo es reducido hasta etanol, usando electrones removidos durante la oxidación de la glucosa-6-fosfato.



El gliceraldehído-3-fosfato es metabolizado hasta ácido láctico siguiendo las reacciones de la ruta EM. (Figura 4).

En la fermentación heteroláctica de la glucosa, se genera ATP durante la oxidación del gliceraldehído-3-fosfato y en la reacción de la piruvato-quinasa. Ya que se requiere de un ATP para la fosforilación de la glucosa, el rendimiento neto de energía en este proceso es de un mol de ATP.

En la figura 5 se da un esquema sintetizado de la fermentación heteroláctica.

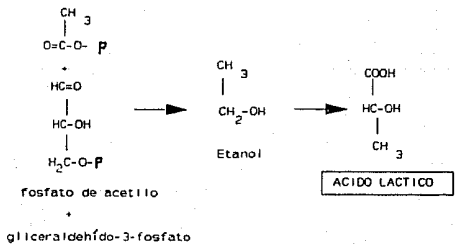
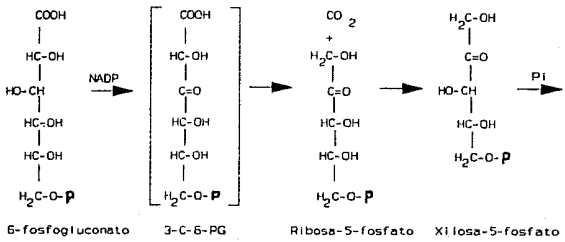
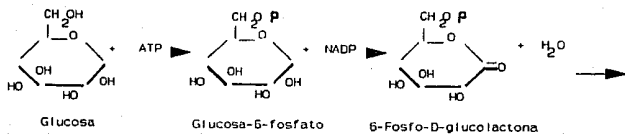


Figura 5. Ruta de la fermentación heteroláctica de la lactosa. (77)

CAPITULO IV

PROCESOS INDUSTRIALES

1. LACTOBACILOS COMO CULTIVOS INICIADORES

Los cultivos iniciadores son cepas seleccionadas de m.o. que se agregan intencionalmente a la leche con el fin de generar cambios en su apariencia, cuerpo, textura y sabor.

La función principal de un cultivo iniciador es la producción de ácido y como funciones secundarias tiene la coagulación de la leche, expulsión de la humedad, formación de textura, inicio de la producción de sabor, impartir un sabor placentero, protección en contra de patógenos y dar al producto una mayor vida de anaquel.

En base a estas funciones, puede hacerse una lista de las características deseables de un cultivo iniciador: (24)

1. Encontrarse en estado viable, intacto y en suficiente cantidad para el proceso de manufactura.
2. Seleccionarse en base al grado de acidez deseada de acuerdo al rango de temperaturas de elaboración del producto.
3. Seleccionarse en base a su resistencia al ataque de bacteriófagos.
4. Emplear cepas compatibles, porque algunas de ellas pueden ser dominantes cuando se usan mezcladas con otras, debido a que producen antibióticos o bacteriocinas.

PREPARACION DE LOS CULTIVOS INICIADORES DE USO COMERCIAL

Antes de inocular la leche que se va a fermentar, el cultivo que se empleará debe ser preparado siguiendo un orden ya establecido: (figura 6)

- a) **CULTIVO PRINCIPAL:** Cultivo comercial de laboratorio, liofilizado o conservado en nitrógeno líquido.
- b) **CULTIVO MADRE:** Cultivo en leche, incluyendo el inóculo sucesivo obtenido del cultivo principal.
- c) **CULTIVO INTERMEDIO:** Obtenido en cantidades considerablemente grandes a partir del cultivo madre.
- d) **CULTIVO INICIADOR:** Cultivo en leche utilizado en la manufactura del producto.

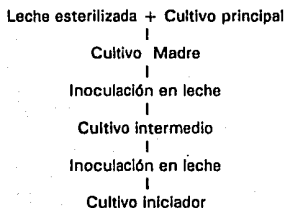


Figura 6. Diagrama de la preparación del cultivo iniciador. (11)

ASPECTOS BIOLÓGICOS ENTRE LA ASOCIACIÓN DE CULTIVOS INICIADORES

Los m.o. seleccionados como iniciadores de una fermentación, pueden emplearse como cultivos combinados o sencillos, constituidos por una sola cepa; o cultivos mixtos de cepas de una sola especie. Cuando estos organismos crecen juntos, hay una asociación simbiótica, es decir, uno estimula la actividad metabólica del otro. Los resultados de este crecimiento se ven reflejados en un desarrollo más rápido de ácido láctico, mejoramiento del sabor, mayor número de células, agotamiento más extenso de los carbohidratos y textura más deseable en el producto final.

Esta simbiosis se debe a la acumulación de metabolitos en la leche durante la fermentación. Estos metabolitos han sido divididos en tres grupos:

1. METABOLITOS QUE REGULAN EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS.

Este tipo de metabolitos incluye compuestos que influyen en el crecimiento de los m.o. Los más importantes son:

- a) Acido láctico: Cuando se elabora yogurt, el desarrollo del *S. thermophilus* se va haciendo lento a medida que se acumula el ácido láctico, mientras que el crecimiento del *L. bulgaricus* va en aumento y luego disminuye cuando el pH es de 4.4.

- b) Peróxido de hidrógeno: *L. bulgaricus*, *L. lactis* y *L. helveticus* pueden producir hasta 15 ppm de H₂O₂, que al encontrarse en el producto final, inhibe el crecimiento de contaminantes microbianos durante el almacenamiento.
- c) D-Leucina: Es liberado por varias especies de estreptococos. Los aminoácidos y péptidos liberados, ejercen acciones simbióticas sobre los cultivos iniciadores.
- d) Acido fórmico: Producido por el *S. thermophilus* durante la elaboración de yogurt; controla el crecimiento del *L. bulgaricus*. En presencia de este ácido, la relación entre ambos m.o. varía de 1:2 a 1:1, que es el rango considerado como óptimo.

2. METABOLITOS QUE EJERCEN EFECTOS ANTIBIOTICOS Y BACTERICIDAS

Algunos m.o. sintetizan compuestos que poseen propiedades antibióticas; a estas sustancias se les conoce con el nombre de bacteriocinas, y algunas son: (11)

- Nisina del *S. lactis*
- Lactobrevina del *L. brevis*
- Lactolina del *L. plantarum*
- Bulgarican del *L. bulgaricus*
- Acidofilina del *L. acidophilus*

3. METABOLITOS CON EFECTOS PROBIOTICOS Y TERAPEUTICOS.

Los metabolitos de este tipo son muy importantes pues aportan propiedades terapéuticas a los productos fermentados. Esto se debe al hecho de que las bacterias ácido-lácticas producen, no solamente ácido láctico, sino también otros compuestos; y además por su capacidad de implantarse y crecer en el intestino humano, reforzando la flora microbiana. Los efectos benéficos de estos productos se pueden resumir de la siguiente forma: (11)

- a) Inhiben el crecimiento de bacterias indeseables.
- b) Estimulan las funciones intestinales, beneficiando el proceso de digestión al formar parte de la flora natural del intestino.
- c) Regulan el crecimiento de otras bacterias, creando condiciones de equilibrio.

FACTORES QUE INTERFIEREN EL CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS

Los factores que pueden interferir el crecimiento de los cultivos iniciadores son variados. Pueden deberse a la calidad de la leche, es decir, a los estándares de higiene; o bien a la contaminación y cambios genéticos (mutaciones) de los mismos cultivos.

Los factores más importantes que interfieren el crecimiento de los cultivos son:

1. Presencia de antibióticos (penicilina, cloramfenicol o estreptomycin) en la leche que quedan después del tratamiento de mastitis en los animales.
2. Infección por bacteriófagos que provocan la lisis o rompimiento de las células.
3. Acumulación de ácidos grasos. La microflora mesofílica de la leche se caracteriza por una elevada actividad lipolítica. Los productos terminales de este proceso metabólico se va acumulando en el medio y las condiciones de éste pueden verse alteradas.
4. Presencia de Inhibidores (insecticidas como el Malathion) relacionados con el tipo de alimento animal.
5. Mutación de las cepas que crecen en los cultivos iniciadores.

2. PRODUCTOS LACTEOS EN DONDE SE EMPLEAN LACTOBACILOS

LECHES FERMENTADAS

La siguiente definición ha sido aceptada para estos productos:

"Las leches fermentadas son productos lácteos que tienen propiedades relacionadas con la existencia de una flora microbiana específica y activa, y con la presencia de sustancias resultantes del metabolismo de estos microorganismos." (11)

Estos productos se han difundido ampliamente por todo el mundo dentro de una gran variedad de tipos que difieren en el origen de la leche, los m.o. y la tecnología empleados. En las tablas 13 y 14 se da una idea de la gran variedad de leches fermentadas que existen en todo el mundo; su consumo y la flora microbiana empleada en su elaboración. (64)

En cada caso, la fermentación no se limita a un solo m.o., sino que puede involucrar varias especies asociadas de diferente manera para caracterizar de forma específica los distintos tipos de leche fermentada. De acuerdo con los anterior, ha sido posible clasificar estos productos en los siguientes grupos: (104)

1. Productos muy ácidos; como, yogurt.

2. Productos ligeramente ácidos; como, leche ácida.
3. Productos ácido-alcohólicos; como, kefir.
4. Productos ligeramente ácidos y densos; como, viili.
5. Productos de vida prolongada; como, labneh.

Tabla 13 LECHE FERMENTADAS QUE SE CONSUMEN EN EL MUNDO

PRODUCTO	PAIS DE ORIGEN	LECHE UTILIZADA
Abdoogh	Afganistán, Irán.	Vaca, búfalo
Bulgarican	Bulgaria	Vaca
Dahf	India	Vaca, Búfalo
Gloddu	Italia	Oveja
Kefir	Rusia	Vaca, oveja, cabra
Keshk	Irán	Cabra
Kourmiss	Rusia	Yegua
Jomil	Alemania, Holanda	Vaca
Labneh	Israel	Vaca
Laktofil	Suecia	Vaca
Leben	Irak	Oveja, cabra
Leben raib	Egipto	Vaca, búfalo
Leche ácida	E.U.	Vaca
Leche cultivada	E.U.	Vaca
Leche larga	Escandinavia	Vaca
Mazum	Armenia	Vaca, oveja, búfalo
Quark	Alemania	Vaca
Viili	Finlandia	Vaca
Yakult	Japón	Vaca
Yogurt	Turquía	Vaca

Fuente: Botazzi, 1983. (11)

Tabla 14. PRODUCTOS FERMENTADOS Y TIPO DE BACTERIAS ACIDO-LACTICAS EMPLEADAS COMO CULTIVO INICIADOR.

PRODUCTO	PAIS	INICIADOR	MATERIA PRIMA
Biogarde o yogurt bifido	E.U. y Alemania	Cultivo de yogurt + <i>L. acidophilus</i> + <i>L. bifidus</i>	Leche de vaca
Biogurt	Alemania	Cultivo de yogurt + <i>L. acidophilus</i> + <i>S. lactis</i>	Leche de vaca
Bulgarian o suero de mantequilla	Bulgaria	<i>L. bulgaricus</i>	Leche descremada o suero de mantequilla
Jomil	Alemania y Holanda	Cultivo de yogurt calentado	Leche de vaca
Lanbneh	Países arabes	<i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i> + <i>Leuconostoc lactis</i> + <i>Kluyveromyces fragilis</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Leche de vaca
Leche ácida Leche ácida dulce	C.E.I., Europa y E.U.	<i>L. acidophilus</i>	Leche de vaca descremada o baja en grasa
Kefir	C.E.I.	<i>L. brevis</i> + <i>L. casei</i> + <i>Leuconostoc mesenteroides</i> + <i>S. durans</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> + <i>Saccharomyces delbrueckii</i>	Leche de vaca
Kesh (yogurt de queso)	Irán	Lactobilos + Streptococos	Leche de cabra

Fuente: Kilera y Trekl, 1984 (57)

Tabla 14. PRODUCTOS LACTEOS FERMENTADOS Y TIPO DE BACTERIAS ACIDO-LACTICAS EMPLEADAS COMO CULTIVO INICIADOR (continuación)

PRODUCTO	PAIS	INICIADOR	MATERIA PRIMA
Koumiss	C.E.I.	Levadura Torula + <i>L. acidophilus</i> + <i>L. bulgaricus</i>	Leche de yegua
Mazada ácida cultivada	E.U.	<i>L. bulgaricus</i> + <i>S. lactis</i>	Leche de vaca
Quesos italianos	E.U. y Europa	Cultivos iniciadores	Leche de vaca
Yakult	Japón	<i>L. casei</i>	Leche de vaca
Yogurt	Mundial	<i>L. bulgaricus</i> + <i>S. thermophilus</i>	Leche de vaca
Yogurt ácido	E.U.	<i>L. acidophilus</i> + <i>S. thermophilus</i>	Leche de vaca baja en grasa
Yogurt líquido	Japón.	<i>L. bulgaricus</i>	Leche de vaca

Fuente: Kilara y Trekl, 1984. (57)

A continuación se hace una recopilación de las características principales, como son la composición microbiológica y la tecnología empleadas en la elaboración del yogurt que es la leche fermentada por lactobacilos más representativa del género.

YOGURT

El yogurt (figura 7) es la leche fermentada más difundida en el mundo y, según el país donde se elabore puede tener diferentes nombres, como se muestra en la tabla

15.

Tabla 15 NOMBRES DEL YOGURT EN LOS PAISES DONDE SE PRODUCE

NOMBRE	PAIS	NOMBRE	PAIS
Mast	Irán	Katyk	Grecia
Leben	Irak, Líbano, Egipto	Naja	Bulgaria
Leben raib	Arabia	Dahi	India
Zabade	Egipto, Sudán	Tiatoorti	Grecia
Roba	Sudán, Irak	Taho	Hungría
Matzoon	Armenia	Yáourt	Rusia, Bulgaria
Yogurt	América		

Fuente: Kosikowski, 1977 (64)

Es un producto fermentado de apariencia suave, brillante y de sabor fresco, ácido y aromático. La acidez final varía del 0.7 al 1.1% en ácido láctico con un pH aproximado de 4.0 - 4.2. Existen variaciones del tipo tradicional de yogurt que son el yogurt líquido, yogurt con frutas, yogurt saborizado, yogurt congelado, yogurt seco, yogurt bajo en lactosa y yogurt bajo en calorías.

El yogurt tradicional es el producto lácteo resultante del crecimiento asociado entre el *S. Thermophilus* y el *L. bulgaricus*, en una proporción de 1:1. Las dos especies se utilizan en conjunto por muchas razones de índole tecnológico como son la velocidad de acidificación, consistencia del coágulo, calidad del ácido láctico producido y la intensidad del sabor. En ocasiones se utilizan también otras especies como *L. acidophilus* y *S. lactis*. En especial, hay un producto en el que se emplean las cuatro especies que se conoce como biogurt. (64)

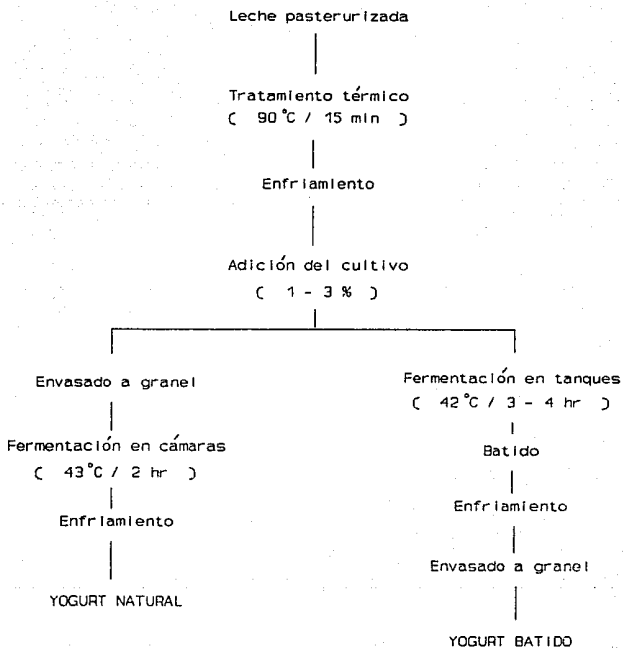


Figura 7. Método de manufactura del yogurt. (57)

2.2 QUESOS

Existen varias razones que justifican la conversión de la leche en queso:

1. Preservar los nutrimentos de la leche en un producto estable, el queso.
2. La necesidad de esta conversión es importante al aportar un producto primario; la leche, y tenerlo disponible durante todo el año.
3. Proveer de una mayor variedad de alimentos.
4. Durante la elaboración del queso, la fermentación de la leche por medio de microorganismos específicos, los pasos del proceso y las condiciones y tiempo de maduración; inducen cambios en el cuerpo, textura, sabor, color y propiedades nutritivas para crear una amplia variedad de productos.

Los lactobacilos se emplean como cultivos iniciadores en la elaboración de quesos duros de pasta cocida en los que los m.o. del cultivo deben soportar temperaturas de 45°C aproximadamente y crecer a temperaturas relativamente altas. Estos organismos intervienen principalmente durante el proceso de maduración del queso, es por eso que a continuación se hace una descripción de este proceso.

MADURACION DEL QUESO

La maduración del queso implica cambios en las propiedades físicas y químicas del mismo, acompañados por el desarrollo del sabor y aroma característicos. Durante la maduración, la cuajada es digerida por enzimas y el queso adquiere la firmeza, elasticidad o suavidad características.

Los cultivos iniciadores que se emplean en la manufactura de los quesos pueden intervenir en el proceso de la fermentación para formar la cuajada, o bien, pueden participar durante la maduración del producto contribuyendo al desarrollo de las características principales del queso.

Los cambios que se llevan a cabo durante la maduración de los quesos son los siguientes:

1. Cambios en el cuerpo, textura, sabor y aroma

El término "cuerpo" se refiere a la consistencia del queso e incluye características como la firmeza, elasticidad, plasticidad y cohesión. La transformación de la cuajada se debe a la digestión enzimática de la caseína.

La textura describe la presencia de "ojos" en el queso. Una textura cerrada indica la carencia de dichos "ojos", mientras que su presencia se expresa como textura

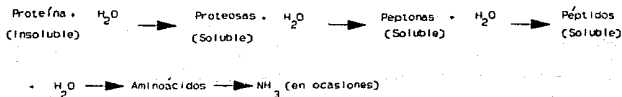
abierta.

La maduración implica el desarrollo de compuestos responsables del sabor y aroma del queso por acción del m.o. y enzimas que degradan las proteínas, grasas y carbohidratos. Los m.o. del cultivo iniciador van desapareciendo lentamente durante la maduración; únicamente los lactobacilos, que pueden estar presentes en la cuajada en baja cantidad, se multiplican y pueden alcanzar niveles de 10^6 a 10^8 células/g en quesos de 3 - 6 semanas. (11)

2. Cambios químicos y bioquímicos

Estos cambios son la fermentación de la lactosa a ácido láctico, junto con algunos ácidos volátiles, etanol y pequeñas cantidades de otros subproductos. En ciertas variedades de queso tiene lugar una fermentación secundaria del ácido láctico con producción de ácidos propiónico, acético y CO_2 .

La mayor parte del material nitrogenado del queso fresco se compone de proteínas insolubles en agua, pero al avanzar la maduración, parte o todas ellas se hidrolizan dando lugar a la formación de compuestos solubles más simples:



La hidrólisis de las grasas se lleva a cabo durante la maduración del queso y los productos que se generan son ácidos grasos volátiles de cadena corta, incluyendo el butírico, caproico, caprílico y cáprico. Ciertas cepas de lactobacilos liberan por autólisis, lipasas intracelulares que son responsables de gran parte de la actividad lipolítica en los quesos duros. (15)

En la tabla 16 se muestran algunas de las características de las variedades de queso en donde se emplean lactobacilos como cultivos iniciadores y a continuación se hará una descripción de las características del proceso de elaboración del queso Grana que es el producto fermentado por lactobacilos más representativo del género.

QUESO GRANA

El nombre Grana, atribuido por su aspecto granular, se emplea para un grupo de diversas variedades de queso duro, elaborado en el norte de Italia. Su corteza es dura y su peso varía de 30 a 40 Kg. Su sabor fino, dulce y suave que recuerda al de la nuez; se logra durante la maduración.

Para su elaboración se utiliza un cultivo iniciador al 1% formado por *S. Thermophilus* y *L. bulgaricus* (u otro lactobacilo termoresistente similar, como *L. lactis*, *L. helveticus* o *L. fermenti*). En la figura 8 se muestra un esquema de el proceso de elaboración de el queso Grana.

Tabla 16. Cultivos iniciadores y flora asociada de las variedades de queso.

Tipo de Queso	Nombre del Queso	Curado o No Curado	Cultivos iniciadores	Función del iniciador	Flora asociada	Función de la flora asociada
Duros; humedad 39%	Tipos Italianos de pasta hilada	Curado sólo en el interior	<u>S. thermophilus</u> <u>L. helveticus</u> <u>L. bulgaricus</u>	Producción de ácido y parte del sabor.	Ninguna	Ninguna
Duros; humedad 39%	Variedades de queso suizo	Curado sólo en el interior	<u>L. lactis</u> <u>S. cremoris</u> <u>S. thermophilus</u> <u>L. helveticus</u> <u>L. bulgaricus</u>	Producción de ácido y parte del sabor; en especial los lactobacilos	<u>P. freudenreichii</u> <u>P. freudenreichii subsp. shermanii</u> Flora "untuosa" en el Gruyere	Formación de "bojor" y del sabor característicos. Sabor untuoso en el Gruyere
Muy duros; humedad 34%	Tipos Grana Italianos	Curado sólo en el interior.	<u>S. thermophilus</u> <u>L. helveticus</u> <u>L. bulgaricus</u>	Producción de ácido y sabor	Ninguna	Ninguna

Fuente: Vadamuthu y Washman, 1963. (137)

Existen algunas variedades de queso Grana, una de ellas es el queso Asiago de 10 a 12 kg de peso, con un ligero sabor picante y leve desarrollo de ojos. Otra variedad es el queso parmesano o Reggiano. Su peso va de 11 a 14 kg.

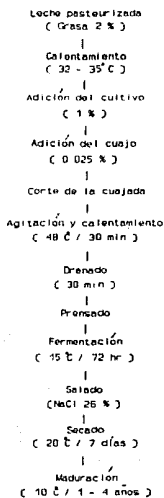


Figura 8. Método de manufactura del queso Grana.

CAPITULO V

**INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA
EN EL MEJORAMIENTO DE LOS
LACTOBACILOS.**

INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA EN EL MEJORAMIENTO DE LAS CEPAS DE LACTOBACIOS

INTRODUCCION

Los estudios de la ingeniería genética han hecho posible el desarrollo de procedimientos para el aislamiento, la manipulación y la expresión del material genético bacteriano; cuyo potencial en aplicaciones comerciales parece ilimitado.

Con los avances de esta ciencia se ha logrado la manipulación bioquímica de los genes, desarrollando técnicas que permiten aislar y unir diferentes trozos de DNA, de tal forma que producen moléculas de ADN biológicamente activas que son introducidas en las células bacterianas.

Antes de desarrollar este capítulo se mencionarán algunos conceptos básicos sobre la ingeniería genética.

RECOMBINACION GENETICA

La recombinación genética se produce cuando dos elementos genéticamente distintos se combinan en uno mismo. Este proceso puede llevarse a cabo mediante tres mecanismos diferentes:

1. TRANSFORMACION

Algunas bacterias son capaces de tomar el ADN liberado por otras bacterias. En este proceso sólo una pequeña cantidad de DNA puede asimilarse y depende de la presencia de un sistema específico en la membrana celular.

La figura 9 muestra un esquema del proceso de transferencia de DNA por medio de la transformación.

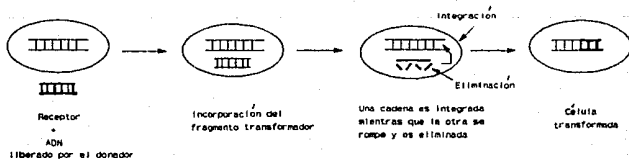


Figura 9. Mecanismo de la transformación genética. (13)

2. TRANSDUCCION

Es un proceso de recombinación en donde el ADN es transferido por medio de un virus o fago. Como elementos genéticos, los fagos pueden transferir no sólo su propio material genético, sino también el de algunas células. La transducción puede ser de dos tipos:

- a) **GENERALIZADA:** En este proceso virtualmente cualquier gen del donador puede ser transferido, aunque su eficiencia es baja.
- b) **ESPECIALIZADA:** En este proceso el ADN de un fago temperado se incorpora al de la célula receptora. Aunque solo los genes que están relacionados con el punto de integración del fago son transferidos, este proceso tiene mayor eficiencia.

En la figura 10 se muestra el proceso de transducción especializada esquematizado.

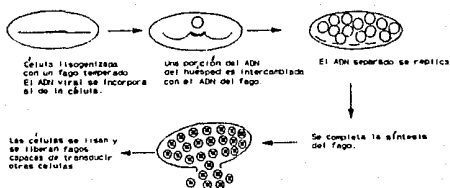


Figura 10. Mecanismo de transducción especializada. (13)

3. CONJUGACION

Es un proceso de transferencia genética que implica el contacto célula a célula mediante la formación de un puente o "pelo". El material genético transferido puede ser un plásmido o una porción de cromosoma movilizado por un plásmido.

En la figura 11 se muestra un esquema del proceso de conjugación.

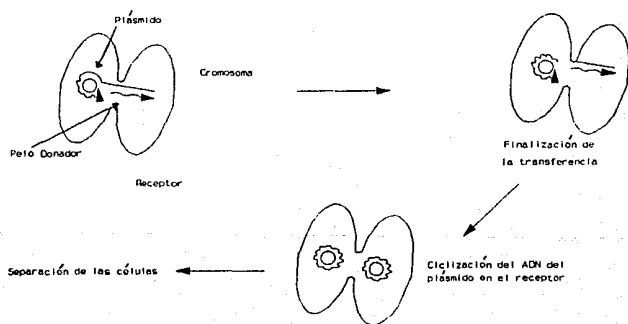


Figura 11. Mecanismo de la conjugación genética. (13)

PLASMIDOS

Los plásmidos son fragmentos circulares de ADN bicatenario que se reproducen autónomamente y tienen una existencia extracromosómica. Muchos plásmidos llevan genes que controlan diferentes funciones celulares. En el campo de la ingeniería genética se les ha utilizado con éxito para técnicas de recombinación genética por medio de conjugación.

CLONACION

La clonación de genes es la base de la mayoría de los procedimientos de la ingeniería genética. El propósito de la clonación es aislar grandes cantidades de un gen específico en forma pura, lo cual se logra utilizando un plásmido o un fago como vector de clonación.

Se utilizan también, enzimas de restricción y ADN-ligasa en los procesos de recombinación in vitro para producir una molécula de ADN híbrido. Una vez introducido en la célula hospedante, el ADN puede ser producido en grandes cantidades.

INGENIERIA GENETICA DE LOS LACTOBACILOS

De todos los m.o. utilizados deliberadamente por el hombre, las bacterias ácido lácticas (lactobacilos y estreptococos) son las más empleadas. La aplicación de la biotecnología sobre estos m.o. incluye el mejoramiento de las técnicas existentes y el desarrollo de nuevos procesos para la clonación de genes esenciales en la construcción de sistemas de transformación, para el desarrollo de vectores de clonación y para el mejoramiento de los genes que codifican las funciones de fermentación.

Los lactobacilos contribuyen a la conservación de los alimentos al acidificarlos, impartiendo además, ciertas propiedades organolépticas. Inclusive, a estas bacterias se les han atribuido ciertos efectos benéficos en la salud. Estas propiedades incluyen la prevención de padecimientos abdominales e intestinales, asimilación de colesterol, reducción de caries dentales y actividad antitumoral. (6)

El descubrimiento de éstas y otras funciones metabólicas importantes, pero a la vez inestables; estimuló el interés en la investigación sobre los elementos extracromosómicos de los m.o. pertenecientes al género *Lactobacillus*. La mayoría de las funciones identificadas se encuentran codificadas en plásmidos e incluyen: el metabolismo de lactosa, resistencia a antibióticos, producción de proteasas, bacteriocinas y ácido láctico, y la resistencia al ataque de bacteriófagos.

El desarrollo de la biotecnología ha abierto el camino hacia la creación de

programas para el mejoramiento de las cepas industriales de lactobacilos. En este capítulo se hace una descripción de los estudios genéticos y su posible aplicación con el propósito de incrementar la eficiencia de los cultivos iniciadores que involucran lactobacilos.

DESARROLLO DE SISTEMAS DE TRANSFERENCIA GENETICA

En 1976, Chassy y colaboradores reportaron por primera vez la presencia de elementos extracromosómicos en el género *Lactobacillus*. Es decir, proporcionaron la primera evidencia de la existencia de plásmidos en m.o. de este género (*L. casei* subsp. *casei*, *L. casei* subsp. *rhamnosus* y *L. coryniformis*). (19)

Desde entonces, las investigaciones acerca del material genético de los lactobacilos y la transferencia de éste hacia cepas diferentes, han ido en aumento. El número promedio de plásmidos encontrados en los lactobacilos puede variar desde 4 hasta 7, aunque puede ir de 2 a más de 12. (122)

Para facilitar la manipulación de los plásmidos o de los genes cromosómicos, fue necesario el desarrollo de sistemas de transferencia o recombinación genética, es decir, aplicar los procesos de transducción, transformación y conjugación.

Tanto la transducción como la conjugación se han utilizado para confirmar que muchas de las funciones metabólicas necesarias en la fermentación se encuentran

codificadas en plásmidos. (59, 62, 79, 110)

Para desarrollar cepas industriales pueden utilizarse plásmidos conjugativos de alta frecuencia, clonando sus propiedades hacia otros plásmidos no conjugativos con el fin de transferir su función específica a la cepa adecuada. Estos plásmidos de alta frecuencia también podrían usarse como vectores de clonación para otros m.o. fermentadores. Sin embargo, es necesario el análisis preliminar de estos plásmidos, así como del proceso de conjugación antes de establecer un sistema de transferencia. (33)

METABOLISMO DE LACTOSA

Para que los lactobacilos puedan crecer y desarrollarse en la leche, deben ser capaces de fermentar lactosa. Este azúcar es metabolizado debido a la presencia de **fosfotransferasas** que son enzimas que transportan el azúcar hidrolizado hacia el interior de la célula (ver capítulo 3). Las enzimas específicas involucradas en este proceso son: Enzima-II-Lac, Enzima-III-Lac y Fosfo-Beta-galactosidasa. (79)

En 1977, F. Hofer descubrió que los genes que codifican la producción de las tres enzimas se encuentran en plásmidos. En su trabajo, concluye que si se llega a una clonación en forma extensa de los genes del metabolismo de la lactosa, se puede incrementar la cantidad de los plásmidos presentes en la célula y, en consecuencia, elevar el rango de producción de ácido láctico. (48)

La hidrólisis de la lactosa en sus unidades de monosacáridos (glucosa y galactosa) es importante por diferentes razones: (57)

1. Es una azúcar de baja digestibilidad para una gran proporción de la población mundial.
2. La lactosa es un poco soluble en agua, ocasionando problemas durante la concentración del suero de leche o para alimentos en los que se utilice el suero.
3. La lactosa tiene un bajo poder edulcorante.

Sin embargo, estos problemas pueden superarse si se extiende el grado de hidrólisis de la lactosa, ya que sus monosacáridos son más digeribles, de mayor solubilidad en agua y más dulces. Por esta razón, se han buscado cepas de lactobacilos capaces de producir niveles altos de Beta-galactosidasa y clonar sus genes para construir vectores de clonación y en consecuencia, cepas que produzcan las enzimas en exceso. Los genes podrían ser utilizados como sistemas modelo en el estudio de la organización, expresión y regulación de otros genes de los lactobacilos. (30)

Cabe mencionar que además de la Beta-galactosidasa, se han estudiado otras enzimas involucradas en las funciones metabólicas de los lactobacilos. Tal es el caso de la L(+)-lactato deshidrogenasa que interviene en la transformación del ácido pirúvico en ácido

láctico. En 1991, Sungmin y sus colaboradores lograron determinar en el *L. casei* la secuencia de aminoácidos y la expresión del gen que codifica la producción de la enzima por medio de técnicas de recombinación de ADN. (127)

En el mismo año, Posno y colaboradores desarrollaron un sistema de clonación de genes que regulan el metabolismo para la fermentación de la D-xilosa en el *L. pentosus* MD353 por medio de las enzimas D-xilosa isomerasa (XylA), D-xilulosa-quinasa (XylB) y una enzima reguladora (XylR). Al lograr la construcción de un vector de clonación (figura 12) para la transferencia de estos genes en otras especies de lactobacilos (*L. casei* y *L. plantarum*), los autores proponen que el sistema podría ser utilizado como marcador de selección de grado alimenticio, ya que pocas especies de lactobacilos pueden utilizar D-xilosa como fuente energética. (93)

ACTIVIDAD PROTEOLITICA

Los lactobacilos requieren de un sistema de enzimas proteolíticas para crecer en el leche y degradar la caseína en productos nitrogenados como péptidos y aminoácidos.

La actividad proteolítica es una propiedad inestable relacionada con el ADN plasmídico de los lactobacilos. Los genes que codifican a las diferentes proteasas podrían ser intercambiados entre distintas cepas y en ellas se buscaría el control del nivel de expresión. Con esto se conseguiría la construcción de cepas capaces de acelerar la maduración de los quesos mediante la manipulación de la actividad enzimática ya existente

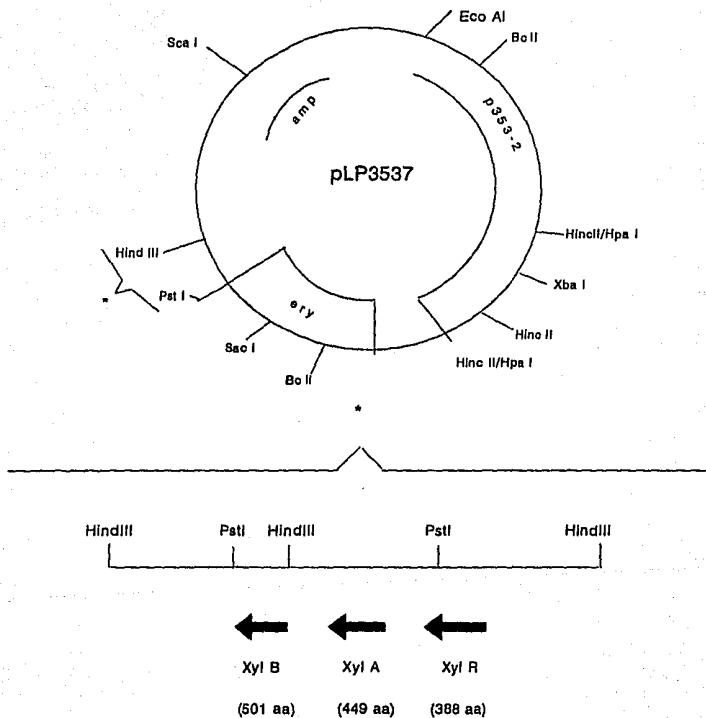


Figura 12. Clonación de tres genes involucrados en el catabolismo de la D-xilosa en un vector de *Lactobacillus*. La organización genética de la región del ADN del *L.pentosus* que contiene *xylR*, *xylA* y *xylB* (representados por flechas gruesas) se muestra en la parte inferior. El número de aminoácidos de cada proteína se da entre paréntesis. El plásmido pLP3537 consiste de un gene de resistencia a la eritromicina (*ery*) y de un plásmido oculto (*p353-2*). (93)

o introduciendo nuevas enzimas provenientes de otras fuentes no lácticas.

El sistema proteolítico de los lactobacilos es complejo y está compuesto de proteasas y exopeptidasas que se localizan en diferentes sitios dentro de la célula y antes de lograr la transferencia de los genes que las codifican, es necesario determinar el número, propiedades y localización de ellas. En 1989, Atlan y colaboradores demostraron la existencia de dos aminopeptidasas y su localización en células de *L. bulgaricus* CNRZ 397. (3)

En un estudio similar realizado por el mismo equipo de investigadores, en 1990 analizaron la regulación de estas enzimas en el *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. (4)

CONSTRUCCION DE CEPAS QUE ACELERAN LA MADURACION DEL QUESO

Uno de los procesos más investigados por su importancia industrial es la aceleración del proceso de maduración de los quesos. Todos los métodos propuestos involucran, ya sea, el grado de actividad enzimática, o bien, la concentración de las enzimas responsables de este proceso.

Si las células de los m.o. se lograsen romper o lisar prematuramente utilizando un fago y así liberar sus enzimas intracelulares durante la producción del queso, antes de su maduración; se disminuiría la intensidad del sabor amargo del producto y al mismo

tiempo, aceleraría el desarrollo del sabor característico del producto. (132)

Así, al separar cepas de cultivos iniciadores que liberen sus enzimas intracelulares, se tendría un método útil para acelerar la maduración del queso. Este concepto se basa en los experimentos de Shimizu-Kadota (1983) que logró el aislamiento de células mutantes del *L. casei* S-1. (122)

Al utilizar estas cepas transformadas genéticamente, se superarían los métodos hasta ahora desarrollados para que la maduración del queso sea más rápida, puesto que los m.o. liberarían sus enzimas directamente a la cuajada del queso. Además servirían para proporcionar enzimas como proteasas, peptidasas, lipasas, estererasas y otras, que mejoran el sabor y la calidad del producto final.

PRODUCCION DE PROTEINAS ANTAGONICAS

Los lactobacilos producen un cierto número de sustancias antimicrobianas como ácido láctico, diacetilo y bacteriocinas. Las bacteriocinas son compuestos proteínicos que actúan como bactericidas en contra de especies de m.o. relacionados con ellos. Estas sustancias incluyen: lactobrevina, lactolina, acidofilina, lactacina y lactocina. (117)

Las especies de lactobacilos que producen bacteriocinas pueden llegar a ser útiles en el mejoramiento de la seguridad de los productos lácteos fermentados. Hasta hoy,

solamente en Europa se ha autorizado el uso de una bacteriocina, la nisina. A pesar de que se han publicado numerosos reportes acerca de la existencia de bacteriocinas, ha surgido poca información acerca de su composición, modo de acción y genética.

Se ha comprobado la existencia de varias bacteriocinas en m.o. del género *Lactobacillus*; en específico en *L. acidophilus*, *L. fermenti*, *L. plantarum* y *L. sake*. (53)

Solamente algunas de estas sustancias han sido parcialmente purificadas y caracterizadas. Al profundizar en los estudios sobre bacteriocinas puede llegarse a las bases necesarias para la construcción de cepas de m.o. que posean propiedades inhibitorias en contra de patógenos que provocan la descomposición de los alimentos.

Barefoot y Klaenhammer reportaron en 1983, la primera evidencia sobre la producción de una bacteriocina en el *L. acidophilus* y la designaron como Lactacina B. Se encontró que esta sustancia es capaz de inhibir el crecimiento de m.o. indeseables en el tracto intestinal del hombre. (5)

En 1987, Muriana y Klaenhammer, consiguieron la transferencia genética de plásmidos del *L. acidophilus* 88 que codifican la producción de bacteriocinas y la inmunidad de la célula hospedante a ella, mediante un proceso de conjugación. La bacteriocina, designada como lactacina F, inhibe el crecimiento de otros lactobacilos como *L. lactis*, *L. helveticus*, *L. bulgaricus* y *L. fermentum*. (86)

En 1991, Mortvedt y colaboradores, describieron por primera vez un procedimiento de purificación de una bacteriocina y la determinación de la secuencia de sus aminoácidos en un 75% (figura 13). Esta bacteriocina se designó como lactocina S y fue encontrada en el *L. sake*. La información obtenida en este trabajo puede ser empleada para determinar la genética y el mecanismo de acción de estas sustancias. (85)

1	Met	Glu	Leu	Leu	Thr	Ala	Ala	Val	Leu	Tyr	Asp	Val
	Ala	Gly		Phe	Lys	Tyr		Ala	Lys	His	His	25

Figura 13. Secuencia de aminoácidos de la parte C-terminal de la lactocina S. (85)

RESISTENCIA A BACTERIOFAGOS

La infección por bacteriófagos en cultivos iniciadores es tal vez, el problema más frecuente y, al mismo tiempo, el más sujeto a la investigación de la ingeniería genética.

El ataque de bacteriófagos sobre un cultivo iniciador puede provocar la pérdida completa del producto o disminuir la calidad de éste y en consecuencia, ocasionar pérdidas económicas.

Una de las primeras soluciones propuestas para la prevención o disminución de este problema, fue rotar los cultivos iniciadores combinándolos con cepas resistentes a

esos fagos. Aunque la forma de resistencia es desconocida; el empleo de cepas especializadas disminuye el problema. Por esta razón, estos m.o. son material de enorme potencial para la manipulación genética. (7)

La investigación puede enfocarse sobre el ciclo de vida del bacteriófago, ya que puede llegar a inhibirse total o parcialmente. Este ciclo incluye la absorción del fago en la célula de la bacteria hospedante, la introducción del ADN y la replicación del bacteriófago de la célula.

La resistencia a bacteriófagos se encuentra codificada en plásmidos y con el estudio de éstos se han alcanzado grandes logros. El más notable es la investigación reportada por el Instituto Yakult, en donde se ha conseguido la identificación y descripción de diferentes plásmidos en la especie *L. casei*. En 1987, se logró la caracterización del plásmido pLY101 que codifica el metabolismo de lactosa en este m.o. (figura 14). Antes, en 1983, se reportó la construcción de una cepa "curada" de *L. casei* S-1. Esto quiere decir que el m.o. era sensible al ataque de un fago (oFSV), sin embargo, al conseguir mediante la utilización de técnicas de recombinación genética un arreglo del ADN del virus, la cepa se hizo resistente. En 1985, se consiguió convertir un plásmido de resistencia de el mismo organismo en un elemento de transferencia hacia otras cepas. (119, 121, 122)

En Francia, también se han llevado a cabo estudios sobre resistencia a bacteriófagos. en 1987 se logró transferir del *L. lactis* CNRZ326 a *L. bulgaricus* LT4 la resistencia al ataque de un fago mediante técnicas de clonación y rotación de cultivos. En

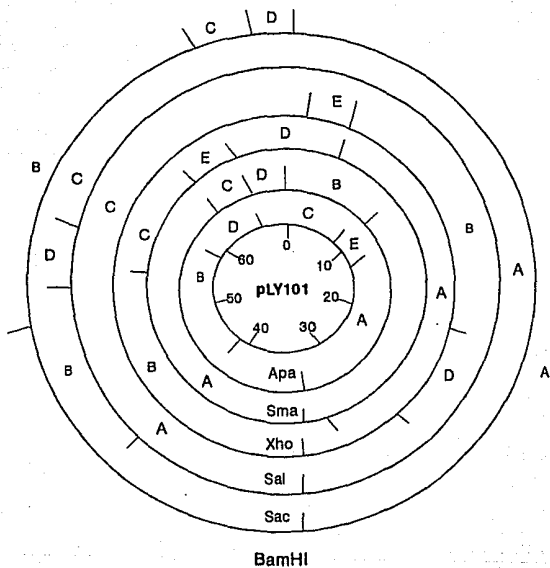


Figura 14. Mapa de restricción plásmido pLY101. Los fragmentos obtenidos por medio de endonucleasas se designaron de A a E en orden decreciente de tamaño molecular. La escala numérica indica la distancia en kilobases (kb) en el sitio BamHI entre los fragmentos A y D. (119).

1990 se llegó a la conclusión de que la resistencia al ataque de bacteriófagos se debe a la existencia de un sistema de restricción-modificación codificado en plásmidos y que éstos pueden ser transferidos a diferentes cepas que carezcan de este sistema. En estudios más recientes (1992) se consiguió caracterizar morfológicamente y evaluar el rango de hospedantes de 35 tipos diferentes de bacteriófagos del *L. helveticus*. (23, 102, 113)

Se han hecho numerosos estudios sobre fagos que atacan a las diferentes especies de lactobacilos. Los avances conseguidos en este campo permitirán la clonación de los genes responsables de los diferentes mecanismos de resistencia y al mismo tiempo, se facilitará el análisis molecular de estos mecanismos para lograr su expresión y regulación. Esta información ayudará al mejoramiento de cepas industriales.

FORTIFICACION DE ALIMENTOS

La mayoría de los m.o. sintetizan aminoácidos que requieren para sus diferentes funciones. En algunas ocasiones, varios de estos aminoácidos son liberados al medio de crecimiento. Se ha encontrado que algunos m.o. y sus cepas mutantes son capaces de excretar aminoácidos específicos. Tal es el caso de *L. acidophilus* y el *L. bulgaricus* que sintetizan lisina, aminoácido esencial.

La acumulación de este tipo de aminoácidos en productos lácteos fermentados como yogurt y leche ácida, ayuda a la fortificación de los mismos por el empleo de cepas sobreproductoras de metabolitos esenciales como cultivos iniciadores. (112)

RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS

Existe poca información acerca de la resistencia de los lactobacilos hacia antibióticos. Sin embargo, se ha comprobado que esta propiedad se encuentra codificada en plásmidos.

Las especies más resistentes a antibióticos son *L. reuteri* y *L. acidophilus*, por lo que su material genético se ha utilizado como vector de transferencia hacia otras especies de lactobacilos. Por ejemplo, en 1987, Tannock llevó a cabo la transferencia conjugativa de un plásmido de resistencia a la eritromicina del *L. reuteri* hacia otros m.o. como *S. lactis*, *L. murinus*, *L. fermentum*, *L. casei* y *L. salivarius*. (6, 129, 138)

CONSTRUCCION DE VECTORES

La investigación sobre genética de los lactobacilos ha permitido hacer una clasificación más completa de estos m.o. e investigar algunas propiedades que tienen en beneficio de la salud. (41, 103)

Sin embargo, las herramientas genéticas disponibles para el estudio del género *Lactobacillus* son extremadamente limitadas. Lo primero que se requiere es un vector de clonación. Un vector es una secuencia de ADN que sirve para mantener el gen deseado en la célula hospedante. El vector debe replicarse siempre que la célula hospedante se replique y se debe evitar su segregación y pérdida durante la división celular.

La segunda herramienta es un sistema de transformación para recoger el ADN liberado por una célula y después introducirlo en otra. Una célula puede ser transformada por medio de diferentes técnicas; algunos organismos pueden ser manipulados de esta manera con sólo modificar las condiciones fisiológicas. En otros casos, la pared celular debe removerse para obtener protoplastos capaces de recibir el ADN deseado. (10)

Se han construido varios vectores para las bacterias ácido lácticas. Sin embargo, la eficiencia de cualquier vector queda en duda mientras no sea introducido exitosamente en el hospedante deseado. El fracaso de un vector puede atribuirse a diferentes factores: (6)

- a) Inactividad del material genético durante la construcción del vector.
- b) Ausencia de marcadores de expresión adecuados.
- c) Incompatibilidad del vector con otros plásmidos endógenos de la célula hospedante.

A pesar de disponer de sistemas para transferencia del material genético entre diferentes especies de bacterias ácido lácticas por conjugación o transducción; la mayor limitación para estos procesos era la ausencia de un vector plasmídico. Los avances en este terreno son muy recientes. En 1987, Watanabe y colaboradores, reportaron la creación de un sistema para la obtención de protoplastos del *L. casei* ATCC 27092 utilizando una enzima del bacteriófago PL-1, y después regenerar las células del organismo. (141)

En 1989, Takiguchi y colaboradores, consiguieron caracterizar e identificar la secuencia de nucleótidos de un plásmido en el *L. helveticus* subsp. *jugurti* con información específica para la resistencia a antibióticos (figura 15) y proponen que este factor podría utilizarse como vector de clonación para seleccionar cepas más eficientes del m.o. (128)

En el mismo año, Raya consiguió la primera evidencia sobre transducción plasmídica en el género *Lactobacillus*. En este estudio se analizó un fago del *L. acidophilus* que puede provocar ciclos líticos y lisogénicos en la célula hospedante. Se demuestra además, la habilidad del fago para mediar la transducción de plásmidos entre diferentes cepas del organismo. (99)

En 1991, Posno y colaboradores describieron la construcción de tres vectores plasmídicos (figura 16) y su introducción en diferentes cepas de *L. casei*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. acidophilus* y *L. fermentum*; por el método de electroporación. Además, se analizó la estabilidad estructural y de segregación de los vectores en las cepas de los m.o. estudiados. (93)

Algunas funciones metabólicas de los lactobacilos pueden beneficiarse a partir de los cambios provocados por manipulación genética. Un ejemplo de esto es el control de la acidificación del medio de crecimiento.

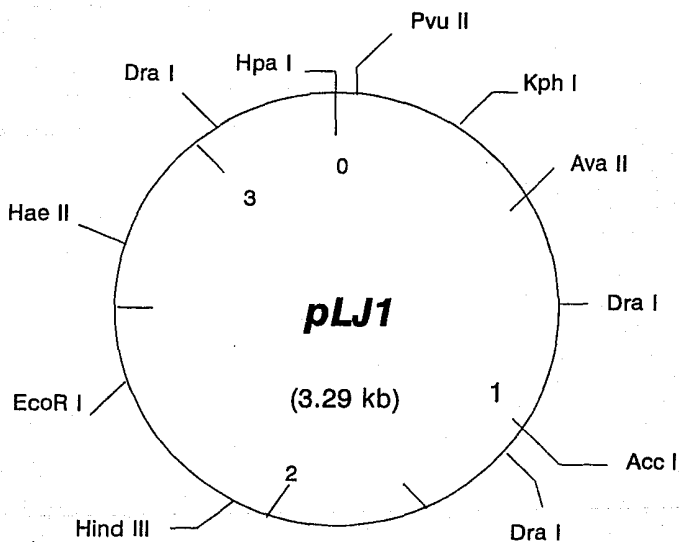


Figura 15. Mapa de restricción del plásmido pLJ1 del *L. helveticus* subsp. *jugurti*. El sitio PVu II se escogió arbitrariamente como punto de referencia y las distancias están dadas en Kb. (128)

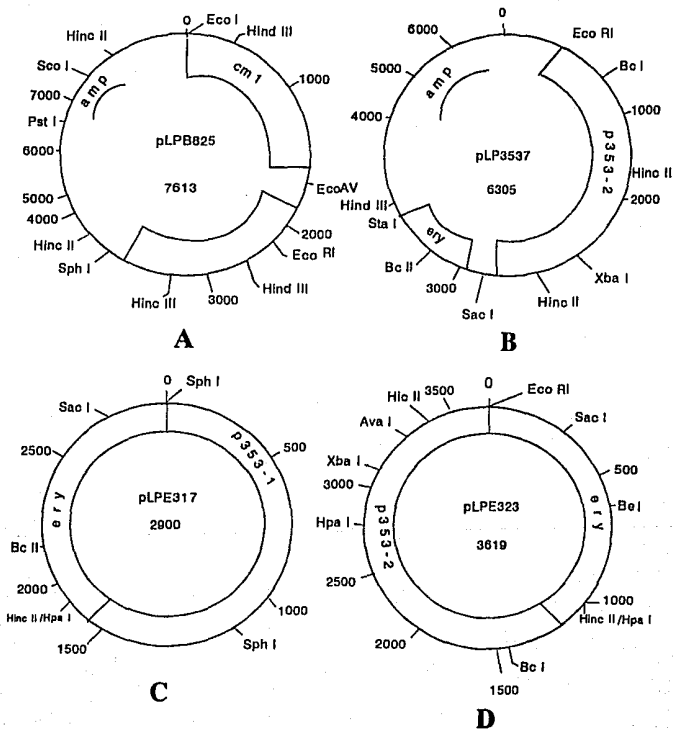


Figura 16. Mapas de restricción de los plásmidos pLP825 (A), pLP3537 (B), pLPE317 (C) y pLPE323 (D). El tamaño de los plásmidos (en pares de bases) se muestra dentro de cada círculo. El plásmido oculto del *L. plantarum* ATCC 8014 está indicado como p8014-2 y los plásmidos ocultos del *L. pentosus* MD353 están indicados como p353-1 y p353-2, respectivamente; *cm1* es el gen de resistencia alcloramfenicol; *ery* es el gen de resistencia a eritromicina y *amp* es el gen de resistencia a la ampicilina. (93)

En el yogurt, por ejemplo, el pH final es de 3.8 - 4.2. Un problema para la conservación de este producto es la disminución del pH debido a la actividad catabólica de los lactobacilos del cultivo iniciador que permanecen activos en el producto final. El control de la acidificación puede lograrse alterando genéticamente la regulación del ciclo de la glucólisis. Los primeros experimentos con este propósito se llevaron a cabo en el *L. bulgaricus*, regulando la producción de la Beta-galactosidasa, primer enzima que interviene en el catabolismo de la lactosa. (6)

Con estas evidencias, los puntos de enfoque para la manipulación por recombinación genética de los lactobacilos, recaen en dos categorías:

- 1) Mejorar las funciones catabólicas del m.o.
- 2) Introducir y expresar los genes de otras especies o géneros de m.o. para producir nuevas características o propiedades.

FUTURO DE LA INVESTIGACION SOBRE EL GENERO *Lactobacillus*

La ingeniería genética se encuentra en el umbral del desarrollo de una tecnología para construir cepas de lactobacilos con nuevas características. El número de posibles avances que pueden lograrse es muy amplio.

En un principio, las cepas pueden llegar a marcarse para distinguir con facilidad los organismos similares. También es factible mejorar las rutas bioquímicas (o introducir nuevas) que dan lugar a la textura y al sabor de un producto. Introducir genes de resistencia a fagos; mejorar el rango de crecimiento y aumentar la tolerancia a la acidez o los tratamientos térmicos. Podrían introducirse genes que codificaran la producción de antibióticos que supriman la contaminación y el deterioro ocasionados por otros m.o. Se podrían introducir nuevas características metabólicas como la producción de enzimas tipo renina para eliminar el uso de quimosina (cuajo) en la elaboración de quesos.

Otras posibles aplicaciones a futuro de la ingeniería genética sobre los lactobacilos, incluye el aumento de la contribución nutricional de estos organismos en ciertos productos. Podrían desarrollarse cepas con efectos terapéuticos específicos, aprovechando su capacidad de colonizar el tracto intestinal. Los lactobacilos podrían ser utilizados como vehículos en la elaboración de vacunas.

Debido a que pueden ser cultivados en gran escala y a que fermentan materias

primas de bajo costo, podrían ser modificadas para producir metabolitos secundarios que en la actualidad son producidos por otros m.o. menos accesibles a la recombinación genética.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los lactobacilos tienen la capacidad de implantarse en el tracto intestinal, de tal forma que compiten por los nutrimentos, haciéndolos inaccesibles para otros organismos; ayudando a mantener la flora intestinal normal. Además ejercen acciones antagonicas sobre otras bacterias al producir sustancias antimicrobianas y bacteriocinas.

Los lactobacilos ejercen acciones sinérgicas al producir metabolitos como vitaminas, enzimas y ácidos orgánicos que favorecen el crecimiento de microorganismos utilizados como cultivos iniciadores.

Desde el punto de vista industrial, este género de bacterias es importante por que al fermentar la lactosa producen ácido láctico, favoreciendo la conservación de los productos, y al degradar las proteínas y grasa de la leche, mejoran su digestibilidad y contribuyen al desarrollo del aroma, sabor y cuerpo del producto.

En el campo de la ingeniería genética se han hecho avances muy notables sobre el género *Lactobacillus*. Se ha logrado identificar material extracromosómico (plásmidos) que codifica funciones metabólicas específicas en el m.o. estudiado. A partir de estos descubrimientos se han llevado a cabo numerosos trabajos con el objetivo de mejorar las especies de lactobacilos utilizadas como cultivos iniciadores en la producción de derivados lácteos.

Con la construcción de vectores de clonación de genes se han desarrollado cepas de lactobacilos capaces de degradar otros carbohidratos distintos a la lactosa, utilizándolos como fuente energética. También se han construido cepas que pueden sintetizar compuestos (bacteriocinas) que inhiben el crecimiento de m.o. que ocasionan el deterioro de los productos lácteos.

Uno de los mayores problemas en la utilización de un cultivo iniciador es el ataque de bacteriófagos. Con la aplicación de las técnicas de ingeniería genética, se han desarrollado cepas de lactobacilos resistentes a los fagos, mejorando de esta manera su capacidad de fermentar los componentes de la leche.

Otro problema que puede presentarse con los cultivos iniciadores es la presencia en la leche de los antibióticos que se utilizan durante el tratamiento de la mastitis. Sin embargo, ya se han construido cepas de lactobacilos resistentes a los antibióticos de amplio espectro. (eritromicina y ampicilina).

Además de estos avances, también se ha llegado a la identificación de los genes que codifican los sistemas enzimáticos de los lactobacilos que se encuentran involucrados con el metabolismo de la lactosa y de las principales proteínas de la leche. Esto puede aprovecharse para mejorar y acelerar los procesos de fermentación que se llevan a cabo en la elaboración de productos lácteos.

El éxito inicial de la ingeniería genética, abre las puertas para el desarrollo de nuevas cepas de lactobacilos, pero todavía hay mucho por aprender. Sin embargo, en vista de la importancia económica de los lactobacilos en los procesos de fermentación, el interés por mejorar las características de las diferentes especies de este género de bacterias ha ido en aumento, por lo que se han hecho considerables esfuerzos para obtener cepas con nuevas características de utilidad industrial.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFIA

1. Abo-Elnaga, I.G. and Kandler, O. Taxonomy of genus *Lactobacillus*. I. The subgenus *Streptobacterium*. Orla Jensen. Bacteriol. Parasitology, Infectology and Hygiene Abst. 119: 1 - 36, 1979.
2. Alais, C: Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. C.E.C.S.A. (1984). pp. 39 - 564.
3. Atlan, D., Laloi, P. and Portaller, R.: Isolation and characterization of aminopeptidase-deficient *Lactobacillus bulgaricus* mutants. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1717 - 1723, 1989.
4. Atlan, D., Laloi, P. and Portaller, R.: X-Prolyl-dipeptidyl aminopeptidase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*: Characterization of the enzyme and isolation of deficient mutants. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2174 - 2179, 1990.
5. Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R.: Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1808 - 1815, 1983.
6. Batt, C.A.: Genetic engineering of *Lactobacillus*. Food Technol. 40: 95 - 98, 1986.
7. Batt, C.A.: Prokaryotic cells. in: Biotechnology. Vol. 7b. Gene technology. Rehm, H.J. and Reed, G. (Eds.) Verlag - Chemie. N.Y. (1989). pp. 315 - 330.
8. Biede, S.L., Reinbold, G.W. and Hammond, E.G.: Influence of *Lactobacillus bulgaricus* on microbiology and chemistry of Swiss cheese. J. Dairy Sci. 59: 854 - 858, 1976.
9. Biggels, r.: Industrial products of biotechnology. Application of gene technology. in: Biotechnology. Vol. 7b. Gene technology. Rehm, H.V. and Reed, G. (Eds.). Verlag - Chemie. N.Y. (1989). pp. 234.
10. Boizet, B., Flicknger, J.L. and Chassy, B.: Transfection of *Lactobacillus bulgaricus* protoplast by bacteriophage DNA. Appl. Environ. Microbiol. 54: 3014 - 3018, 1988.
11. Bottazzi, V.: Other fermented dairy products. in: Biotechnology. Vol. 5. Food and feed production with microorganisms. Rehm, H.V. and Reed, G. (Eds.). Verlag - Chemie. N.Y. (1983). pp. 317 - 363.
12. Branen, A.L. and Keenan, T.W.: Growth stimulation of *Lactobacillus* species by lactic streptococci. App. Microb. 17: 280 - 285, 1969.
13. Brock, T.D. and Madigan, M.T.: Biology of microorganisms. Prentice Hall. N.J. (1991). pp. 235 - 386.

14. Bryan-Jones, G. Lactic acid bacteria in distillery fermentation. In: Lactic acid bacteria in beverages and foods. Carr, J.G., Cutting, C.V. and Whiting, G.C. (Eds.). Academic Press. N.Y., London. (1975). pp. 165 - 175.
15. Chapman, H.R. and Sharpe, M.E.: Cheese. In: Dairy microbiology. Vol. II. The microbiology of milk products. Robinson, R.K. (Ed.). Elsevier App. Sci. N.Y. (1989). pp. 255 - 331.
16. Chassy, B.M.: Prospects for improving economically significant *Lactobacillus* strains by genetic technology. *Trend Biotechnol.* 3: 273 - 273, 1985.
17. Chassy, B.M.: Prospects for the genetic manipulation of lactobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* 46: 297 - 312, 1982.
18. Chassy, B.M. and Filckinger, J.L.: Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* 44: 173 - 177, 1987.
19. Chassy, B.M., Gibson, E. and Giuffrida, A.: Evidence for extrachromosomal elements in *Lactobacillus*. *J. Bacteriol.* 127: 1576 - 1578, 1976.
20. Chassy, B.M., Gibson, E. and Giuffrida, A.: Evidence for plasmid associated lactose metabolism in *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. *Curr. Microbiol.* 1: 141 - 144, 1978.
21. Chomakov, K.H. and Kirov, N.: Lactic acid bacteria in raw milk white cheese. *Dairy Sci. Abs.* 37: 134, 1975.
22. Chow, J.J., Batt C.A. and Sinskey, A.J.: Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* bacteriophage ch2. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1138 - 1142, 1988.
23. Cluzel, P.-J. Serio, J. and Accolas, J.-P.: Interactions of *Lactobacillus bulgaricus* temperate bacteriophage O448 with host strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1850 - 1854, 1987.
24. Cogan, T.M. and Accolas, J.P.: Starter cultures: Types, metabolism and bacteriophage. *Dairy microbiology. Vol. 1. The microbiology of milk.* Robinson, R.K. (Ed.). Elsevier App. Sci. N.Y. (1989). pp. 77 - 113.
25. Collins, E.B.: Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. *J. Dairy Sci.* 55: 1022 - 1028, 1972.
26. Davies, F.L. and Gasson, M.J.: Reviews of the progress of dairy science: Genetics of lactic acid bacteria. *J. Dairy Res.* 48: 363 - 374, 1981.
27. Dellaglio, F., Bottazzi, V. and Trovarelli, L.D.: DNA homology and base composition in some thermophilic lactobacilli. *J. Gen. Microb.* 74: 289 - 297, 1978.

28. Delley, M., Mollet, B. and Hottinger, H.: DNA probe for *Lactobacillus delbrueckii*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1967 - 1970, 1990.
29. de Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E.: A medium for the cultivation of lactobacilli. J. App. Bacteriol. 23: 130 - 135, 1960.
30. de Vos, W.M. and Simmons, G.: Molecular cloning of lactose genes in dairy streptococci. The phospho-Beta-galactosidase and Beta-galactosidase genes and their expression products. Biochimie. 70: 461 - 465, 1988.
31. Doelle, H.W.: Basic metabolic processes, in the Biotechnology. Vol.1. Microbial fundamentals. Rehm, and Reed, G. (Eds.). Verlag - Chemie. (1981). pp. 136 - 186.
32. Dupuy, P. and Mocquot, G.: Culture d'un lactobacille sur lait irradié. Intern. J. App. Radiation Isotopes. 15: 255 - 256, 1964.
33. Fitzgerald, G.F. and Gasson, M.J.: In vivo gene transfer systems and transposons. Biochimie. 70: 489 - 492, 1988.
34. Forsman, P. and Alatossava, T.: Genetic variation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* bacteriophages isolated from cheese processing plants in Finland. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1805 - 1812, 1991.
35. Frazier, W.C. y Wsthoff, D.C.: Microbiología de los alimentos. Acribia. Zaragoza. (1985). pp. 49 - 378.
36. Fryer, T.F.: Microflora of Cheddar cheese and its influence on cheese flavor. Dairy Sci. Abs. 31: 471 - 474, 1969.
37. Garvie, E.I.: The production of L (+) and D (-) lactic acid in cultures of some lactic acid bacteria with special study of *Lactobacillus acidophilus* NCDO2. J Dairy Res. 34: 31 - 38, 1967.
38. Gasser, F. and Mandel, M.: DNA base composition of genus *Lactobacillus*. J. Bacteriol. 96, 580 - 588, 1968.
39. Gasser, F., Mandel, M. and Rogosa, M.: *Lactobacillus jensei* sp. nov. a new representative of subgenus *Thermobacterium*. J. Gen. Microb. 62: 219 - 222, 1970.
40. Gibson, E.M., Chace, N.M., London, S.B. and London, J.: Transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance from streptococci to lactobacilli. J. Bacteriol. 137: 614 - 619, 1979.
41. Gilliland, S.E.: Flavor intensification with concentrated cultures. J. Dairy Sci. 55: 1028 - 1031, 1985.

42. Gilliland, S.E. and Lara, R. C.: Influence of storage at freezing and subsequent refrigeration temperatures on Beta-galactosidase activity of Lactobacillus acidophilus. Appl. Environ. Microbiol. 54: 898 - 902, 1988.
43. Gilliland, S.E., Nelson, C.R. and Maxwell, C.: Assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus. Appl. Environ. Microbiol. 49: 377 - 381, 1985.
44. Gilmur, A. and Rowe, M.T.: Milk associated microorganisms. in: Dairy microbiology. Vol.I. The microbiology of milk. Robinson, R.K. (Ed.). Elsevier App. Sci.N.Y. (1989). pp. 174 - 187.
45. Hammer, B.W.: Dairy bacteriology. John Wiley & Sons, Inc. N.Y. (1959). pp. 40 - 445.
46. Harper, W.J.: Chemistry of cheese flavors. J. Dairy Sci. 42: 207 - 213, 1959.
47. Hernández, M., Chávez, A. y Bourges, H.: Valor nutritivo de los alimentos mexicanos. Instituto Nacional del Nutrición. (1987). pp. 18, 27.
48. Hofer, F.: Involvement of plasmid in lactose metabolism in Lactobacillus casei suggested by genetic experiments. FEMS Microbiol. Lett. 1: 167 - 170, 1977.
49. Hutkins, R.W., Ellefson, W.L. and Kashket, E.R.: Betaine transport imparts osmotolerance on a strain of Lactobacillus acidophilus. Appl. Environ. Microbiol. 53, 2275 - 2281, 1987.
50. Ikeda, K.: On a new seasonig. J. Tokyo Chem. Soc. 30: 820 - 826, 1989.
51. Jensen, J.P., Reinbold, G.W., Washman, C.J. and Vadamuthu, E.R.: Role of enterococci in Cheddar cheese: proteolytic activity and development. J. Milk Food Tech. 38: 3 - 8, 1975.
52. Jewell, J.B. and Kashet, E.R.: Osmotically regulated transport of proline by Lactobacillus acidophilus IFO 3532. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2829 - 2833, 1991.
53. Joerger, M.C. and Klaenhammer, T.R.: Cloning, expression and nucleotid sequence of the Lactobacillus helveticus 481 one encoding the bacteriocin helveticin J.J. Bacteriol. 172: 6339 - 6347, 1990.
54. Jootsen, H.M.L.J., and Northolt, M.D.: Detection, growth, and amine-producing capacity of lactobacilli in cheese. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2356 - 2359, 1989.

55. Kandler, O. and Weiss, N.: Regular, nonsporing, gram-positive rods: *Lactobacillus*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. V. 2. Sneath, P.H.A., Mair, N., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (Eds.). The Williams & Wilkins Co. Baltimore. (1986). pp. 1209 - 1234.
56. Kilara, a. and Shahani, K.M.: Lactic fermentation of dairy foods and their biological significance. *J. Dairy Sci.* 61: 1793 - 1797, 1989.
57. Kilara, A. and Trékl, N.: Use of lactobacilli in foods: Unique benefits. *Dev. Ind. Microbiol.* 25: 125 - 138, 1984.
58. Kim, S.F., Baek, S.J. and Pack, M.Y.: Cloning and nucleotide sequence of the *Lactobacillus casei* lactate dehydrogenase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2413 - 2417, 1991.
59. Klaenhammer, T.R.: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70: 337 - 349, 1988.
60. Knox, K.W.: Isolation of group specific products from *Lactobacillus casei* and *L. casei* var. *rhamnosus*. *J. Gen. Microb.* 31: 59 - 72, 1963.
61. Kojic, M., Fira, D., Banina, A. and Topisirovic, L.: Characterization of the cell wall-bound proteinase of *Lactobacillus casei* HN14. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1753 - 1757, 1991.
62. Kok, J. nad Venema, H.: Genetics of proteinases of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70: 475 - 480, 1988.
63. Kosikowski, F.V.: New development in milk and cheese fermentation processes. In: 8th. Ann. Symp. N.Y. State Agr. Exp. Stn. Spec. Rep. 16 April (1974).
64. Kosikowski, F.V.: Cheese and fermented milk foods. Kosikowski & Associates. Brooktondale, N.Y. (1977). pp. 37 - 445.
65. Kunkee, R.E.: Maio-lactic fermentation. *Adv. App. Microb.* 9: 235 - 279, 1967.
66. La Grange, W.S. and Goering, D.H.: Biotechnology in influencing the dairy industry. *Dairy Food Environ. Sanitation.* 11: 137 - 137, 1991.
67. Langsrud, T. and Reinbold, G.W.: Flavor development and microbiology of Swiss cheese: a review. I. Milk quality and treatments. *J. Milk Food Technol.* 36: 487 - 491, 1973a.
68. Langsrud, T. and Reinbold, G.W.: Flavor development and microbiology of Swiss cheese. a review. II: Starters, manufacturing processes and procedures. *J. Milk Food Technol.* 36: 531 - 543, 1973b.

69. Langsrud, T. and Reinbold, G.W.: Flavor development and microbiology of Swiss cheese. a review. III. Ripening and flavor production. J. Milk Food Tech. 37: 26 - 42, 1974.
70. Langsrud, T. and Reinbold, G.W.: Flavor development and microbiology of Swiss cheese. a review. IV. Defects. J. Milk Food Tech. 37: 26 - 42, 1974.
71. Ledezma, O.V. de Ruiz Holgado, A.P., Oliver, G., de Giori, G.S., Rainbaud, P. and Galpin, J.V.: A synthetic medium for comparative studies of lactobacilli. J. App. Bacteriol. 42: 123 - 133, 1977.
72. Lee, L.-J., Hansen, J.B. Jaquoztyn-Krynicka, E.K. and Chassy, B.M.: Cloning and expression of the Beta-D-phospho-galactosidase gene of *Lactobacillus casei* in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 152: 1138 - 1141, 1982.
73. Lee-Wickner, L.J. and Chassy, B.M.: production and regeneration of *Lactobacillus casei* protoplasts. Appl. Environ. Microbiol. 48: 994 - 997, 1984.
74. Lehninger, A.L.: Bioquímica. Ediciones Omega. Barcelona. (1988). pp. 427 - 450.
75. London, J.: The ecology and taxonomic status of the lactobacilli. Ann. Rev. Microb. 30: 279 - 301, 1976.
76. Luchansky, J.B., Kleeman, E.G. Raya, R.R. and Klanehammer, T.R.: Genetic transfer systems for delivery of plasmid DNA to *Lactobacillus acidophilus* ADH: Conjugation, electroporation and transduction. J. Dairy Sci. 72: 1408 - 1417, 1989.
77. Mandelstan, J., McQuillen, K. and Dawes, I.: Class I reactions: supply of carbon skeletons. in: Biochemistry of bacterial growth. Blakwell Sci. Pub. Oxford. (1982). pp.125 - 132.
78. Marth, E.H.: Microbiological and chemical aspects of Cheddar cheese ripening. a review. J. Dairy Sci. 46:869 - 890, 1987.
79. McKay, L.L.: Genetic engineering of lactic starter cultures.in: Biotechnology and food quality. Proceedings of first international symposium. Shain-dow, K., Bills, D.D. and Quatrano, R. (Eds.). Buutterworths, Maryland. (1989) pp. 317 - 355.
80. Miller, A. III., Sandine, W.E. and Elliker, P.R.: DNA homology in the genus *Lactobacillus*. Can. J. Microb. 625 - 634, 1978.
81. Mocquot, G. and Hurel, C.: The selection and use of microorganisms for the manufacture of fermented and acidified milk products. J. Soc. Dairy Tech. 23: 130 - 142, 1970.

82. Moon, N.J. and Reinbold, G.W.: Commensalism and competition in mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. J. Milk Food Tech. 39: 337 - 341, 1978.
83. Morelli, L., Cocconcilli, P.S., Bottazzi, V., Damiani, G., Ferretti, L. and Sgarrella, V.: Lactobacilli protoplast transformation. Plasmid. 17: 73 - 75, 1987.
84. Mortvedt, C.I. and Nes, I.F.: Plasmid-associated bacteriocin production by a *Lactobacillus sake* strain. J. Gen Microbiol. 136: 1601 - 1607, 1990.
85. Mortvedt, C.J., Nissen-Meyer, J. Sletten, K. and Nes, I.F.: Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1829 - 1834, 1991.
86. Muriana, P.M. and Klaenhammer, T.R.: Conjugal transfer of plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. Appl. Environ. Microbiol. 53: 553 - 560, 1987.
87. Muriana, P.M. and Klaenhammer, T.R.: Cloning, phenotypic expression and DNA sequence of the gene for lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. J. Bacteriol. 173: 1779 - 1788, 1991.
88. Peake, S.E. and Stanley, G.: Partial characterization of a bacteriophage of *Lactobacillus bulgaricus* isolated from yogurt. J. App. Bacteriol. 44: 321 - 323, 1978.
89. Pederson, C.S.: Microbiology of food fermentation. AVI Pub. Co. N.Y. (1971). pp. 66 - 265.
90. Pelcksar, M.J. y Chan, E.C.S.: Características de géneros seleccionados de microorganismos. en: Elementos de microbiología. McGraw Hill. México. (1984). pp.710.
91. Pérez Gavilán Escalante, J. y Pérez Gavilán Escalante, J.P.: Bioquímica y microbiología de la leche. Limusa. México. (1984). pp. 93 - 195.
92. Phillips, B.A., Latham, M.J. and Sharpe, M.E.: A method for freeze drying rumen bacteria and other strict anaerobes. J. Appl. Bacteriol. 38: 319 - 322, 1975.
93. Posno, M., Leer, R.J., van Luijk, N. van Giezen, M.J.F., Heuvelmans, P.T.H.M., Lokman, B.C. and Pouwels, P.H.: Incompatibility of *Lactobacillus* vectors with replicons derived from small cryptic *Lactobacillus* plasmids and segregational instability of the introduced vectors. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1822 - 1828, 1991.

94. Poznanski, S.E., Kornacki, K., Smietana, S., Rymaszewski, J., Sarazynski, A. and Chojnowski, W.: New method for lactic acid manufacture using ion exchangers. Dairy Sci. Abs. 36: 222, 1974.
95. Prescott, S.C. and Dunn, C.G.: Industrial microbiology. McGraw Hill Book Co. N.Y. (1979).
96. Prince, W.V. and Bush, M.G.: The process cheese industry in the U.S.A.: a review. I. Industrial growth and problems. J. Milk Food Tech. 37: 135 - 153, 1974a.
97. Prince, W.V. and Bush, M.G.: The process cheese industry in the U.S.A.: a review. II. Research and development. J. Milk Food Tech. 37: 179 - 199, 1974b.
98. Poznanski, S.E., Kornacki, K., Smietana, S., Rymaszewski, J., Saranski, A. and Chojnowski, W.: New method for lactic acid manufacture using ion exchangers. Dairy Sci. Abs. 36: 222, 1994.
99. Raya, R.R., Kleeman, E.G., Luchansky, J.B. and Klaenhammer, T.R.: Characterization of the temperate bacteriophage adh and plasmid transduction in *Lactobacillus acidophilus* ADH. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2206 - 2213, 1989.
100. Reiter, B.: Antimicrobial systems in milk. J. Dairy Res. 45: 131 - 147, 1978.
101. Rengpipat, S. and Johnson, E.A.: Characterization of a *Lactobacillus* strain producing white crystals on Cheddar cheese. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2579 - 2582, 1989.
102. Reyes-Gavilán, C.G., Limsowtin, G.K.Y. Séchaud, L., Veaux, M, and Accolas, J.-P.: Evidence for plasmid-linked restriction-modification system in *Lactobacillus helveticus*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 3412 - 3419, 1990.
103. Rizzo, A.F., Korkeala, H. and Mononen, I.: Gas chromatography of cellur fatty acids and neutral monosaccharides in the identification of lactobacilli. 53: 2883 - 2888, 1987.
104. Robinson, R.K. and Tamime, A.Y.: Fermented milks. in: Dairy microbiology. Vol.II. The microbiology of milk products. Robinson, R.K. (Ed.). Elsevier App. Sci. (1989) pp.250 - 270.
105. Rodríguez Blanco, A.R.: Elaboración de una bebida láctea fermentada tipo yakult, empleando suero dulce desmineralizado. Tesis U.L.S.A. México, 1990.
106. Rogosa, M.: Character used in classification of lactobacilli. Intern. J. Sys. Bacteriol. 20: 519 - 533, 1970.

107. Rogosa, M., Franklin, J.G. and Perry, K.D.: Correlation of the vitamin requirements with cultural and biochemical character of *Lactobacillus* sp. J.Gen. Microb. 25: 473 - 482, 1961.
108. Rogosa, M., Mitchell, J.A. and Weisman, R.F.: A selective medium for isolation and enumeration of oral and faecal lactobacilli. J. Bacteriol. 62: 132 - 133, 1951.
109. Rogosa, M. and Sharpe, M.E.: An approach to the classification of the lactobacilli. J. App. Bacteriol. 22: 329 - 340, 1959.
110. Sanders, M.E.: Phage resistance in lactic acid bacteria. Biochimie. 70: 411 - 414, 1988.
111. Sandine, W.E., Daly, E.C. and Elliker, P.R.: Causes and control of cultured-related flavor defects in cultured dairy products. J. Dairy Sci. 55: 1031 - 1039, 1973.
112. Sands, D.C. and Hankin, L.: Fortification of foods by fermentation with lysine-excreting mutants of lactobacilli. J. Agric. Food Chem. 24: 1104 - 1106, 1976.
113. Séchaud, L., Cluzel, P.-J., Rousseau, M., Baumgartner, A. and Accolas, J.-P.: Bacteriophages of lactobacilli. Biochimie. 70: 401 - 410, 1988.
114. Séchaud, L., Rousseau, M., Fayard, B., Callegari, M.L., Quééné, P. and Accolas, J.-P.: Comparative study of 35 bacteriophages of *Lactobacillus helveticus*: Morphology and host range. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1011 - 1018, 1992.
115. Shahanij, K.M., Vakil, J.R. and Kilara, A.: Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *L. bulgaricus*. II. Isolation of acidophilin form *L. acidophilus*. Cultured Dairy Products J. 12: 8 - 11, 1977.
116. Sharpe, M.E.: Enumeration and classification studies of lactobacilli in food products. Dairy Sci. Abs. 24: 109 - 110, 1962.
117. Sharpe, M.E.: The genus *Lactobacillus* in: The prokaryotes. A handbook on habits, isolation and identification of bacteria. Vol. II. Sarr. M.P., Stolp, H., Trüper, H., Balows, A. and Schlegel, H.G. (Eds.). Springer-Verlag. Berlin, N.Y. (1983). pp. 1653 - 1679.
118. Sharpe, M.E. and Dellaglio, F.: DNA homology in anaerobic lactobacilli and possible related species. J. Sys. Bacteriol. 27: 19 - 21, 1977.
119. Shimizu-Kadota, M.: Properties of lactose plasmid pLY101 in *Lactobacillus casei*. Appl. Environ. Microbiol. 53: 2987 - 2991, 1987.
120. Shimizu-Kadota, M., Kiwaki, M., Horokawa, H. and Tsuchida, N.: ISL 1: A new transposable element in *Lactobacillus casei*. Mol. Gen. Genet. 200: 193 - 198, 1985.

121. Shimizu-Kadota, M. and Sakurai, T.: Prophage curing in *Lactobacillus casei* by isolation of a thermoinducible mutant. Appl. Environ. Microbiol. 43: 1284 - 1287, 1982.
122. Shimizu-Kadota, M. and Sakurai, T. and Tsuchida, N.: Prophage origin of a virulent phage appearing on fermentations of *Lactobacillus casei* S-1. App. Environ. Microbiol. 45: 669 - 674, 1983.
123. Shimohashi, H. and Mutal, M.: Specific antigens of *Lactobacillus acidophilus*. J. Gen. Microb. 103: 337 - 344, 1977.
124. Smiley, M.B. and Fryder, V.: Plasmids, lactic acid production and N-acetyl-D-glucosamide fermentation in *Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti*. Appl. Environ. Microbiol. 35: 777 - 780, 1978.
125. Smith, W. and Emery, H.C.: Public health concerns of yogurt and other fermented milk products. Dairy Food Sanitation. &: 10 - 11, 1986.
126. Speck, M.L.: Control of food-borne pathogens by starter cultures. J. Dairy Sci. 55: 1019 - 1023, 1972.
127. Sungmin, F.K., Seung, J.B. and Pack, M.Y.: Cloning and nucleotide sequence of *Lactobacillus casei* lactate dehydrogenase gene. Appl. Environ. Microbiol. 57: 2413 - 2417, 1991.
128. Takiguchi, R., Hashiba, H., Aoyama, K. and Ishii, S.: Complete nucleotide sequence and characterization of a cryptic plasmid form *Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti*. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1653 - 1655, 1989.
129. Tannock, G.W.: Conjugal transfer of plasmid pAM-Beta-1 in *Lactobacillus reuteri* and between lactobacilli and *Enterococcus faecalis*. Appl. Environ. Microbiol. 53: 2693 - 2695, 1987.
130. Terzaghi, B.E. and Sandine, W.E.: Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Appl. Microbiol. 29: 807 - 813, 1975.
131. Toba, T.Y., Tomota, T.I. and Adachi, S.: Beta-Galactosidase of lactic acid bacteria: Characterization by oligosaccharide formed during hydrolysis of lactose. J. Dairy Sci. 64: 185 - 188, 1981.
132. Trépanier, G., Simard, R.E. and Lee, B.H.: Effect of added lactobacilli on composition and texture of Cheddar cheese during accelerated maturation. J. Food Sci. 56: 696 - 700, 1991.
133. Vedamuthu, E.R.: The yogurt story - Past, present and future. I. Dairy Food Environ. Sanitation. 2: 265 - 267, 1991a.

134. Vedamuthu, E.R.: The yogurt story - Past, present and future. II. Dairy Food Environ. Sanitation. 2: 265 - 267, 1991b.
135. Vedamuthu, E.R.: The yogurt story - Past, present and future. III. Dairy Food Environ. Sanitation. 2: 310 - 311, 1991c.
136. Vedamuthu, E.R.: The yogurt story - Past, present and future. IV. Dairy Food Environ. Sanitation. 2: 371 - 374, 1991d.
137. Vedamuthu, E.R. and Washman, C.: Cheese. in: Biotechnology. Vol. 5. Food and feed production with microorganisms. Rehm, H.V. and Reed, G. (Eds.). Verlag - Chhemie. Berlin, N.Y. (1983). pp. 243 - 273.
138. Vescovo, M., Morelli, L. and Bottazzi, V.: Drug resistance plasmids in *Lactovocillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri*. Appl. Environ. Microbiol. 43: 50 - 56, 1982.
139. Vescovo, M., Morelli, L., Bottazzi, V., and Gasson, M.J.: Conjugal transfer of broad-host-range plasmid pAM-Beta-1 into enteric species of lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 46: 753 - 755, 1983.
140. Vincent, G.J., Veomett, R.C. and Riley, R.F.: Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. J. Bacteriol. 78: 477 - 484, 1959.
141. Watanabe, K., Hayashida, M., NAKASHIMA, Y. and Hayashi, S.: Preparation and regeneration of bacteriophage PL-1 enzyme-induced *Lactobacillus casei* protoplasts. Appl. Environ. Microbiol. 53: 2686 - 2688, 1987.
142. Whitaker, J.R.: The glycoside hydrolases. in: Food science. Vol. II. Principles of enzymology for the food science. Fennema, O.R. (ED:). Marcel Dekker Inc. N.Y. (1972). pp. 462 - 465.
143. Wilkinson, J.F. and Rose, A.H.: Fermentation processes. in: Biochemistry of industrial microorganisms. Rainbow, C. and Rose, A.H. (Eds.). Academic Press. N.Y. (1963). pp. 377 - 403.
144. Williams, R.A.D.: Cell wall composition and enzymology of lactobacilli. J. Dental Res. 50: 1104 - 117, 1971.
145. Yokokura, T.S., Kodaira, H., Ishiwa, H. and Sakurai, T.: Lysogeny in Lactobacilli. J.Gen. Microbiol. 84: 277 - 284, 1974.
146. Zamula, E.: Beyond yogurt: Milking the public's taste for exotic health foods. Dairy Food Sanitation. 1: 336 - 338, 1987.