



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
" ZARAGOZA "

"INDUSTRIALIZACION DE LA LECHE CON
Streptococcus cremoris Y Streptococcus lactis"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Químico Farmacéutico Biólogo

P R E S E N T A :

FILOGONIO FUENTES RAMIREZ

México, D. F.

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



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.

CONTENIDO

Página

INTRODUCCION

1. Fundamentación del tema.

1.1. Antecedentes.	3
1.1.1. Aspectos históricos.	
1.1.2. Definición de Iniciadores Lácticos (I.L.)	
1.1.3. Funciones de los I.L. en la industria láctea.	
1.1.4. Productos lácteos que se obtienen con el empleo de los I.L.	4
1.2. Taxonomía de Estreptococos Lácticos (E.L.)	7
1.2.1. Morfología	
1.2.2. Características de los E.L.	
1.2.3. Hábitat de los E.L.	
1.3. Clasificación de los I.L.	8
1.3.1. Clasificación de los I.L. en base a su fisiología.	
1.4. Metabolismo de bacterias lácticas.	14
1.4.1. Metabolismo de la lactosa por los E.L.	
1.4.1.1. Regulación de rutas y formación de productos finales.	17
1.4.2. Compuestos volátiles producidos por bacterias lácticas.	19
1.4.3. Proteólisis de la caseína de la leche -- por los E.L.	20
1.4.3.1. Relación entre los plúsmidos y la actividad proteolítica de los E.L.	21
1.4.3.2. Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad proteolítica de cepas Prt ⁻ de E.L.	
1.4.3.3. Selección de cepas Prt ⁺ y Prt ⁻ .	23
1.4.3.4. Medición de la proteólisis.	

1.5. Utilización de grasas por los E.L.	23
1.6. Algunos aspectos nutricionales de los E.L.	24
1.6.1. Requerimiento de bases nitrogenadas.	
1.6.2. Requerimiento de sales.	25
1.6.3. Requerimiento de nitrógeno amínico.	
1.6.4. Requerimiento de vitaminas.	26
1.7. Medios de cultivo a base de agar para E.L.	27
1.8. Factores fisicoquímicos para el crecimiento de los E.L.	28
1.8.1. pH del medio.	
1.8.2. Temperatura óptima de crecimiento de -- E.L.	
1.8.3. Anaerobiosis durante el crecimiento de -- los E.L.	29
1.9. Producción de acidez por los E.L.	31
1.9.1. Métodos para valorar la acidez (actividad).	
1.9.1.1. Métodos cualitativos para valorar la -- actividad.	32
1.9.1.2. Métodos analíticos para la cuantificación de la actividad.	
1.9.2. Factores que afectan los resultados de -- una prueba de actividad.	33
1.10. Producción y conservación de cultivos de I.L.	35
1.10.1. Métodos de producción de E.L. a nivel -- industrial.	36
1.10.1.1. Cultivo por difusión.	
1.10.1.2. Cultivo continuo.	
1.10.1.3. Cultivo por lote.	37
1.11. Métodos de conservación de E.L.	38
1.11.1. Conservación de E.L. por refrigeración.	
1.11.2. Conservación de los E.L. por liofilización.	39
1.12. Presentaciones comerciales de los cultivos de I.L.	40

2. Planteamiento del problema.	42
3. Objetivo.	
4. Hipótesis de trabajo.	43
5. Métodos y materiales.	44
5.1. Métodos	
5.1.1. Preparación de los medios de cultivo	45
5.1.1.1. Agar Reddy	
5.1.1.2. Leche descremada con tornasol (Difco).	
5.1.1.3. Agar APT (Merck).	46
5.1.1.4. Medio de caseinato de sodio	
5.1.2. Preparación del inóculo.	47
5.1.3. Condiciones de cultivo.	
5.1.4. Actividad	48
5.1.5. Conteo de colonias	
5.1.6. Conservación de los caldos de fermentación.	
5.2. Equipo	49
5.3. Material biológico.	
6. Desarrollo experimental.	50
7. Resultados y discusión de resultados.	51
8. Conclusiones.	72
9. Bibliografía.	74.

INDICE DE FIGURAS

Fig.	Página
1. Cinética de crecimiento de <u>Streptococcus cremoris</u> NCDO 924.	52
2. Cinética de crecimiento de <u>Streptococcus cremoris</u> NCDO 924.	53
3. Cinética de crecimiento de <u>Streptococcus lactis</u> NCDO 712.	54
4. Cinética de crecimiento de <u>Streptococcus lactis</u> NCDO 712.	55
5. Actividad de <u>Streptococcus cremoris</u> NCDO 924	57
6. Actividad de <u>Streptococcus lactis</u> NCDO 712.	58
7. Viabilidad de <u>Streptococcus cremoris</u> NCDO 924 respecto al tiempo de almacenamiento.	60
8. Viabilidad de <u>Streptococcus cremoris</u> NCDO 924 respecto al tiempo de almacenamiento.	61
9. Viabilidad de <u>Streptococcus lactis</u> NCDO 712 respecto al tiempo de almacenamiento.	62
10. Viabilidad de <u>Streptococcus lactis</u> NCDO 712 respecto al tiempo de almacenamiento.	63

11. Actividad de Streptococcus cremoris NCDO 924
respecto al tiempo de almacenamiento. 66
12. Actividad de Streptococcus cremoris NCDO 924
Respecto al tiempo de almacenamiento. 67
13. Actividad de Streptococcus lactis NCDO 712
Respecto al tiempo de almacenamiento. 68
14. Actividad de Streptococcus lactis NCDO 712.
Respecto al tiempo de almacenamiento. 69

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Iniciadores Lácticos mesófilos y termófilos utilizados en la industria láctea.	5
2. Isómeros del ácido láctico producidos por las bacterias lácticas.	9
3. Diferenciación de bacterias lácticas en base a sus propiedades metabólicas.	10
4. Diferenciación para estreptococos, pediococos y leuconostoc.	11
5. Propiedades de Estreptococos Lácticos (E.L.) importantes en quesos y leches fermentadas encontradas en las mismas condiciones.	12
6. Algunos Iniciadores Lácticos de interés industrial.	13
7. Ruta de degradación de la lactosa por E.L.	16
8. Algunos compuestos producidos por los I.L.	19
9. Ventajas y desventajas que tiene el uso de cepas poco proteolíticas (Pr ⁻) de <u>S. lactis</u> y <u>S. cremoris</u> .	22

10. Requerimiento de aminoácidos en $\mu\text{g/ml}$. de medio para el crecimiento de 2 ó más cepas de E.L. y cantidades encontradas en la leche y el suero - de queso.	26
11. Algunos procedimientos utilizados para determinar la acidez titulable de la leche.	34
12. Resultados.	70
13. Tiempos de duplicación de <u>S. cremoris</u> y -- - <u>S. lactis</u> en fermentador de 1 litro y 14 litros en medio con caseinato de sodio.	71

INTRODUCCION:

Hace ya algunos siglos, el hombre sabía que la leche se acidificaba y coagulaba por almacenamiento a temperatura ambiente y que con ello su putrefacción no era fácil. Con ello reconoció en este proceso a una forma de conservar este producto. En el siglo XIX algunos microbiólogos se interesaron en la bacteriología de la leche fermentada y aislaron a las bacterias responsables de los cambios que ocurren en la leche. Como resultado de estas investigaciones ha sido posible desarrollar algunas técnicas y escalar procesos para la producción de leches fermentadas con ciertas propiedades organolépticas.

La industria láctea es afortunada al tener como materia prima un alimento natural como es la leche, que puede ser transformada fácil y relativamente a bajo costo en productos con calidad nutritiva superior a través de los iniciadores lácticos (I.L.). Los cultivos de I.L. (Sellard, 1981), son los únicos bioconvertidores de energía empleados para la conversión de la leche en sus productos, cuando son aplicados correctamente son capaces de elaborar metabolitos específicos durante la fermentación. Estos metabolitos en conjunción con la hidrólisis parcial de la leche (sus proteínas, grasas y carbohidratos), contribuyen a una mejor digestibilidad del producto terminado ya que en éste quedan incluidas algunas enzimas, sobresaliendo las proteolíticas y la lactasa que facilitan su asimilación.

Parece ser que Hueppe (1884), fué el primero en utilizar el nombre trivial de "Iniciadores Lácticos" para designar a la flora causante de la acidificación de la leche y productos lácteos. Durante la manufactura de quesos industrializados, las bacterias de los cultivos de I.L. participan en la texturización de la cuajada y además confieren un sabor ácido, fresco y distintivo de la variedad de producto de que se trate. La producción de compuestos volátiles es deseable en algunos casos ya que confieren al producto final, sabores y olores que son apreciados en algunas regiones del mundo.

Actualmente los métodos tradicionales de manufactura de productos lácteos se han visto superados por otros, --

científicamente controlados y que han sido desarrollados en los países industrializados que, debido a su potencial económico han podido exportar sus productos, su tecnología y sus gustos que de alguna manera han sido bien acogidos en otros países como el nuestro, cayendo de esta manera en otro tipo de dependencia tecnológica.

Los cultivos de iniciadores lácticos que se usan en el mundo provienen de compañías europeas, de USA, Inglaterra y en menor extensión de Nueva Zelanda, Australia y de institutos de investigación. Las fuentes de obtención de iniciadores han cambiado muy poco con los años, pero los avances en la tecnología de iniciadores y su producción han mejorado notablemente. Su producción se ha diversificado y hoy día se pueden adquirir I.L. comercialmente bajo formas liofilizadas y congeladas en distintas versiones (Robinson, 1982).

Los estreptococos lácticos (E.L.), pertenecen al -- grupo de I.L. y han hecho de la leche su hábitat natural, al grado de que las cepas con mejores características se han -- aislado de las plantas que industrializan la leche. Siendo -- la leche un alimento complejo, se puede también tener idea -- de lo complejo que resulta satisfacer las necesidades nutricionales de éstos microorganismos cuando se les cultiva como cepas puras. Los E.L. muestran estabilidad metabólica sólo -- cuando crecen en simbiosis con la flora de referencia de la leche por lo que su empleo constante implica una renovación de las cepas empleadas en forma también constante.

El papel que tienen los I.L. dentro de la industria láctea es de tal importancia que sólo basta pensar que de -- ellos pende todo proceso orientado a la producción de derivados de leche fermentados y con ello toda la derrama económica que origina.

1. Fundamentación del tema:

1.1 Antecedentes:

1.1.1. Aspectos históricos.

Streptococcus lactis (Sherman, 1955), fué el primer estreptococo estudiado y reportado por Lord Lister en 1878. Este microorganismo se aisló de la leche y denominado Bacterium lactis. S. lactis se identifica debido a que reduce el tornasol antes de que la leche coagule, propiedad que se correlaciona con una fuerte acción reductora. En 1918, se encontró además de la característica antes mencionada, el -- rango de temperatura de crecimiento de este microorganismo y que se encuentra entre los 10 y los 45°C, combinación que raramente aparece entre las bacterias. Streptococcus cremoris deja de crecer a los 37°C y no hidroliza la arginina, siendo en general, más delicado que S. lactis. Hacia el año 1955, -- ya se tenía conocimiento del metabolismo de estos iniciadores lácticos, de su nutrición, de los antibióticos que producen y del fenómeno de los bacteriófagos, actualmente y debido a los grandes avances tecnológicos se ha desarrollado toda una "Tecnología de Iniciadores Lácticos" y es posible aislar una cepa, identificarla, probarla y hasta mejorarla genéticamente en cuestión de días.

1.1.2. Definición de Iniciadores Lácticos.

Con este nombre se conoce a una amplia variedad de microorganismos cuya característica principal es la de producir ácido láctico a partir de una fuente de carbohidratos fácilmente fermentable (Stamer, 1979).

1.1.3. Funciones de los iniciadores lácticos en la industria láctea. (Robinson, 1981).

- i. Producir ácido láctico como resultado de la fermentación de la lactosa, impartiendo con ésto un sabor distintivo, ácido y fresco a las leches fermentadas.

El ácido láctico es importante para la coagulación de la leche y el texturizado de la cuajada.

- ii. Producir compuestos volátiles como el dia cetilo y el acetaldehído, que contribuyen al sabor de los productos lácteos.
 - iii. Producir proteasas y lipasas importantes durante la maduración de algunos tipos de queso.
 - iv. Producir otros compuestos útiles en otro tipo de bebidas como por ejemplo el alcohol en la manufactura de kefir y kumiss.
 - v. Prevenir el desarrollo de patógenos en los productos lácteos como resultado de la inhibición de su crecimiento por efecto del lactato producido, así como de organismos que causan su descomposición.
- 1.1.4. Productos lácteos que se obtienen con el empleo de los Iniciadores Lácteos.

Los I.L. son utilizados por la industria láctea para la producción de queso, mantequilla, crema, leche agria, caseína, yoghurt, -- Biogurt y otras leches fermentadas como el Kefir, Kumys y el skyr. Para la obtención de la mayoría de estos productos, se hace necesario utilizar más de un tipo de bacteria e incluso de microorganismo.

La gran variedad de productos de leche fermentados se obtienen variando desde el tipo de microorganismo empleado hasta las condiciones mismas del proceso.

Algunos productos en los que participan S. cremoris y S. lactis aparecen en la Tabla I.

TABLA 1. Iniciadores Lácticos mesófilos y termófilos utilizados en la Industria Láctea. (Mortimer, 1981)

Composición del cultivo		Productos
I. Bacterias mesófilas		
I.1. <u>Streptococcus cremoris</u> <u>Streptococcus lactis</u>	95-98% 2-5%	Quesos sin formación de ojos, prensados y duros como el Cheddar Gouda, Edam; suaves - como el Camembert.
I.2. <u>Streptococcus cremoris</u> <u>Leuconostoc cremoris</u>	95% 5%	Queso Cottage, quarg, leches fermentadas, - quesos con ojos pequeños y escasos.
I.3. <u>Streptococcus cremoris</u> <u>S. lactis</u> subsp. <u>diacetyllactis</u> <u>S. lactis</u> <u>L. cremoris</u>	85-90% 3% 3% 5%	Igual que L.2
I.4. <u>S. cremoris</u> <u>S. lactis</u> subsp. <u>diacetyllactis</u> <u>S. lactis</u> <u>L. cremoris</u>	70-75% 15-20% 1-5% 2-5%	Mantequilla cultivada leches fermentadas, - quesos con hoyos reondos.
I.5. <u>S. lactis</u>		Leche Taette.
I.6. <u>S. cremoris</u>		Caseína.
I.7. <u>S. lactis</u> <u>Lactobacillus brevis</u> <u>Leuconostoc</u> spp.		Kefir
I.8. <u>Bifidobacterium infantis</u>		Biogurt.

II. Bacterias termófilas.

- | | | | |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------------|
| II.1. | <u>Streptococcus thermophilus</u>
<u>Lactobacillus bulgaricus</u> | 50%
50% | Yogurt |
| II.2. | <u>Streptococcus thermophilus</u>
<u>Lactobacillus helveticus</u>
<u>Lactobacillus lactis</u>
(ó <u>bulgaricus</u>)
<u>Propionibacterium spp.</u>
(opcional) | | Quesos tipo Suizo,
Emmental, Grana, -
queso Soviético. |

III. Bacterias termófilas y mesófilas mezcladas. (Robinson, 1981)

- | | | | |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------|--|-------------------------------------------------------|
| III.1. | <u>S. lactis</u> , <u>S. thermophilus</u> ó
<u>S. faecalis</u> , <u>L. bulgaricus</u> | | Quesos tipo italia-
no; Mozzarella, Pro
volone. |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------|--|-------------------------------------------------------|

I. Temperatura óptima de crecimiento: 20-30°C.

II. Temperatura óptima de crecimiento: 37-45°C.

1.2. Taxonomía de Estreptococos Lácticos (E.L.).

La importancia de conocer a éstos microorganismos, tanto en su morfología como en su metabolismo, radica en que se pueden prevenir los "defectos" que pudieran presentarse en los productos que con ellos se elaboran, dicho de otra manera y en el caso específico de los quesos, la presencia de microorganismos formadores de CO₂ por ejemplo; constituyen lo que a la postre resultaría en un defecto debido a que el producto mostraría hoyos cuando normalmente no los presenta.

1.2.1. Morfología.

Los estreptococos lácticos se presentan normalmente — como células esféricas 3 ligeramente elongadas en dirección de la cadena. Sus dimensiones son de apenas 0.5 a 1.0 μ de diámetro. Es común encontrarlos en cadenas cortas 6 en pares (Mortimer, 1981; Manual Bergey's, 9a. Ed.).

1.2.2. Características de los E.L.

Los estreptococos lácticos son micrococcos Gram positivos, pertenecen al Grupo N de Lancefield y tienen reacciones cruzadas con ciertos antisueros neumocócicos específicos, debido al ácido glicerol teicoico con galactosa fosfato que contienen. En agar sangre muestran una fuerte reacción alfa 6 γ (Bergey's Manual, 9a. Ed.).

1.2.3. Hábitat de los E.L.

En la naturaleza se les encuentra en forma silvestre — sobre material vegetal como el maíz, lechuga, coliflor, chifcharo, trigo, pasto, trébol, papa, melón, pepino y otros. — Usualmente se les ha encontrado en la saliva de las vacas y en su piel, parece ser que la infección primaria de la leche por éstos microorganismos se debe a esto. Actualmente se cuenta con aproximadamente 1,433 cepas clasificadas de S. lactis y 40 de S. cremoris (Robinson, 1981).

1.3. Clasificación de los Iniciadores Lácticos (I.L.).

Los iniciadores lácticos se pueden separar en dos grupos, uno de los cuales está integrado por microorganismos - homofermentadores y que son capaces de degradar la lactosa hasta lactato casi exclusivamente; el otro está compuesto - por los microorganismos heterofermentadores, es decir, por microorganismos que producen ácido láctico y otros subproductos del metabolismo de la lactosa. Esta particularidad - ha servido para diferenciar a algunos I.L. hasta género como puede apreciarse en las tablas 2,3 y 4 ya que incluso -- no todos los I.L. utilizan las mismas enzimas, produciendo isómeros del lactato ó mezclas de éstos en forma característ_{ica}.

Por medio de pruebas bioquímicas es posible determinar la especie como se puede apreciar en la tabla 5, en que se expone la diferenciación de S. cremoris de S. lactis. Actualmente se han clasificado dentro del grupo de los I.L. - a otros microorganismos que, sin ser bacterias homofermentadoras, también contribuyen a la elaboración de productos -- lácteos. De esta manera y sumados a las bacterias, tenemos hongos y levaduras, así como bacterias propiónicas que se - utilizan en menor escala y que se exponen en la tabla 6.

Las diferencias que muestran los microorganismos de és te heterogéneo grupo y que han servido de criterio para su clasificación son: a) Su temperatura de crecimiento; b) Los productos de fermentación; c) La morfología celular; d) El tipo de industria en la que intervienen.

1.3.1. Clasificación de los I.L. en base a su fisiología.

- 1) Heterofermentadores obligados. Son microorganismos -- que poseen la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Enzyme Commission 1.1.1.49) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa E.C. 1.1.1.43 pero carecen de la - fructosa difosfato aldolasa (E.C. 4.1.2.13).
- 2) Homofermentadores obligados. Contienen la fructosa difosfato aldolasa pero carecen de las otras - dos enzimas.
- 3) Homofermentadores facultativos. Contienen ambas - deshidrogenasas pero utilizan preferentemente la glucosa vía EMP.

Tabla 2.

Isómeros del ácido láctico producidos por las bacterias lácticas (Mortimer, 1981).

Tipo de bacterias lácticas	Isómero
Homofermentadoras:	
Lactobacillus	D, L, DL
Pediococcus	DL
Streptococcus	L(+)
Heterofermentadores:	
Leuconostoc	D(-)
Lactobacillus	DL

Tabla 3.

Diferenciación de bacterias lácticas en base a sus propiedades metabólicas. (Stamer, 1979).

Tipo de bacterias lácticas	Ruta metabólica	Enzima clave
Homofermentadoras: Lactobacillus, Pediococcus, -- Streptococcus.	I	A'
Heterofermentadoras: -- Lactobacillus, Leuconostoc.	II	A; B, C

I Hexosa difosfato (EMP); II Hexosa monofosfato.

A' Presencia de aldolasa; A Ausencia de aldolasa; B Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; C 6-fosfogluconato deshidrogenasa.

Tabla 4. Diferenciación para estreptococos, pediococos y leuconostec. (Mortimer, 1981).

Productos de fermentación de la glucosa	Géneros
1. L-(+)-ácido láctico	Streptococcus
2. D-(-)-ácido láctico, CO ₂ , ácido acético, etanol	Leuconostoc
3. DL-ácido láctico	Pediococcus

Tabla 4. Diferenciación para estreptococos, pediococos y leuconostoc. (Mortimer, 1981).

Productos de fermentación de la glucosa	Géneros
1. L-(+)-ácido láctico	Streptococcus
2. D-(-)-ácido láctico, CO ₂ , ácido acético, etanol	Leuconostoc
3. DL-ácido láctico	Pediococcus

Propiedades de *Streptococcus Lácticos* (E.L.) importantes en quesos y leches fermentadas encontradas en las mismas condiciones. (Robinson, 1981)

	<u>S. lactis</u>	<u>S. cremoris</u>
Crecimiento a 10°C	+	+
40°C	+	-
45°C	-	-
2% NaCl	+	+
4% NaCl	+	-
6.5% NaCl	-	-
Supervivencia 60°C/30 min.	-	-
Hidrólisis de arginina	+	-
Formación de ácido de:		
Arabinosa	+	-
Ribosa	+	d
Xilosa	+	-
Sorbosa	-	-
Lactosa	+	+
Maltosa	+	-
Melicitosa	+	-
Sucrosa	+	-
Tretalosa	+	-
Rafinosa	+	-
Dextrina	+	-
Manitol	+	-
Sorbitol	-	-
Esculina	+	-
Salicina	+	-
%G + C en DNA	34.5-36	34.5-35.5
Peptidoglicanos	L-Lis-D-Asp	L-Lis-D-Asp

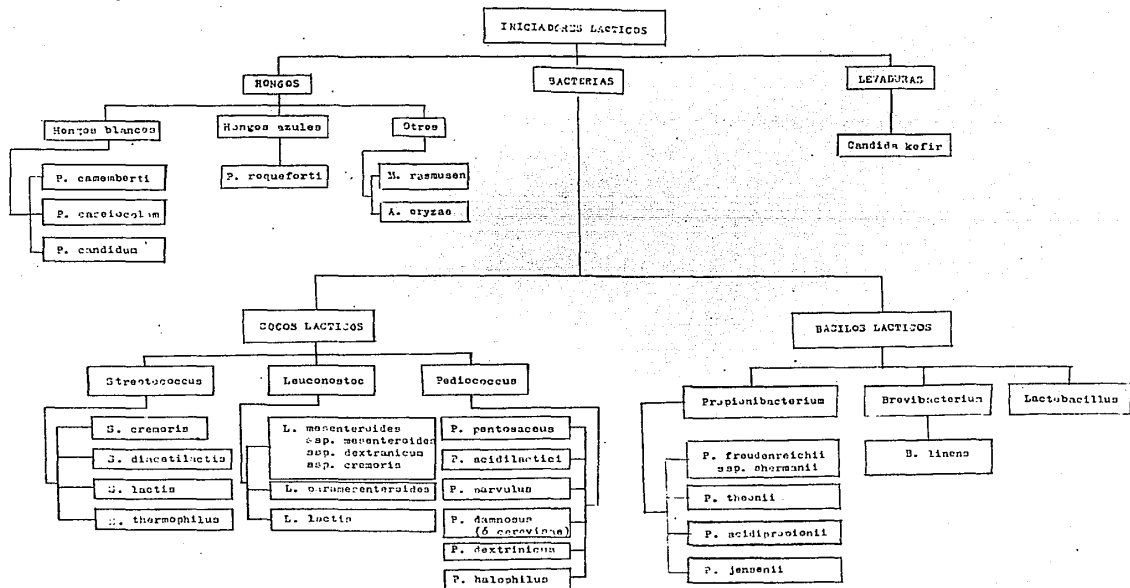
+ 90% de las cepas dan reacción positiva.

- Menos del 10% de las cepas dan reacción positiva.

+ Entre 10 y 30% de las cepas dan reacción positiva.

d Reacción desconocida.

Tabla 6. Algunos Iniciales Lácticos de interés industrial



1.4. Metabolismo de bacterias lácticas.

El aroma característico de los productos lácteos cultivados, es únicamente el resultado del metabolismo de las cepas de iniciadores lácticos utilizados (Badings, 1980). Los compuestos más importantes que producen los I.L. son: diacetilo, acetaldehído, sulfuro de dimetilo, ácido acético y ácido láctico. La combinación de éstos compuestos con los ya presentes en la leche, determinan finalmente la aceptabilidad del aroma, algunos de éstos se listan en la tabla 8.

No todos los I.L. son homofermentadores por lo que resulta fácil inferir que existen notables diferencias metabólicas entre ellos. En el caso específico de los estreptococos lácticos (E.L.), éstos son netamente homofermentadores de la lactosa y la degradan casi completamente hasta ácido láctico (Stamer, 1979). La distinción entre homofermentadores y heterofermentadores (Buyze, 1957), reside en los complementos enzimáticos asociados con la degradación fermentativa de la glucosa.

1.4.1. Metabolismo de la lactosa por los E.L.

Los E.L. son unos microorganismos capaces de producir hasta un 10% de su peso por minuto de ácido láctico a partir de la lactosa de la leche (Citti, 1965), S. Lactis ML, (Thomas, 1969), tiene una actividad glicolítica de 0.29 μ mol de lactato/mg. de bacteria en peso seco/min., es decir, es capaz de metabolizar grandes cantidades de carbohidrato en poco tiempo.

La velocidad de formación de ácido se puede ver afectada por varios factores, uno de los cuales se debe a la imposibilidad de la célula de utilizar la lactosa eficientemente por una disminución de la síntesis enzimática.

La síntesis de enzimas que degradan la lactosa se realiza por genes codificados en plásmidos. Los plásmidos son moléculas formadas con material genético y que se encuentran en la célula bacteriana completamente desligados del cromosoma, son capaces de replicarse en forma autónoma y conferir ciertas propiedades metabólicas a la célula. Las propiedades asociadas a los plásmidos son: utilización de la lactosa (-

Anderson, 1977; Kemler, 1979; Kondo, 1982, 1984, 1985; Mc. - Kay, 1973, 1974, 1976, 1978, 1982, 1984), utilización de sacarosa, glucosa, manosa y galactosa, así como otras propiedades que se discuten más adelante.

El número de copias que presentan los E.L. de genes que codifican para B-D-fosfogalactosidasa puede alcanzar -- las 20 (McKay, 1985) aunque hay cepas que sólo contienen al rededor de 10.

Se ha logrado detectar hasta 14 plásmidos de diferente peso molecular (Lyndon, 1981; McKay, 1972, 1974, 1976; Kondo, 1985) que van de los 5.5 a los 40 Md de peso molecular, algunos de los cuales son crípticos (se desconoce su función).

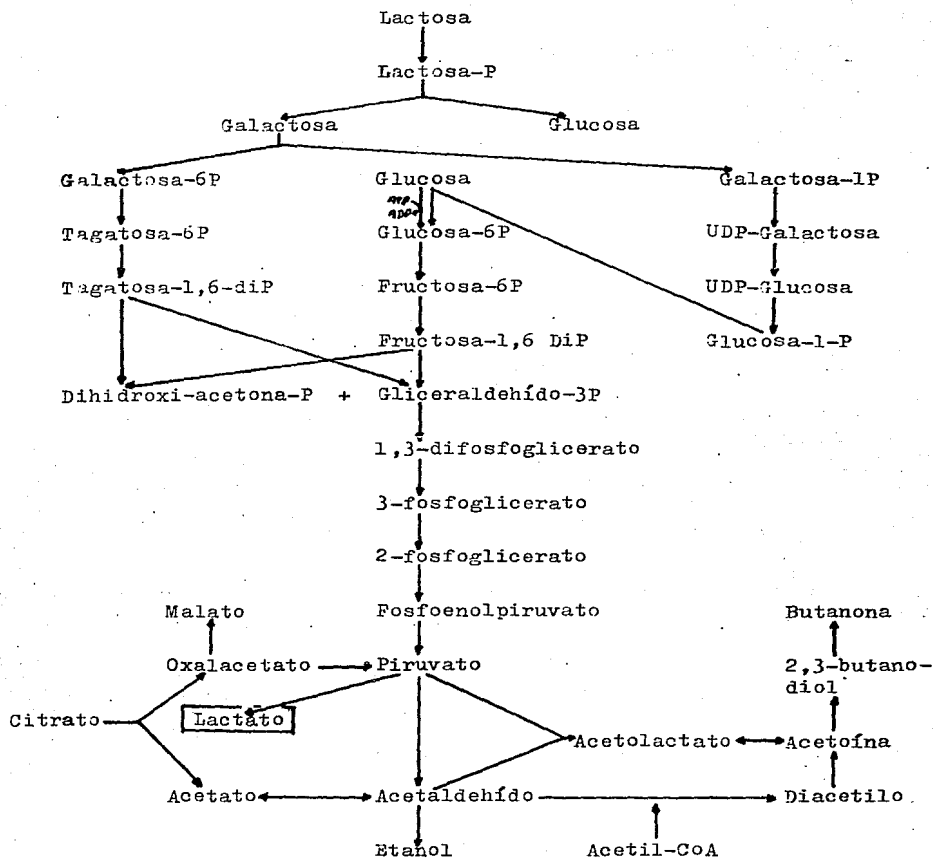
La existencia de plásmidos que involucran al metabolismo de la lactosa por parte de los E.L., implica que éstos se puedan ver afectados por el fenómeno del "curado" -- del plásmido ó pérdida del mismo dado que son moléculas muy delicadas. Un incremento en la temperatura puede inducir el curado (Richardson, 1984, 1983; Lee, 1975; Kondo, 1985) así como el cambio de medio de cultivo (Vegarud, 1983) ó por la utilización de radiaciones U.V. y colorantes como la acriflavina.

La pérdida ó curado de los plásmidos que codifican para la síntesis de lactasas dá origen a cepas "lentas" productoras de ácido láctico (Lac⁻), variantes de las cepas -- progenitoras (lac⁺) "rápidas" productoras de ácido láctico.

El metabolismo de la lactosa de la leche por los E.L. es un proceso de muchos pasos como se puede apreciar en la tabla 7, por lo que es improbable que todos los genes involucrados se encuentren codificados en plásmidos (McKay, 1977; Anderson, 1977; Kondo, 1985).

El transporte de la lactosa a través de la membrana de los E.L., se realiza a través del sistema Fosfotransferasa (PTS) dependiente de Fosfoenolpiruvato (PEP) ó PEP:PTS -- (Lawrence, 1976). PEP actúa como donador de fosfato para la lactosa, transformándose ésta en Lactosa-P para posteriormente ser hidrolizada por la enzima B-D-fosfogalactosidasa (B-D-gal) a glucosa y D-galactosa-6P. La D-galactosa-6P puede ser metabolizada por la vía de la D-tagatosa-6P por los E.L. y entrar al ciclo de las triosas en forma de intermediarios triosa-P. La isomerasa, quinasa y aldolasa involucradas son inducibles y distintas de las enzimas correspon-

Tabla 7. Ruta de degradación de la lactosa por los E.L.



dientes del metabolismo de la glucosa-6P. El rendimiento molar de la fermentación de la glucosa, galactosa y lactosa — por los E.L. del Grupo N de Lancelfield, es de 2 moles de — ATP por mol de hexosa fermentable. Los E.L. son capaces de metabolizar la galactosa libre a través de la ruta de Leloir.

1.4.2.1. Regulación de rutas y formación de productos finales.

La regulación del metabolismo de carbohidratos en las bacterias lácticas, involucra un control muy fino de la actividad enzimática (Lawrence, 1976). El crecimiento de los E.L. con glucosa como fuente de carbono, reduce notablemente la actividad específica de las enzimas, tanto de la ruta de Leloir como de la tagatosa-6P. Los E.L. exhiben un comportamiento diauxico en su crecimiento cuando en el medio existen glucosa, galactosa y lactosa, siendo utilizadas en ese mismo orden por los microorganismos. Las enzimas de la ruta de Leloir tienen su máxima actividad durante el crecimiento de los E.L. cuando la galactosa es la fuente de carbono y se reducen al mínimo con lactosa.

Las actividades específicas de las enzimas de la ruta de la tagatosa-6P son similares cuando la fuente de carbono es lactosa y galactosa. El balance de los productos finales depende de los carbohidratos utilizados para la fermentación ya que los sistemas enzimáticos son inducibles para cualquier vía metabólica, sólo hay que tomar en cuenta que el sistema PEP:Pts es un prerrequisito para la rápida degradación de la lactosa y que el metabolismo de la glucosa y de la galactosa-6P son los sistemas más eficientes para proveer de energía a la célula y para la utilización de carbohidratos.

El control del metabolismo de la lactosa hasta lactato, involucra la regulación por producto final, la activación de precursores y la síntesis de enzimas alostéricas, al estado energético de las células y al balance de las formas oxidadas y reducidas de los nucleótidos de piridina.

La conversión del PEP a lactato en E.L. involucra a las enzimas alostéricas piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa, las cuales son marcadamente activadas "in vitro" por la fructosa-1,6P₂. La activación de la lactato deshidrogenasa es específica por la ceto-hexosa difosfato, la activación de la piruvato quinasa es un poco más amplia e incluye

a la glucosa 6-P y a la galactosa-6P. La regulación de la actividad de la lactato deshidrogenasa tiene el potencial de controlar la actividad de las enzimas del metabolismo de carbohidratos en su totalidad durante el crecimiento en anaerobiosis. Roseman considera que el sistema PEP:PTS confiere importantes ventajas fisiológicas a los organismos que realizan la glicólisis en anaerobiosis debido a que el PEP provee la unión entre el transporte de azúcares y su metabolismo subsecuente.

El control de la actividad de la piruvato quinasa se lleva a cabo por los primeros intermediarios en la ruta, incluidos los productos del sistema de transporte que pueden regular la concentración del PEP intracelular, mejorando la velocidad del transporte de azúcares al interior de la célula. La activación de la lactato deshidrogenasa por la fructosa-1,6P₂ y la tagatosa-1,6P₂ asegura una baja concentración de piruvato intracelular en condiciones de anaerobiosis, evitando la síntesis enzimática de las otras rutas, haciéndose la fermentación homoláctica.

Bajo ciertas condiciones, el piruvato puede ser convertido en otros productos diferentes del lactato. En algunas mutantes de *S. lactis* con el metabolismo alterado, se produce acetoina como producto final en lugar de lactato. La adición de piruvato a concentrados celulares de E.L. deriva en la producción de compuestos volátiles con claro predominio del acetato y muy poca producción de lactato. En anaerobiosis se reduce el NAD durante la conversión del gliceraldehído-3P a 1:3-difosfoglicerato, proceso que se acopla a la oxidación del NADH₂ en la conversión del piruvato a lactato. En condiciones de aerobiosis se induce la síntesis de la NADH₂ oxidasa y se favorece la formación de otros compuestos como el etanol que incluyen O₂, siendo ésta molécula el aceptor final de hidrógeno, aliviando a la célula la necesidad de reducir el piruvato a lactato.

La producción de ácido por los E.L., puede continuar aunque se haya experimentado el cese del crecimiento cuando en el medio existen carbohidratos en exceso. En los E.L. se hayan desacopladas la producción de ATP con la de ácido láctico, por lo que los microorganismos pueden continuar produciendo lactato aún en el caso de la depleción de la fuente nitrogenada si se haya alcanzado un pH de 5 en el medio.

1.4.2. Compuestos volátiles producidos por bacterias lácticas.

Los productos lácteos cultivados son aceptados primariamente por el consumidor en base a su sabor (Keenan, 1968) El sabor (Badings, 1980), está determinado por la percepción de algunas sustancias aromáticas por nuestros sentidos del gusto y del olfato en conjunto.

La combinación de bacterias lácticas en un cultivo de iniciadores lácticos provee de un balance de compuestos aromáticos al producto final, el cual, es determinante en la aceptación del mismo y en su consumo.

Aunque el ácido láctico es inodoro y el principal producto de la fermentación de la lactosa por E.L., es responsable del sabor ácido de muchos productos. Esta propiedad de los E.L. se aprovecha para la manufactura de cultivos de iniciadores lácticos y se les mezcla con otros microorganismos que confieren ciertos sabores y olores a los productos que con ellos se elaboran, algunos de éstos productos se listan en la Tabla 8.

Tabla 8. Algunos compuestos producidos por los I.L.

Importancia primaria:	Diacetilo, acetaldehído, sulfuro de dimetilo, ácido acético, ácido láctico, CO ₂
Importancia secundaria:	Aldehídos: C ₄ , C ₅ y C ₈ 2-alcanonas: C ₃ , C ₄ , C ₅ , C ₆ , C ₇ , C ₉ , C ₁₁ .
	Alcanoles
	Esteres
	Lactonas
	Acido sulfhídrico
	Metanetiol
	2-feniletanal
	2-feniletanol

1.4.3. Proteólisis de la caseína de la leche por los E.L.

La habilidad de coagular la leche, depende de la capacidad de hidrolizar la caseína de la leche, para producir compuestos solubles y necesarios para la síntesis de nuevas proteínas, útiles a los organismos para su crecimiento (Richardson, 1984).

Los E.L. (Lawrence, 1976), alcanzan densidades celulares máximas en leche, cercanas a 10^9 CFU/ml. Esto corresponde a aproximadamente 0.5 mg de proteína bacteriana en peso seco/ml., lo cual requiere de 0.025% de aminoácidos totales. Asépticamente drenada, la leche contiene cerca de 0.01% de aminoácidos libres (cerca de 5 a 20% de la concentración requerida para un crecimiento máximo en medio sintético).

Los E.L. poseen proteasas extracelulares que rompen la caseína en péptidos, éstos péptidos pueden ser tomados por la bacteria y ser hidrolizados intracelularmente a aminoácidos, valiéndose de peptidasas unidas a la pared celular (Davies, 1981).

Algunas enzimas proteolíticas (Exterkate, 1984), se encuentran en la interfase membrana-pared celular (alanil, leucil y prolilaminopeptidasas), otras están asociadas a la membrana (glutamatoaminopeptidasas) y otras actúan intracelularmente (lisilaminopeptidasas). La producción de proteasas unidas a la pared celular en *E. cremoris* AM, puede ser reprimida a concentraciones relativamente bajas de un digerido enzimático de caseína en el medio, fenómeno que no se observa con la presencia de aminoácidos libres.

La producción de proteasas (Exterkate, 1985) es un proceso ininterrumpido cuando los E.L. crecen en leche y sólo puede ser inhibido por la adición de péptidos. La regulación de la síntesis de proteínas es una función de la forma y de la cantidad en que la célula se suple de nitrógeno esencial, la regulación es a nivel de la transcripción y la duración de la inhibición de este proceso está determinada por la extensión del consumo de péptidos extracelulares y su disponibilidad.

La producción de proteasas también se haya ligada a plásmidos (DNA cíclico y autónomo) y es susceptible de perderse (Davies, 1981; Molskness, 1974) en forma parcial por el curado de uno ó más de ellos (McKay, 1975; Klaenhammer, 1978; Kondo, 1985).

1.4.3.1. Relación entre los plásmidos y la actividad proteolítica de los E.L.

El estudio de los plásmidos (Orberg, 1985; Kondo, 1985) es actualmente una de las áreas más importantes en la investigación de los E.L., debido a la asociación de ciertas propiedades fenotípicas con éste material genético. Estas propiedades incluyen: la fermentación de la lactosa, la actividad proteolítica, la utilización del citrato (en S. diacetilactis) y la resistencia a los bacteriófagos. La actividad proteolítica se encuentra ligada a plásmidos de muy diferentes tamaños (McKay, 1972, 1973, 1974, 1976, 1973 y 1982; Kuhl, 1973; Orberg, 1985; Kondo, 1985), se les encuentra desde 8.5 Md hasta 33 Md. Los plásmidos más grandes también contienen información para la síntesis de lactasas.

Industrialmente (Richardson, 1983, 1984; Shelah, 1983) resulta útil el empleo de variantes Prt⁻ de S. lactis y S. cremoris mezcladas con cepas Prt⁺. Las cepas altamente proteolíticas (Prt⁺) con causa común de ciertos defectos en contrados en los quesos y que se exponen en la tabla 9.

1.4.3.2. Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad proteolítica de cepas Prt⁻ de E.L.

Algunos tipos de quesos son manufacturados enteramente con cepas Prt⁻. La actividad proteolítica de algunas cepas de S. cremoris y de S. lactis (de Giori, 1985) y bajo ciertas condiciones, muestra un máximo a temperaturas de -- 50°C y 45°C respectivamente, lo que quiere decir que la temperatura de crecimiento no siempre es la misma que se requiere para el desarrollo de una actividad enzimática dada. Los mismos microorganismos cuando fueron incubados a 37°C no mostraron actividad proteolítica, éste fenómeno no ha sido bien entendido aunque ya se ha observado en otros estudios. El pH también influye en la capacidad proteolítica de los E.L., encontrándose que a valores bajos (4.8-5.2) los microorganismos son más proteolíticos que a valores cercanos a la neutralidad.

Tabla 9.

Ventajas y desventajas que tiene el uso de cepas poco proteolíticas (Prt) de S. lactis y S. cremoris.

Ventajas	Desventajas
Rendimientos celulares <u>has</u> ta de un 93% en cultivo por lote con control de pH.	Fermentaciones en tiempos - largos (hasta 48 horas).
Obtención de rendimientos - de queso más altos debido a que no se forman péptidos - solubles.	Son poco acidificantes.
Disminución de problemas -- por infección de fagos y -- por presencia de antibióti- cos.	Necesitan medios bien <u>suple</u> mentados con nitrógeno <u>esen</u> cial (ver nutrición).
Eliminación del problema de producción de péptidos <u>amar</u> gos.	Requieren de incubación a - temperaturas de 38° C para - que produzcan ácido en for- ma conveniente.
	Aumento en el tiempo de ma- nufactura de queso.

1.4.3.3. Selección de cepas Prt⁺ y Prt⁻.

Se han realizado varios trabajos tendientes a la selección de cepas Prt⁺ de Prt⁻, motivados por mejorar las técnicas tendientes a buscar células que contienen su información genética intacta. Huggins (1984), desarrolló un medio de cultivo sólido en que pueden aislarse cepas Prt⁺ y Prt⁻ y combinaciones con Lac⁺ y Lac⁻. Hugenholtz (1987), utilizando una combinación del medio de Huggins con el cultivo continuo, demostró que es posible aislar variantes -- Prt⁻ de S. cremoris E8 con limitación de aminoácidos y a velocidades de dilución de 0.2. A bajas concentraciones de caseína como fuente de nitrógeno, es posible mantener el cultivo continuo con variantes Prt⁺ exclusivamente.

1.4.3.4. Medición de la proteólisis.

La proteólisis se determina en forma ordinaria por la cantidad de péptidos y aminoácidos solubles que se encuentran presentes en filtrados preparados a partir de una muestra. La determinación es colorimétrica (método adaptado por Hull (1947), revisado y mejorado por Citti (1963)), y se cuantifica la tirosina y el triptófano en filtrados con ácido tricloroacético (TCA) sobre una curva estándar. -- Samples (1984), desarrolló otro procedimiento más sensible que detecta el nitrógeno amínico que se encuentra en solución (método del ácido trinitrobencén sulfónico).

1.5. Utilización de grasas por los E.L.

Los E.L. (Marth, 1962), son inhibidos por la presencia de ácidos grasos en la leche como el láurico, caprílico y caproico en concentraciones tan bajas como 0.1%, los ácidos linoleico y linoléico estimulan un poco el crecimiento, -- los ácidos oleico, palmítico y butírico no ejercen ningún efecto sobre el crecimiento ni el metabolismo de los E.L.

Los E.L. son propagados ordinariamente en leche descremada debido a que los ácidos grasos de la leche en forma global inhiben su crecimiento.

1.6. Algunos aspectos nutricionales de los E.L.

Los requerimientos nutricionales de los E.L. son altos y su cultivo precisa del empleo de medios de cultivo completos y bien suplementados. La propagación a nivel industrial de E.L. indujo a estudiar sus necesidades nutricionales, -- debido a que los microorganismos obtenidos por esta vía mostraban un crecimiento errático que trajo consigo considerables pérdidas económicas.

1.6.1. Requerimiento de bases nitrogenadas.

Los E.L. son incapaces de sintetizar y de utilizar -- sus derivados de ácidos nucleicos (Crater, 1965). Algunos -- compuestos que estimulan el crecimiento (Dahiya, 1964) de -- los E.L. son la adenina, la hipoxantina y la inosina, obtenidos del extracto de páncreas. Además de la adenina, la -- guanina y la guanosina (Kothari, 1973) también mejoran el -- crecimiento de los E.L., la velocidad de producción de ácido y la proteólisis en leche. El extracto de levadura contiene derivados de ácidos nucleicos como el ácido uridílico, citidílico y los correspondientes nucleósidos así como adenina (Jago, 1975; Hillier, 1978; Citti, 1965; Selby, -- 1975). Las bases purínicas y pirimidínicas son convertidas en sus derivados nucleósido 5'-monofosfato al atravesar la membrana. Concentraciones de 0.5% de extracto de levadura -- Keen, 1972), aparte de incrementar la velocidad específica de crecimiento de los E.L., contribuye a eliminar el H_2O_2 -- que se forma metabólicamente y que puede inhibir el crecimiento de los E.L.

1.6.2. Requerimiento de sales.

Los E.L. requieren de una óptima concentración de fofato para crecer y puede ser suplementada con 2 grs. de casa aminoácidos que contienen 6.5 mg (0.325%) de fosfato en forma de O-fosforil treonina (Nolan, 1972).

La adición de trazas de magnesio y fierro (Citti, -- 1965), estimula el crecimiento. El magnesio (Thomas, 1968) - prolonga marcadamente la supervivencia de los E.L. suspendidos en solución amortiguadora del pH a base de fosfatos (a - concentraciones de 10^{-4}). La adición de 0.5% de NaCl (Marth, 1963), estimula la producción de ácido por los E.L.

1.6.3. Requerimientos de nitrógeno amínico.

Los E.L. requieren de algunos aminoácidos para su crecimiento y han desarrollado sistemas tanto para producción - de peptidasas (recuperables del medio), como para el trans-- porte de péptidos al interior de la célula (Law, 1977, 1978). Los péptidos pequeños tienen un valor nutritivo más alto -- que los aminoácidos libres ya que los microorganismos obtienen de esta manera, todos los aminoácidos que necesitan en - forma simultánea vía sus sistemas de transporte de péptidos, además de que los aminoácidos libres son susceptibles de degradación por enzimas extracelulares.

Los aminoácidos que requieren los E.L. son (Cowman, 1968): Leucina, isoleucina, metionina, valina, glutámico, -- histidina. La leche contiene todos los aminoácidos necesarios para sostener un buen crecimiento de E.L., sólo que éstos microorganismos son incapaces de hidrolizar las proteí-- nas en forma conveniente, sobre todo al iniciar su crecimiento. Una parte de los aminoácidos necesarios se puede adicio-- nar suplementando el medio de cultivo con extracto de levadura (Citti, 1965). En la Tabla 10, se indican los requeri-- mientos mínimos de aminoácidos para sostener el crecimiento de los E.L.

Tabla 10.

Requerimiento de aminoácidos en $\mu\text{g/ml}$. de medio para el crecimiento de 2 ó más cepas de E.L. y cantidades encontradas en la leche y el suero de queso (Law, 1976).

aminoácido	Leche digerida		Suero		Requerimiento Mínimo
	Total	Libre	Total	Libre	
Glu	2700	19	195	7	87
Leu	1050	11	52	1	41
Ileu	584	10	65	1	35
Val	750	23	49	1	41
Arg	450	12	17	2	39
Cys	104	17	145	1	27
Pro	680	1	65	2	38
His	364	2	15	1	24
Phe	555	10	34	1	21
Met	288	8	125	1	22

1.6.4. Requerimiento de vitaminas.

Los E.L. requieren de riboflavina, ácido pantoténico, piridoxina, tiamina, biotina, ácido nicotínico y niacina -- (Marth, 1962), estudios más recientes indican que sólo necesitan de pantotenato y niacina para un buen crecimiento y -- que la adición de las otras vitaminas sólo estimula el crecimiento.

1.7. Medios de cultivo a base de agar para E.L.

Los primeros medios de cultivo para los E.L. presentaban algunos inconvenientes (Elliker, 1956), algunos no tenían suficiente claridad y otros, aparte de ser de elaboración difícil, no podían sostener un buen crecimiento de los microorganismos. El medio de Elliker, Anderson y Hanneson (1956), es probablemente el más citado por la literatura como el mejor para el cultivo de los E.L., debido a la facilidad de su preparación y sus excelentes resultados (Lawrence, 1976). Se han desarrollado otros medios similares como el caldo APT, el medio de Hurst, el caldo Broth y el medio M16. Hunter (1946), demostró que la adición de un amortiguador del pH al medio, mejora dramáticamente el crecimiento y los microorganismos se muestran más activos al ser reinoculados en leche. En base a esto, Barach (1979), mejoró el medio de Elliker con la adición de fosfato diamónico.

A partir de éstos medios, se han desarrollado otros con fines más específicos como por ejemplo la diferenciación entre especies debido a sus diferencias metabólicas (Turner, -- 1963, Reddy, 1972); la diferenciación entre cepas Prt⁺ de las Prt⁻, Lac⁺ de Lac⁻ y combinaciones entre ellas (Feary, 1984; Molskness, 1974; Huggins, 1984) (Anexo I) y la propagación de los E.L. y sus bacteriófagos (Terzaghi, 1975) (Anexo I).

Al cambiar de medio de cultivo a los E.L., éstos pueden perder su capacidad ácido productora ó proteolítica (de Valdez 1985; Thomas, 1981) por inducción del curado de algún plásmido.

1.8. Factores físicos para crecimiento de los E.L.

1.8.1. pH del medio.

La propagación de los E.L. en cultivo por lote y con control automático de pH en un rango de 6.5 a 6.8, redundó en la obtención de rendimientos más altos (Keen, 1972; -- Peebles, 1969; Gilliland, 1977; Chen, 1977; Harvey, 1965; -- Thomas, 1979). Utilizando NH_4OH como neutralizante, se puede alcanzar a producir hasta 4¹⁵ veces más células que en el mismo medio de cultivo sin control de pH y alrededor de 1.5 veces más que cuando se utiliza NaOH. En algunos casos, la producción de ácido por parte de los E.L., después de crecer en fermentador con control de pH y utilizando NH_4OH como neutralizante, es sustancialmente igual a la de los cultivos frescos cuando se les hace crecer en leche. El hecho de que al utilizar NH_4OH como neutralizante, los rendimientos sean más altos, radica en el papel que toma el NH_4^+ como restaurador de la actividad glicolítica y que es más rápido que el Na^+ y el K^+ , por otro lado, el NH_4^+ sirve también como materia prima para la síntesis de aminoácidos y con ello la velocidad de crecimiento se optimiza y las fermentaciones se efectúan más rápido.

Comercialmente se pueden adquirir medios para el -- cultivo de iniciadores lácticos que incluyen en su formulación amortiguadores del pH (Thunell, 1984) y que son denominados cultivos con "control interno de pH", medios PIM (inhibidores de fagos) y otros diseñados para el cultivo de -- E.L. en laboratorio. (Chen, 1977; Ausavanadom, 1977).

1.8.2. Temperatura óptima de crecimiento de E.L.

Lee (1975), estudió el comportamiento de los E.L. al variar la temperatura y encontró que varias cepas de -- S. cremoris crecen mejor en un rango de 28°C a 31°C y de -- 31.5 a 42°C para las de S. lactis, teniendo temperaturas -- óptimas de crecimiento a 29.3°C y 34.1°C respectivamente.

Resultados de experimentos "in vivo" (Thompson, --

1979) sobre el metabolismo de la lactosa, sugieren que la fosforilación del glucosilo y del galactosilo del disacárido son mediados por dos mecanismos diferentes pero altamente integrados y que pueden ser afectados con un incremento en la temperatura de incubación.

Moustafá (1968) observó que cuando *S. diacetilactis* DRC₁ crecía con glucosa, lactosa, galactosa ó maltosa a 17°C, las células no sufrían autólisis y sus paredes contenían más galactosamina que las células crecidas en glucosa a 32°C. Este fenómeno se debe a que las enzimas responsables de la conversión de la glucosa a glucosa 1-P y posteriormente a galactosamina, son sensibles a la temperatura. La autólisis (Vegariud, 1983) es un fenómeno muy común en los E.L. y consiste en la ruptura de la pared y la membrana celular con la consiguiente pérdida de todo el material intracelular.

La actividad proteolítica de variantes Prt⁻ de E.L. puede ser mejorada al incubar las cepas a temperaturas más bien altas (Shelaih, 1983), debido a que las enzimas que producen, muestran mayor actividad a temperaturas cercanas a los 40°C (de Giori, 1985).

1.8.3. Anaerobiosis durante el crecimiento de los E.L.

Las fermentaciones lácticas son netamente anaeróbicas y pese a ésto, se han realizado investigaciones tendientes a mejorar el crecimiento de E.L. cuando son cultivados en lote y sistemas aereados. La aereación deprime el crecimiento de los E.L. (Keen, 1972) y la adición de pequeñas cantidades de CO₂ estimula el crecimiento, aunque puede ser igualado por la adición de extracto de levadura.

Para entender el papel del CO₂ en el metabolismo de las bacterias lácticas, hay que considerar lo que sucede al piruvato formado de la degradación de los carbohidratos. Primero, el piruvato puede ser reducido a lactato. Esta es una reacción primaria de E.L.. Segundo, una aminación reductiva tiene lugar, en la cual el piruvato es transformado en alanina, uno de los aminoácidos más importantes para la construcción de proteínas. Tercero, las enzimas ma

lónicas, pueden catalizar la carboxilación y la reducción necesarias para producir ácido malónico. El CO_2 es utilizado en esta reacción. El ácido malónico puede ser oxidado a oxalacetato. Este compuesto es un importante precursor de la asparagina, la cual puede ser convertida en --treonina y leucina. Cuarto, el piruvato puede ser convertido a ácido fosfoenolpirúvico por una piruvato quinasa -- y éste a su vez se transforma en fosfoenoloxalacetato y -- después en oxalacetato. El CO_2 se utiliza en esta reac-- ción. Esta conversión es una de las predominantes en las bacterias lácticas y es necesaria para el mantenimiento -- de la vida, éstos microorganismos no pueden formar oxala-- cetato por medio del ciclo del ácido cítrico como las o-- tras bacterias (Marth, 1962).

1.9. Producción de acidez por los E.L.

La cuantificación de la acidez producida por los E.L. es, en cierta medida, una valoración de la actividad metabólica de las células. Muchos investigadores sostienen que los incrementos en la acidez titulable van en función del aumento en la población bacteriana en E.L.

Cuando crecen en leche S. cremoris y S. lactis (McKay, 1978), las células se hacen dependientes de sus sistemas proteolíticos para obtener los aminoácidos y péptidos que necesitan de la caseína. Si las células pierden sus sistemas proteolíticos, las cepas se transforman en productoras lentas de ácido láctico y requieren de 48 horas ó más para coagular la leche a 21°C, perdiendo además, su utilidad -- dentro de la industria láctea. La literatura las denota -- con las abreviaturas Prt⁻ y Prt⁺, siendo las primeras las variantes "lentas" y las segundas las variantes "rápidas" ó no proteolíticas y proteolíticas respectivamente. Un -- cultivo rápido, es capaz de coagular la leche en un intervalo de 16 a 18 horas de incubación a 21°C, utilizando de 1 a 2% de inóculo tomado de un cultivo fresco. Un cultivo fresco es aquel que, preparado de la misma manera, tiene -- cuando más 24 horas.

Al crecer en leche los E.L., también dependen de su capacidad de fermentar la lactosa de la leche. Esta propiedad se encuentra cercanamente ligada al sistema proteolítico y por ende es igual de inestable. Si se hace crecer a -- los E.L. en otra fuente de carbono que no sea lactosa ó -- galactosa, es muy probable que los cultivos subsecuentes -- muestren variantes lentas productoras de ácido láctico -- (Lac⁻) en forma predominante, con esto, el cultivo pierde la capacidad de fermentar la lactosa.

1.9.1. Métodos para valorar la acidez (actividad).

Los métodos que se han desarrollado para valorar la acidez producida por los E.L. son básicamente de 2 tipos: a). los métodos cualitativos y b). los métodos cuantitativos y que se exponen enseguida.

1.9.1.1. Métodos cualitativos para valorar la actividad.

Un método se basa en la capacidad de los E.L. de reducir el tornasol antes de que la leche coagule. Si el microorganismo es capaz de reducir el tornasol (de incoloro a rosa pálido) en un intervalo de 12 a 14 horas, se dice que es un cultivo rápido, si tarda más de 24 horas es un cultivo lento (Citti, 1965).

El segundo se basa en el tiempo que tarda el microorganismo en coagular la leche (McKay, 1978). Los E.L. son capaces de coagular la leche en 16 ó 18 horas a 21°C cuando son cultivos rápidos, cuando son cultivos lentos, requieren de 48 horas ó más.

1.9.1.2. Métodos analíticos para la cuantificación de la actividad.

Todos los métodos desarrollados se orientan a la neutralización de la acidez producida con NaOH y varían en el tamaño del inóculo, la concentración de la leche, la temperatura de incubación, el tiempo de toma de muestra y la concentración del NaOH. Otra variable que no hay que descuidar es el trato térmico dado a la leche ya que puede ser estéril ó en el mejor de los casos, recientemente preparada y pasteurizada a la misma temperatura de cocimiento del queso que se va a hacer.

Los E.L. (Williamson y Speck, 1962) pueden desarrollar una acidez de 0.9% en leche a las 8 horas, 0.8 a las 6, 0.6% a las 4 y 0.3% a las 2 horas de incubación a 32°C en leche pasteurizada (62°C, 30 min.) al 10% de sólidos totales y 5% de inóculo.

La actividad de los E.L. es buena (Sellars, 1978) si se observan valores de acidez de 0.04, 0.22 y 0.55 en porcentaje de ácido láctico a las 2, 4 y 6 horas de incubación respectivamente a 30°C en leche pasteurizada a 65°C por 30 minutos (10% de sólidos totales). La valoración se hace con NaOH 0.1N al virre de la fenolftaleína (pH 8.2).

Otros métodos reportados y que destacan por la precisión de sus resultados son los citados por el Boletín

de la Federación Internacional de Lácteos (Documento # -- 123 de 1980, apéndices 1, 2 y 3) en que se resumen los métodos de Stadhouders y Hassing (no publicado), de Pearce -- (N. Zealand, J. Dairy Techn. 1969. 4(246)) y de Cox y -- Lewis (Safety in Microbiology, 1972, Acad. Press. pp. 133). En la tabla 11 se resumen algunos procedimientos para valorar la actividad de los I.L. en otras partes del mundo.

1.9.2. Factores que afectan los resultados de una prueba de actividad.

Muchos factores pueden afectar la producción de ácido por las bacterias durante la manufactura de queso. Primero, las propiedades de las cepas, ya que pueden ser productoras lentas. Estas propiedades son hereditarias y ordinariamente se mantienen durante las treansferencias. Espontáneamente y en todos los cultivos, es normal que aparezcan variantes lentas en proporción de 1 a 2%. En segundo lugar, los iniciadores pueden contaminarse con fagos y sufrir lisis, decreciendo la actividad acidificante. Tercero, la temperatura de cocimiento del queso.

Se pueden mencionar otros factores como son: la presenza de antibióticos en la leche (Orberg, 1985), detergentes, desinfectantes, inmunoglobulinas y la adición de renina. Algunos factores de tipo físico que también retardean la producción de ácido son: la luz, el oxígeno y la temperatura de pasteurización de la leche (Stadhouders, J. 1976).

Tabla 11. Algunos procedimientos utilizados para determinar la acidez titulable de la leche.

Muestra	Dilución	Resolftalefina	Alcali	Punto final	Exposición de resultados	Nombre del método
9 ó 18 gr.	1:1	0.5 ml., 1% en alcohol 35.	0.1N NaOH	Hasta aparición de color rosa.	% de ácido láctico.	U.S. MIP.
20 ml. ó 20 gr.	2:1	2 ml., 1% en alcohol.	0.1N NaOH	Hasta que se observe un rosa.	g. ácido láctico ó ml. 0.1N NaOH/100 gr.	U.S. ADAC.
10 ml.	No	1 ml., 0.5% en alcohol 50.	N/9 NaOH	Hasta que alcancen pto. rosamiento.	g. de ácido láctico por 100 ml.	England British Standard.
10 ml.	No	1 gota, 1% en alcohol.	N/1 NaOH	Hasta claro.	g. de ácido de un ml. N/9 NaOH por 10 ml.	Método Dornic Europeo.
50 ml.	No	2 ml., 2% en alcohol.	N/4 NaOH	Hasta claro.	5 N. = ml. N/4 NaOH por 100 ml.	Método Soxlet-Henkel Europeo.
10 ml.	2:1	5 gotas, 5% en alcohol.	N/10 NaOH	Hasta claro.	0 Th. = ml. N/10 NaOH por 100 ml.	Método Thorner Europeo.
10 ml.	No	0.5 ml., 2% en 75% alcohol.	N/10 NaOH	Hasta igual a un pto. fucsina.	0.1g. de ácido de 0.1N NaOH por 10 ml.	Método Estándar Holandés.
25 ml.	No	12 gotas en alcohol.	N/10 NaOH	Hasta claro.	1 título: ml. de N/10 de NaOH por 100 ml.	NMKL Danés.

Fuente: Principles of Dairy Chemistry.

1.10. Producción y conservación de cultivos de iniciadores lácticos.

Los avances tecnológicos en lo que al cultivo de los I.L. se refiere, no pueden desligar lo que es la producción de los I.L. en grandes cantidades y la conservación propiamente dicha de la viabilidad y la actividad de las células.

Los cultivos de iniciadores (Teuber, 1981) que están en uso se encuentran en formas líquidas, liofilizadas y congeladas. Estos muestran alta capacidad de supervivencia y una actividad óptima para los usos industriales a que están destinados. Debido a que los genes que codifican para la síntesis de lactasas, proteasas y enzimas que degradan el citrato a acetoina se encuentran en plásmidos (McKay, 1979), se ha descartado el método de cultivo continuo para propagar a estos microorganismos ya que en corto tiempo empiezan a aparecer variantes sin plásmidos, (Lawrence, 1976).

En el mayor de los casos, se emplea leche descremada - pasteurizada o esterilizada como el medio nutritivo básico para la producción a gran escala de cultivos de iniciadores porque asegura que sólo los estreptococos lácticos mejor adaptados a la leche crezcan. Para la producción de cultivos de iniciadores lácticos, el medio básico (leche) es suplementado con extracto de levadura, glucosa, lactosa y carbono. Para obtener una supervivencia y una actividad óptimas, es necesario neutralizar el ácido formado, con NH_4OH ó con NaOH .

A nivel industrial se han empleado diversos métodos de producción y diferentes tipos de medios encaminados a obtener grandes cantidades de células con actividad óptima y capaces de permanecer estables por períodos más o menos prolongados, a bajos costos y ser resistentes a la infección por fagos presentes en las plantas industrializadoras.

1.10.1. Métodos de producción de E.L. a nivel industrial.

1.10.1.1. Cultivo por difusión.

La producción de concentrados celulares a nivel industrial, es con miras a la producción de inóculos para la leche destinada a la elaboración de queso al mismo nivel. De ésta técnica sólo hay un trabajo reportado (--- Osborne, 1980) y ha dado origen a una patente en explotación. La producción de E.L. por éste método, provee de --- buenos resultados y altos rendimientos celulares que llegan a alcanzar las 10^{14} UFC/ml.. La técnica implica el uso de membranas semipermeables que separan un cultivo bacteriano del gran reservorio de nutrientes. La membrana permite el paso de los nutrientes al cultivo y la eliminación de los metabolitos de desecho por difusión, restringiendo con ésto el paquete celular a un volumen pequeño. Los metabolitos que inhiben el crecimiento de los E.L. (Sandine, --- 1976) son el lactato a concentraciones de 1 a 4%, el H^+ y el Na^+ .

1.10.1.2 Cultivo continuo.

El cultivo continuo no es un buen método de producción de E.L. (Richardson, 1977; Thomas, 1979; Wilkowske 1957; Hugenholtz, 1987), los cultivos crecen bien en este sistema pero las células son activas únicamente por espacio de algunas horas después de ser cosechadas del fermentador. La lisis celular se acentúa y se presenta espontáneamente, por otro lado, el problema de la infección por fagos se acrecenta debido a que las cepas comúnmente llevan al profago integrado al DNA cromosomal, que se puede liberar y contaminar al cultivo.

Por ésta técnica es posible aislar mutantes Prt^- de la cepa original Prt^+ manejando las variables D (velocidad de dilución) y pH (Hugenholtz, 1987).

1.10.1.3. Cultivo por lote.

Este método de cultivo es el más estudiado (Keen, 1972; Harvey, 1965; Peebles, 1969; Gilliland, 1977; Chen, 1977; Thomas, 1979), su objetivo es reducir costos de producción (Richardson, 1977) en la industria láctea y aumentar el control de los cultivos de iniciadores.

La producción de E.L. por lote, requiere de la -- preparación de inóculos, mantenimiento en óptimas condiciones de crecimiento de las cepas, un cosechado celular, empaclado, almacenamiento y embarque adecuado. La producción de E.L. y otros iniciadores lácticos se ha dejado a instituciones especializadas, debido a que la producción de éstos microorganismos en las plantas aumenta notablemente -- sus costos medios de producción por lo que ello implica.

Los E.L. en cultivo por lote arrojan tiempos de -- generación de 52 y 35 minutos cuando crecen en un medio -- químicamente definido y en un caldo complejo respectivamente (Thomas, 1979). Es preferible (Sandine, 1976) crecer -- E.L. en medios de leche con bajo contenido de lactosa porque de esta manera se puede prevenir la acumulación de lactato y la disminución del pH a niveles tales que provoquen daños celulares.

Del cultivo de iniciadores lácticos por lote se -- han generado innovaciones tecnológicas que han dado origen a los "Cultivos Concentrados". Estos cultivos son (--- Gilliland, 1977) suspensiones de cultivos de iniciadores -- preparados en un medio líquido y concentrados a un volumen pequeño por centrifugación, tras lo cual se almacenan. La obtención de E.L. de esta manera ha derivado en la comercialización de éstos microorganismos bajo las formas "concentradas líquidas" y "concentradas y liofilizadas".

Los concentrados de microorganismos tienen como -- ventajas la facilidad de su preparación y la de conservar ya sea por congelación o por liofilización. Temperaturas -- tan bajas como -196°C siguen siendo utilizadas para la conservación de E.L. aunque su uso lo restringe el costo y la tecnología que éste implica.

1.11. Métodos de conservación de E.L.

El propósito primario de la conservación es el mantener las cepas vivas, puras y sin mutaciones, para ésto es menester, recurrir a la cepa original y buscar el método más apropiado de conservación ya que no todos los microorganismos -- responden igual a un método dado. En el caso de los E.L., se emplea ordinariamente la resiembra diaria (subcultivo) como método de conservación a corto tiempo y la liofilización, -- con algunas variantes como método de conservación a tiempos relativamente largos.

1.11.1. Conservación de E.L. por refrigeración.

Se ha intentado mantener cepas de E.L. en excelentes condiciones a través de métodos tan sencillos como lo es la refrigeración (Cowman y Speck, 1965, 1969) ó tan complicados como la liofilización y la congelación a temperaturas -- de nitrógeno líquido.

Cowman (1969) encontró que algunos E.L. disminuyen -- su actividad después de almacenamiento a 3°C en los prime-- ros 3 días, cosa que no sucede con la viabilidad ya que, -- permanece esencialmente constante durante el mismo período. Este decremento progresa con el almacenamiento. Los E.L. no cesitan de nitrógeno orgánico fácilmente metabolizable para crecer bien, tanto en leche como en medio de cultivo des-- pués de ser almacenados a éstas temperaturas. S. lactis posee dos enzimas proteolíticas, una de membrana y otra intra celular, la primera degrada la caseína a péptidos y la se-- gunda a aminoácidos y otras formas más utilizables. Durante el almacenamiento a 3°C las proteasas de membrana se inacti van debido a que a ésta temperatura se forman trímeros que son más estables pero inactivos, siendo la forma activa -- un dímero pero estable a temperaturas más altas.

King y colaboradores (1969), almacenando E.L. a 4°C en solución amortiguadora de fosfatos a pH 4.5 y 7.5, encon-- traron que éstas bacterias muestran inactivados sus siste-- mas reparadores y que sus pozas de aminoácidos, las proteí-- nas intracelulares y el RNA disminuyen sus concentraciones hasta depleción total con respecto del tiempo.

Goldhaber (1982), estudió el comportamiento de cepas lentas de S. cremoris y S. lactis después de ser al macenadas a 4 °C en un medio de cultivo a base de caseinato de sodio, encontrando que después de un mes, las cepas mantenían su actividad casi inalterada, proponiendo el empleo de éste método de conservación, para cultivos de estreptococos lácticos con miras a producir caldos para inoculación directa de leche destinada a la producción de quesos.

1.11.2. Conservación de los E.L. por liofilización.

El proceso de liofilización no se recomienda para los E.L. debido a que no todas las cepas presentan la misma susceptibilidad a sufrir los daños que implica. Es normal que durante la liofilización ocurra la muerte celular, sólo que los cultivos de iniciadores normalmente, son mezclas de microorganismos y durante la liofilización se desbalancean las proporciones, algunas veces considerablemente (Speckman, 1974). Se ha logrado liofilizar concentrados de iniciadores lácticos con composición desconocida (Yang, 1979) y han probado ser efectivos para inocular leche destinada a la fabricación de queso cheddar sin reactivación previa.

La liofilización (Gherna, 1981), es un proceso mediante el cual se remueve el agua de una suspensión bacteriana por sublimación bajo presión reducida, esto es, evaporación de agua del estado sólido sin pasar por el estado líquido. Las células pueden ser guardadas de ésta manera por largos períodos de tiempo en ausencia de aire, humedad y luz; pudiendo a cualquier tiempo ser rehidratadas fácilmente, restaurando su estado previo.

Se sigue estudiando sobre éste método de conservación (de Valdez, 1983, 1985) en cuanto al problema aún latente de encontrar buenos agentes criocconservadores que ya antes había sido atacado por Holland y Koburger (1969) con buenas expectativas.

1.12. Presentaciones comerciales de los cultivos de Iniciadores lácticos.

Actualmente es posible adquirir cultivos de Iniciadores lácticos en varias versiones, las cuales han derivado tanto de la forma de producción como de conservación. El estudio del cultivo de iniciadores lácticos ha llevado a los investigadores a solventar algunos problemas que enfrentan los industrializadores de la leche como los inherentes a la contaminación por fagos. Este problema ha sido resuelto en parte por la introducción al mercado de los medios inhibidores de fagos (PIM). Estos medios están diseñados a base de suero de queso suplementados con fosfatos (Richardson, 1977; Jonas, 1977; Wreighth, 1982). Aunque los fosfatos son fuertes inhibidores del crecimiento de los E.L., resultan efectivos para evitar la infección de los cultivos a concentraciones del 2% y permiten el crecimiento normal de los microorganismos.

Los cultivos de iniciadores lácticos, son por lo general, mezclas de microorganismos cuidadosamente seleccionados para obtener algún producto en específico. La selección de los microorganismos se basa en sus propiedades metabólicas y en su resistencia al ataque por fagos, siendo ésta última propiedad la que se toma en cuenta para la elaboración de los cultivos de cepas múltiples. Los cultivos de cepas múltiples son elaborados con cepas diferentes de un microorganismo y que no guardan relación genética con el mismo fago, por lo cual son resistentes a la infección (Gamay, 1984; Thunell, 1981; Daniell, 1981).

Los cultivos de iniciadores lácticos pueden ser adquiridos de las siguientes formas:

- i). Cultivos líquidos. Son mezclas de S. cremoris y S. lactis preparadas en suero de queso ó en leche bronca y se usan poco por la facilidad con que se contaminan.
- ii). Cultivos congelados en líquido. Forma muy utilizada en Inglaterra, consiste en botellas de plástico con 600 ml. del cultivo inoculado y sin incubar, se conservan a -25°C y duran alrededor de 3 meses. Alcanzan para inocular 100 gal. de leche.

- iii). Cultivos liofilizados. Se adquieren normalmente para la producción de cultivos "madre" en los laboratorios de las cremerías, su duración es de aproximadamente 6 meses y requieren de propagación continua cuando se usan. Se pueden conservar en refrigerador.
- iv). Concentrados congelados. Son cultivos producidos en fermentadores con control automático de pH en la región de 6.0 a 6.3 y con poblaciones microbianas de alrededor 10^9 células/ml. Son mantenidos en contenedores especiales a -78°C con hielo seco ó con nitrógeno líquido. El cultivo retiene su actividad por un tiempo considerable y tan sólo 70 ml. de éste alcanza para inocular 1000 litros de leche.
- v). Concentrados liofilizados. Como la anterior presentación, también pueden ser usados directamente sobre la leche como inóculo. Requieren de almacenamiento a -25°C y duran alrededor de 5 meses.
- vi). Cultivos de inoculación directa (DVS). Es un concentrado líquido que contiene aproximadamente 10^9 microorganismos viables, producidos por fermentación con neutralización continua del pH. Otra presentación de este producto es enlatada, los microorganismos forman una pasta con cuentas viables de 1.2×10^{11} CFU/gr.. Cada 500 grs. son suficientes para inocular 3,200 litros de leche para queso y se usan directamente.

2. Planteamiento del problema.

La industria láctea, requiere de cepas que produzcan -- una buena cantidad de ácido láctico en poco tiempo. Para és to es menester, producir una buena cantidad de células con alta actividad ya que en primer lugar, se requiere de inócu los "pesados" con aproximadamente 10^9 CFU/ml. y en segundo lugar, que los microorganismos sean capaces de producir la cantidad de ácido láctico adecuada tanto para reducir el -- tiempo de manufactura del queso como para obtener un produe to de buena calidad dado que la consistencia del queso, var ía en función del pH de la leche al momento de la cuajada.

Goldhaber (1982), probó que a temperaturas de refrige-- ración en un medio formulado con caseinato de sodio, cepas lentas de S. cremoris y S. lactis eran capaces de sostener niveles de actividad muy semejantes a la de cultivos fres-- cos después de 1 mes. La necesidad de propagar y conservar cultivos de E.L. industrialmente útiles, induce a plantear la posibilidad de crecer cepas de estreptococos lácticos -- por fermentador con control de pH y conservarlas con el mis mo método, pudiendo las cepas rápidas, mostrar un comporta-- miento semejante al de las cepas lentas.

3. Objetivo:

Demostrar que a temperaturas de refrigeración (4°C), -- cepas rápidas de S. cremoris y S. lactis son capaces de man tener una buena actividad y por ello aptas, para la produc-- ción de quesos cuando se les conserva en su medio de culti-- vo.

4. Hipótesis de trabajo:

Mediante éste método de producción y conservación para los estreptococos lácticos, es posible implementar un sistema para la producción de concentrados celulares que puedan ser utilizados como inóculo para la leche destinada a la producción de queso.

5. Métodos y Materiales.

5.1. Métodos.

La metodología propuesta para el desarrollo de esta tesis es similar a la empleada por Goldhaber (1982), con la diferencia únicamente de las cepas empleadas y el volumen de trabajo utilizado.

S. cremoris y S. lactis son crecidos en un medio de cultivo a base de caseinato de sodio en fermentador de 1 litro con control de los siguientes parámetros: a) agitación a 200 R.P.M.; b) temperatura a 30°C ; c) pH a 6.8; d) tamaño del inóculo de 1.0% v/v; e) tiempo de fermentación de 24 horas. Se determina la cinética de crecimiento tomando alícuotas del medio de cultivo cada 2 horas para conteo de CFU (Unidades Formadoras de Colonias), la actividad durante el crecimiento se determina automáticamente, a través de un dispositivo que grafica la cantidad de álcali adicionado con respecto del tiempo.

Las mismas cepas se crecen posteriormente en un fermentador de 14 litros, para hacer un estudio de escalamiento con los siguientes parámetros: a) agitación a 200 R.P.M. b) temperatura de $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; c) pH de 6.8 ± 0.3 ; d) tamaño del inóculo de 1.0% v/v; e) tiempo de fermentación de 15 horas. La cinética de crecimiento se determina de la misma manera y la actividad en este sistema no se pudo determinar por carecer del equipo apropiado.

Los caldos de fermentación son almacenados en envases de plástico estériles a 4°C , posteriormente se toman muestras de éstos caldos para análisis de actividad en leche y cuenta viable por dilución.

5.1.1. Preparación de los medios de cultivo.

5.1.1.1. Agar Reddy.

Se prepara la mezcla A y la B y se esterilizan por se parado a 121°C y 15 lb. de presión por 10 minutos, las mez-- las se dejan reposar a temperatura ambiente por 7 días para verificar la esterilidad. Ya para utilizarse, se licúa la -- mezcla A y se le adiciona la B.

Mezcla A

Peptona de caseína	0.5	%
Extracto de levadura	0.5	%
Casaminoácidos	0.25	%
L-arginina-HCl	0.5	%
K ₂ HPO ₄	0.125	%
Agar 4	1.5	%
pH	6.9	

Mezcla B

Leche descremada (11.0% sólidos)	10	ml.
Púrpura de bromocresol al 0.1%	2	ml.

5.1.1.2. Leche descremada con tornasol (Difco).

Se disuelven 10 grs. de Leche descremada con tornasol (Difco) y se aforan a 100 ml. con agua destilada, posteriormente se esteriliza a 121°C y 15 lb. de presión por 10 minutos. Se deja reposar 7 días para verificar la esterilidad a temperatura ambiente, en algunos casos el tornasol se reduce con la operación y se vuelve incoloro con el paso de los días, los tubos que no pierdan el color son desechados.

5.1.1.3. Agar APT (Merck).

Se disuelven 60 grs. del medio por cada litro de agua y se esterilizan en autoclave a 121°C y 15 lb de presión por 10 minutos, posteriormente se comprueba su esterilidad dejándolo 7 días a temperatura ambiente, tras los cuales se utiliza.

Composición

Peptona de caseína	12.5 g
Extracto de levadura	7.5 g
D-glucosa	10.0 g
NaCl	5.0 g
Citrato de sodio	5.0 g
K ₂ HPO ₄	5.0 g
Tween ⁴ 80	0.2 g
Sales inorgánicas	0.98 g
Agar	13.5 g

5.1.1.4. Medio de caseinato de sodio.

Se disuelve primero el caseinato de sodio ya que resulta un poco difícil su disolución, posteriormente se adiciona el extracto de levadura ya que elimina la espuma formada por el caseinato de sodio, finalmente se agregan los otros dos componentes en cualquier orden y se ajusta el pH a 7.0 con NaOH 2N. Se esteriliza a 121°C y 15 lb. de presión por 10 minutos, la jarra de 14 litros requiere de un tiempo de 20 minutos con escape lento de presión.

Composición

Caseinato de sodio	20 g
Glucosa anhidra	25 g
Suero de queso	60 g
Extracto de levadura	10 g
Agua de la llave	900 ml
pH	7.0

5.1.2. Preparación del inóculo.

Para el fermentador de un litro. De un cultivo del iniciador mantenido en refrigeración, se toma una "azada" y se siembra por estría en cajas Petri con agar Reddy. Tras 24 horas de incubación se "pican" las colonias más grandes y con halos amarillos y de proteólisis más amplios en condiciones asépticas, se inocula con éstas colonias tubos con leche descremada y tornasolada (Difco) al 10% de sólidos totales (con 7 días mínimo de preparación previa a su uso) estériles y por triplicado por cada determinación. Los tubos se incuban 18 horas a 22°C y se transfieren tres días seguidos para reactivar la cepa, guardándose en refrigeración el tiempo que no se utilice. Para inocular el fermentador se utiliza un cultivo "reactivado" previamente, el cual se reinocula posteriormente en el medio de caseinato de sodio de la misma manera.

Se utilizan tubos Pyrex de 8 ml. con tapón de rosca y 5 ml. de medio, para inocular el fermentador de 1 litro se usan 7 ml. (1% de inóculo), ya que el volumen de trabajo es de 700 ml.

Para el fermentador de 14 litros. Se sigue el mismo procedimiento sólo que el volumen de trabajo es de 10 litros y se utilizan 100 ml. de inóculo, preparados en frascos Pyrex de 200 ml.

5.1.3. Condiciones de cultivo.

Fermentador de 1 litro. La temperatura durante la primera hora debe ser mantenida a 30°C con baño maría, en las siguientes tiende a elevarse por la acción metabólica de los es treptococos por lo que hay que tener cuidado para controlarla. El pH se mantiene a 6.8 automáticamente con NaOH 2.0N y la agitación a 200 R.P.M., el volumen de trabajo es de 700 ml. y se inoculan con 7 ml. de un cultivo de estreptococo incubado por espacio de 18 horas a 22°C en el medio de caseinato de sodio.

Fermentador de 14 litros. La temperatura se mantiene automáticamente a 30°C y el pH a 6.5-7.1 debido a que el control automático no es muy exacto. La agitación se mantiene constante a 200 R.P.M.. El volumen de trabajo es de 10 litros y la neutralización del medio se realiza con NaOH al 20% estéril.

5.1.4. Actividad.

Se preparan 300 ml. de leche descremada (Sveltes) al 10% de sólidos totales por determinación, se distribuyen en 3 matraces erlenmeyer estériles y con tapón de algodón, la leche se pasteuriza a 64°C por 30 minutos y posteriormente se enfría a 30°C, todo esto en baño maría. Los matraces se inoculan con 1 ml. del cultivo del iniciador y se incuba -- por espacio de 6 horas a ésta temperatura, transcurrido el tiempo se valora la acidez producida con NaOH 0.1N al vire de la fenolftaleína (2 o 3 gotas al 2%).

Las muestras a valorar se deben mantener en hielo -- ricado si no se usan luego, la acidez puede mantenerse hasta 8 horas sin cambio de ésta manera. Cada determinación se -- hace por triplicado y los resultados se expresan como % de ácido láctico, descontando la acidez de la leche (normal-- mente de 0.15 a 0.17) que se valora como blanco antes de -- cada determinación.

5.1.5. Conteo de colonias.

Se toma una alícuota de 1 ml. de la muestra y se diluye en tubos Pyrex de 20,ml. de capacidad con 9 ml de agua destilada estéril (dilución 1:10), de éste tubo se toma un ml. de la suspensión celular y se diluye de la misma manera, la operación se repite varias veces hasta lograr la dilu-- ción deseada. La siembra en caja de Petri se realiza colocan-- do 1 ml. de cada dilución en una caja de Petro de 10 x 1 cm. a la que se adicionan 10 ml. de agar APT a punto de cuajar, se homogeniza manualmente, para finalmente incubar a 30°C -- por 48 horas y realizar el conteo de colonias.

5.1.6. Conservación de los caldos de fermentación.

El caldo del fermentador de 1 litro es almacenado en envases de plástico de 1 litro previamente esterilizados. El caldo se introduce en un refrigerador a 4°C por espacio de 1 mes. Los caldos del fermentador de 14 litros son almacenados en envases de plástico de 5 litros de capacidad y se guardan en cámaras frigoríficas a 4°C.

5.2. Equipo.

Fermentador de un litro:

Fermentador Mod. E-473 Metrohm Herisau, equipado con un Dosificador Multi-Dosimat, acoplado a un potenciómetro a través de un amplificador Impulsomat, todos de la misma marca. El dosificador posee una bureta de 100 ml. de capacidad y está acoplado a un graficador que registra el volumen de álcali adicionado por unidad de tiempo.

Fermentador de 14 litros.

Panel New Brunswick Scientific Mod. M-19-1410; Jarra de 14 l. de vidrio refractario con cabezal New Brunswick - Scientific Mod. F 14-100. Bomba peristáltica Masterflex Mod. 7013 con controlador automático del pH Masterflex.

Potenciómetro Conductronic pH 20

Agitador Magnético Magnestir.

Balanza granataria Ohaus de 2160 gr. de Cap.

Cámara de incubación a 30°C.

Cámara frigorífica a 4°C.

Autoclave.

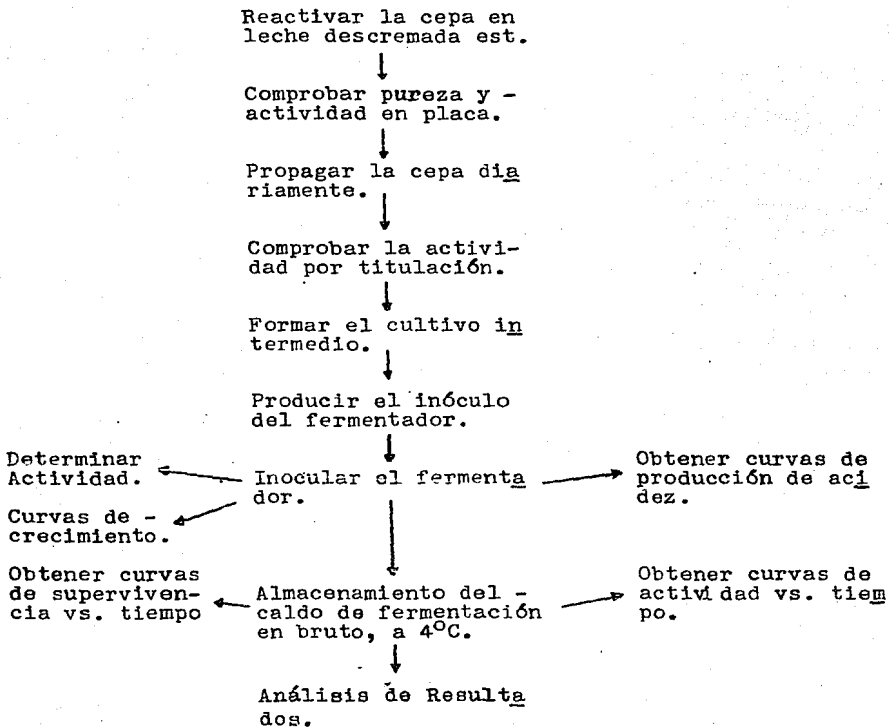
Baño maría, con agitación y control de temperatura; Shaker Bath, Mod. 2564, forma Scientific Marietta-Ohio.

5.3. Material biológico.

Streptococcus lactis NCDO 712

Streptococcus cremoris NCDO 924

DIAGRAMA DE FLUJO



7. Resultados y discusión de resultados:

La cinética de crecimiento de S. cremoris y S. lactis -- (figuras 1, 2, 3 y 4), se determina para, en cierto modo, -- apreciar la eficiencia del medio de cultivo para soportar -- el crecimiento de éstos microorganismos. Goldhaber (1982), para las cepas lentas de éstos microorganismos, realizó -- cuentas hasta de 10^9 CFU/ml. cultivados en similares condiciones. Las cepas rápidas de S. cremoris y S. lactis bajo -- éstas mismas condiciones rinden 100 veces más células en la mitad de tiempo.

S. cremoris NCDO 924 crece un poco más lentamente -- que S. lactis NCDO 712 y entra a la fase estacionaria aproximadamente 2 horas después de que S. lactis lo ha hecho. Los rendimientos celulares no son muy diferentes al final -- de la fermentación. La fermentación se realizó primeramente en fermentador de 1 litro, dado que a ésta escala es más fácil controlar todas las variables y estudiar más a fondo -- el comportamiento de los E.L. al crecer en cultivo por lote con control de pH. Al escalar el proceso, pueden presentarse otros problemas ó en el mayor de los casos, se hacen más grandes los mismos problemas, por lo que a ello obedece éste estudio.

Las curvas de S. cremoris son esencialmente iguales tanto en crecimiento en fermentador de 1 y 14 litros como -- en rendimiento, ya que en ambos casos se obtienen los mismos rendimientos a los mismos tiempos.

S. lactis muestra curvas de cinética de crecimiento muy similares en los dos sistemas y, aunque son diferentes a las de S. cremoris, también se obtienen los mismos rendimientos a los mismos tiempos.

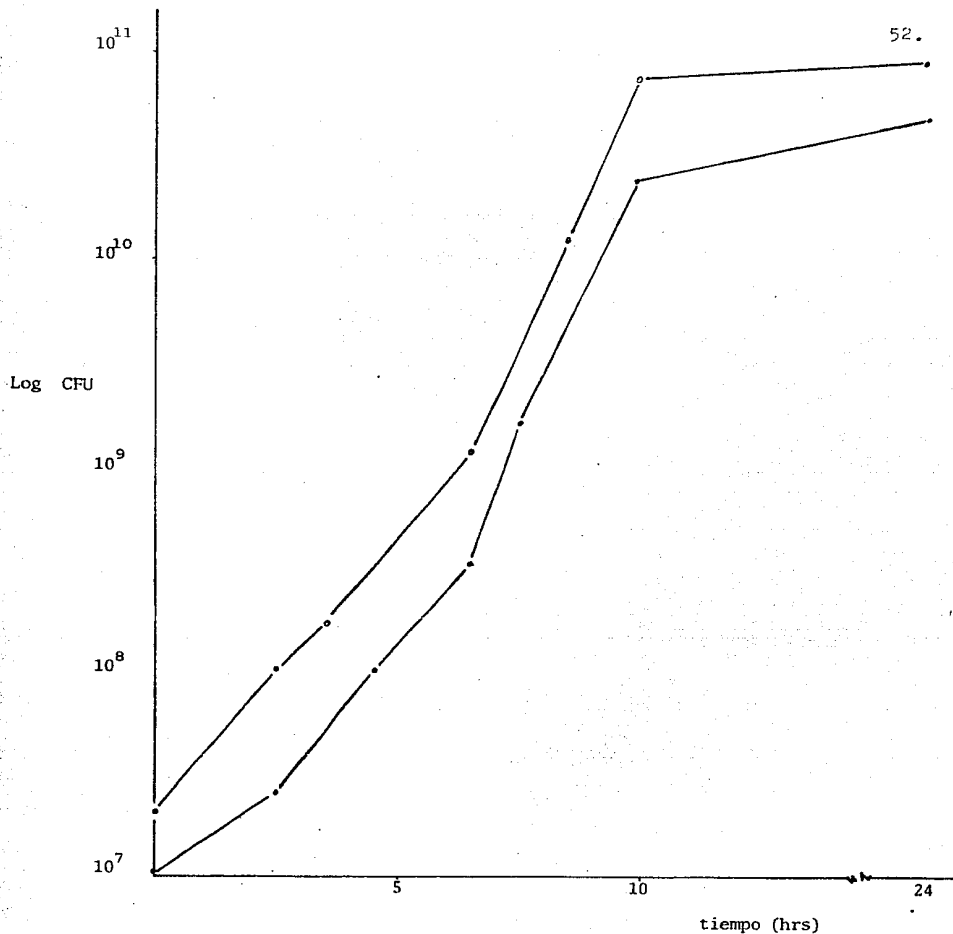


Fig. 1 CINETICA DE CRECIMIENTO DE STREPTOCOCCUS CREMORIS NCD0 924

Condiciones: Fermentador de 1 lt a 30°C de temperatura, agitación 200 r.p.m., -- control automático de pH 6.9 (con NaOH. 2N estéril) en medio de caseinato de sodio.

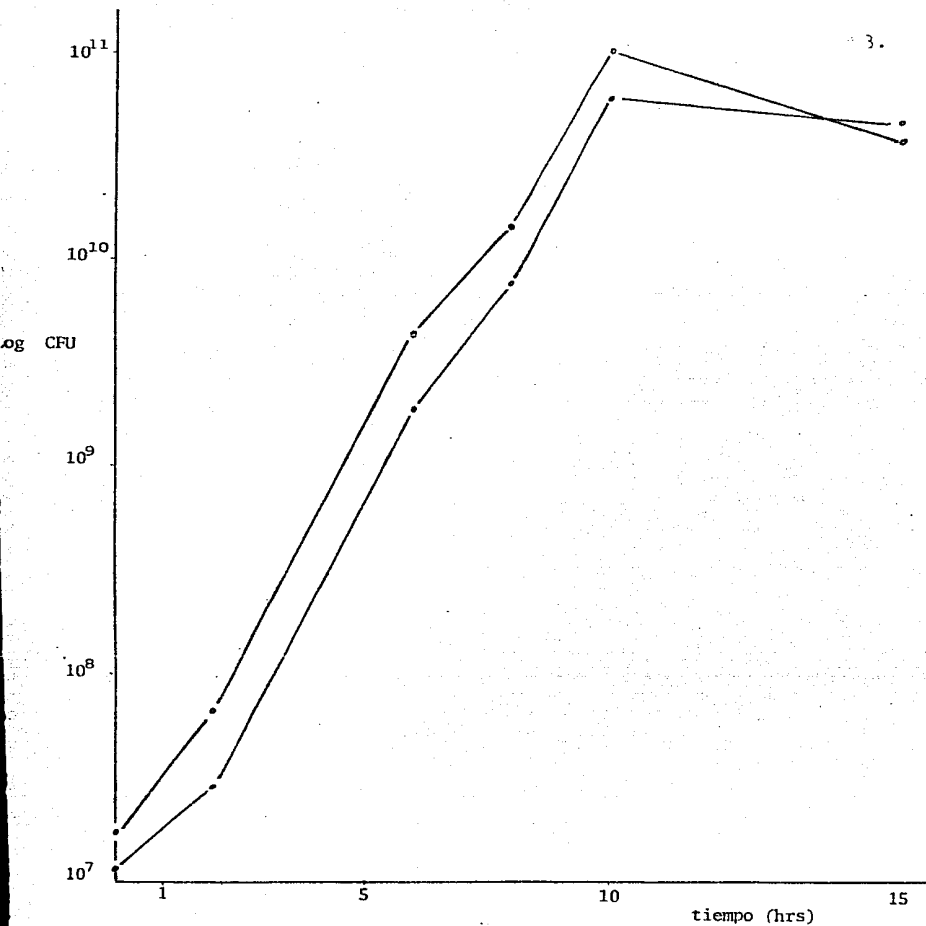


Fig. 2 CINETICA DE CRECIMIENTO DE STREPTOCOCCUS CREMORIS NCD 924

Condiciones: Fermentador de 14 lt a 30°C de temperatura, agitación 200 r.p.m., - control automático de pH 6.9 (con NaOH 5N estéril) en medio -- de caseinato de sodio.

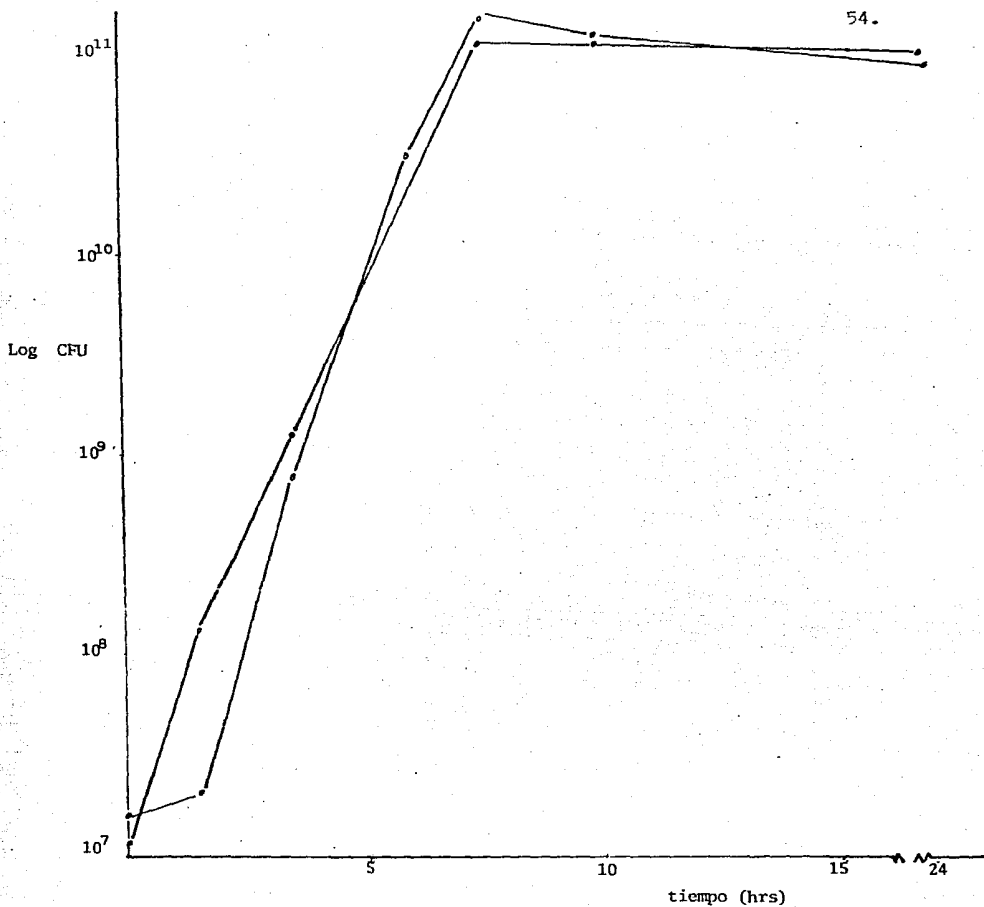


FIG. 3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE STREPTOCOCCUS LACTIS NCDO 712

Condiciones: Fermentador de 1 lt a 30°C de temperatura, agitación 200 r.p.m., -- control automático de pH 6.9 (con NaOH 2N estéril) en medio de caseinato de sodio.

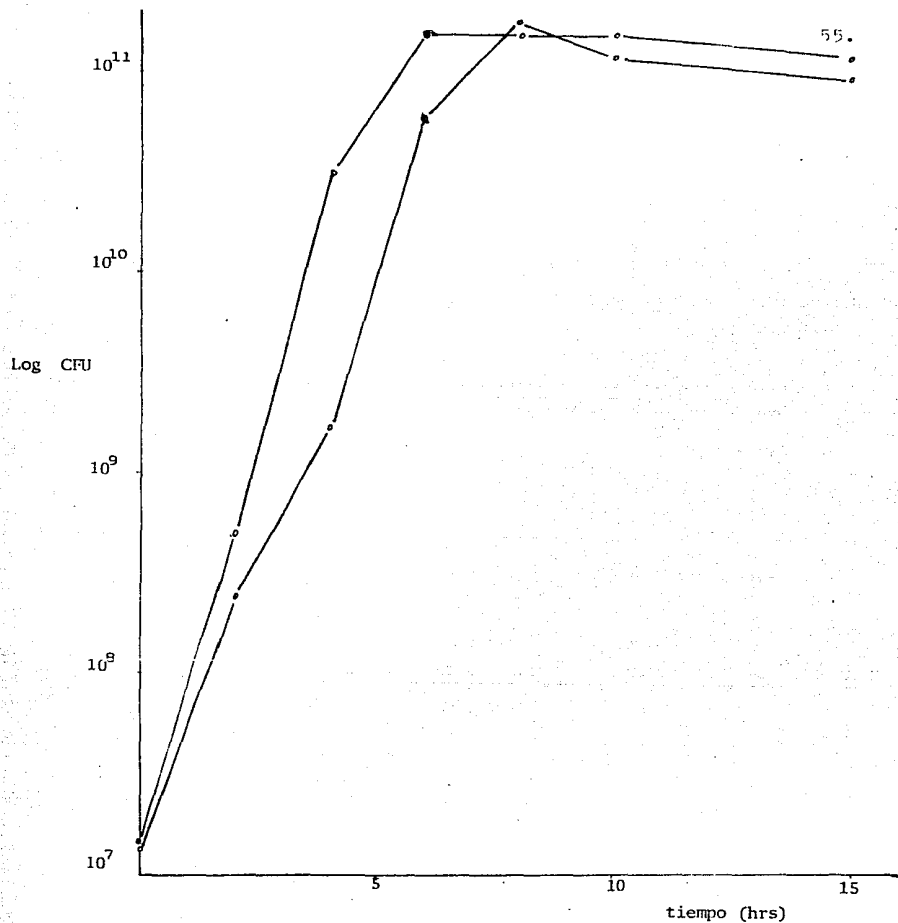


FIG. 4 CINETICA DE CRECIMIENTO DE STREPTOCOCCUS LACTIS NCD 712

Condiciones: Fermentador de 14 lt a 30°C de temperatura, agitación 200 r.p.m., - control automático de pH 6.9 (con NaOH 5N estéril) en medio de caseinato de sodio.

La actividad de los estreptococos lácticos sólo pudo ser cuantificada cuando éstos microorganismos crecían en fermentados de 1 litro, durante el escalamiento no fué posible ya que no se contaba con el equipo, hecho por el cual, la discusión es únicamente sobre la evolución de acidez en cultivo por lote en volúmen de 1 litro.

S. cremoris empieza a producir ácido láctico a las 3 horas de incubación y el incremento en su producción es directamente proporcional al tiempo sólo durante la fase de crecimiento, ésta relación se termina aproximadamente a las 15 horas de fermentación (Fig. 5).

S. cremoris en la fase exponencial, produce aproximadamente 0.0333 mol. de ácido láctico/hora. Esta tasa de producción se mantiene algunas horas después de que los microorganismos han entrado a la fase estacionaria, cosa que también ocurre con S. lactis (Fig. 6).

S. lactis observa un comportamiento similar a -- S. cremoris pero presenta las siguientes diferencias: la tasa de producción de ácido láctico es de aproximadamente -- 0.040 moles de ácido láctico/hora y produce cerca de 20% -- más ácido láctico que S. cremoris en tan sólo 13 horas.

La realización de este estudio tuvo como objetivo, el determinar la cantidad de acidez que se genera, cuando se propagan éstos microorganismos a través del sistema de cultivo por lote, para con ello calcular la cantidad de -- NaOH 2.ON a utilizar. De éste estudio, realizado con NaOH -- 2.ON, se dedujo que era mejor utilizar el álcali más concentrado por ser más fácil de manejar, recomendándose para uso posterior en concentración del 20% (5.ON).

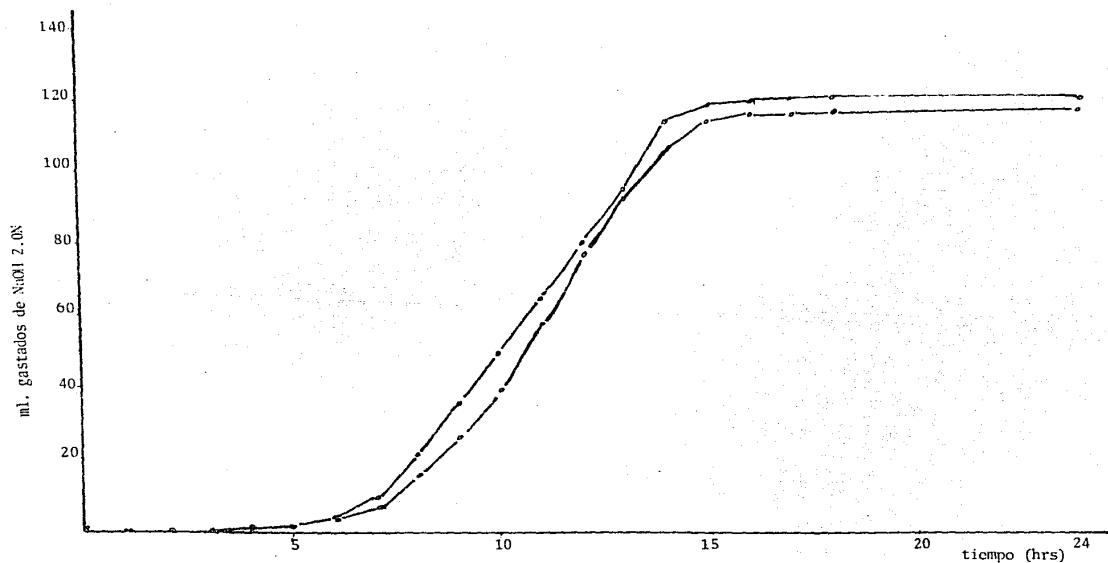


FIG. 5 ACTIVIDAD DE STREPTOCOCCUS CREMORIS NCCO 924

Condiciones: Fermentador 1 lt a 30°C de temperatura, agitación 200 r.p.m., control automático de pH 6.8 (con NaOH 2N estéril) en medio de caseinato de sodio.

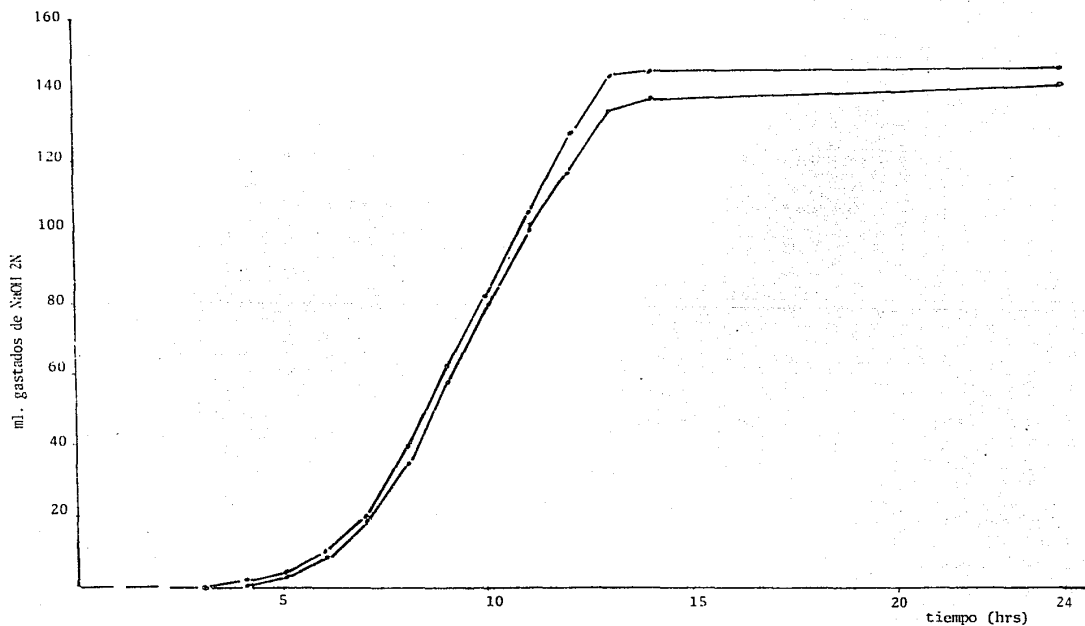


FIG. 6 ACTIVIDAD DE STREPTOCOCCUS LACTIS NCDO 712

Condiciones: Fermentador 1 lt a 30°C de temperatura, agitación 200 r.p.m., control automático de pH 6.8 (con NaOH 2N estéril) en medio de caseinato de sodio.

La viabilidad tiene por objetivo el determinar la eficiencia de la refrigeración como un buen método de conservación de las cepas con éste sistema, es decir, desde la propagación en éste medio de cultivo propuesto por Goldhaber (1982), con control automático del pH con NaOH y de la conservación propiamente dicha, del paquete celular en su medio de cultivo.

A éste respecto, existen marcadas diferencias con respecto a las cepas lentas de S. cremoris. S. cremoris es muy delicado (Figuras 7 y 8) y su viabilidad disminuye notablemente con el tiempo de almacenamiento, al grado de que sólo se conserva un 10% de las células originales con vida a los 10 días de refrigeración y tan sólo, de un 0.1 a un 0.7% después de 30 días.

La mortalidad se agrava cuando se escala, tal vez debido a que en el primer caso, la fermentación se mantiene por espacio de 24 horas y en el segundo por sólo 15. El hecho de parar la fermentación, implica que en el medio exista un remanente de lactosa que puede ser metabolizada por los E.L. durante el almacenamiento para satisfacer el metabolismo basal de los microorganismos. Lo anterior se desprende del hecho de que a los 2 días de almacenamiento, el medio tiene un pH de 5.4, contribuyendo a hacerlo inadecuado para la conservación de los microorganismos.

La viabilidad de S. lactis permanece casi constante a lo largo de todo el período de almacenamiento aunque como en el caso anterior, el pH baja a niveles de 5 lo cual quiere decir que S. lactis es también, más tolerante a la acidez (Figs. 9 y 10). En ambos casos, la baja en la acidez y por consecuencia, la disminución de la actividad, puede deberse a que el medio no es enfriado con la suficiente rapidez como para que la velocidad del metabolismo de la lactosa se frene, ya que los microorganismos al alcanzar la fase estacionaria continúan produciendo ácido.

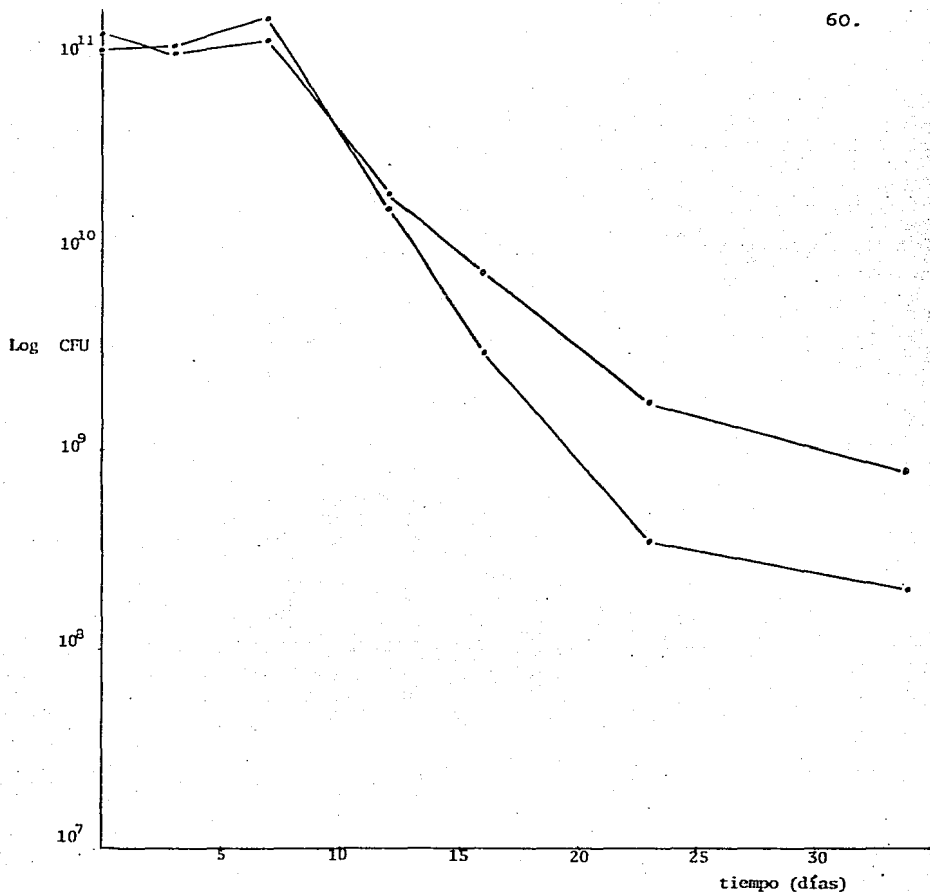


FIG. 7 VIABILIDAD DE STREPTOCOCCUS CREMORIS NCDO 924
RESPECTO AL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Condiciones: La cepa fué crecida en fermentador de 1 lt, en condiciones controladas y se conservó en refrigeración a 4°C.

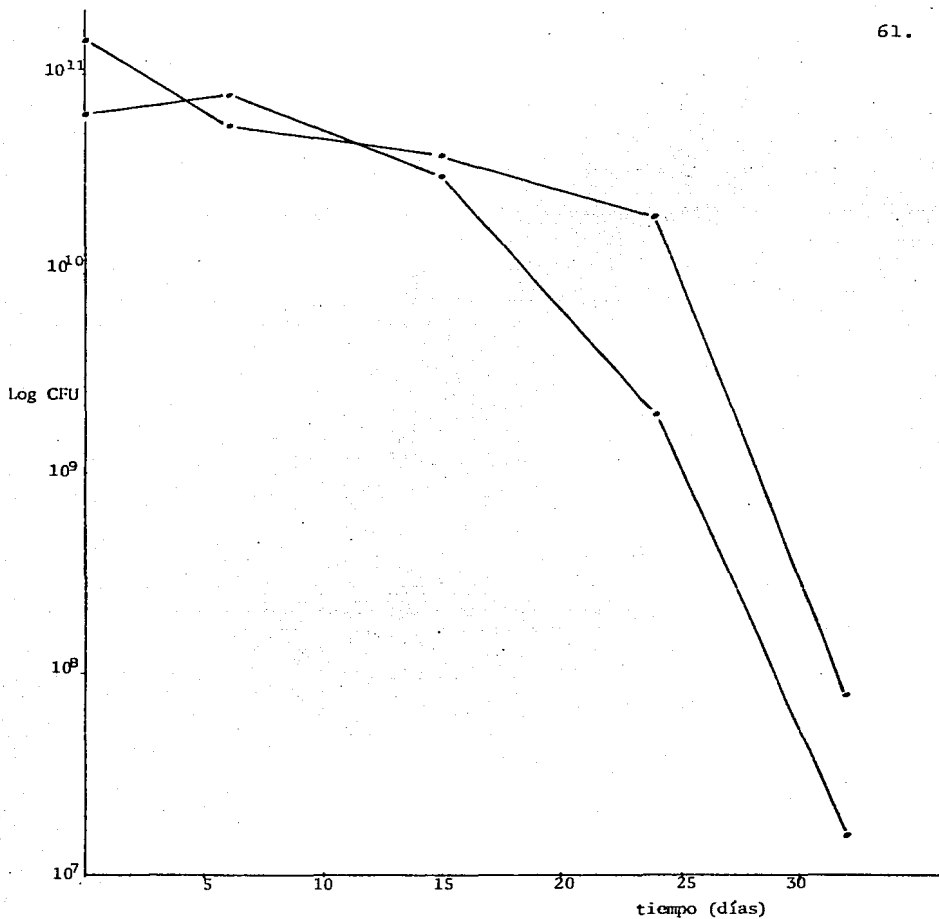


Fig. 8 VIABILIDAD DE STREPTOCOCCUS CREMORIS NCO 924
RESPECTO AL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Condiciones: La cepa fué crecida en fermentador de 14 lt. en condiciones controladas y se conservó en refrigeración a 4°C.

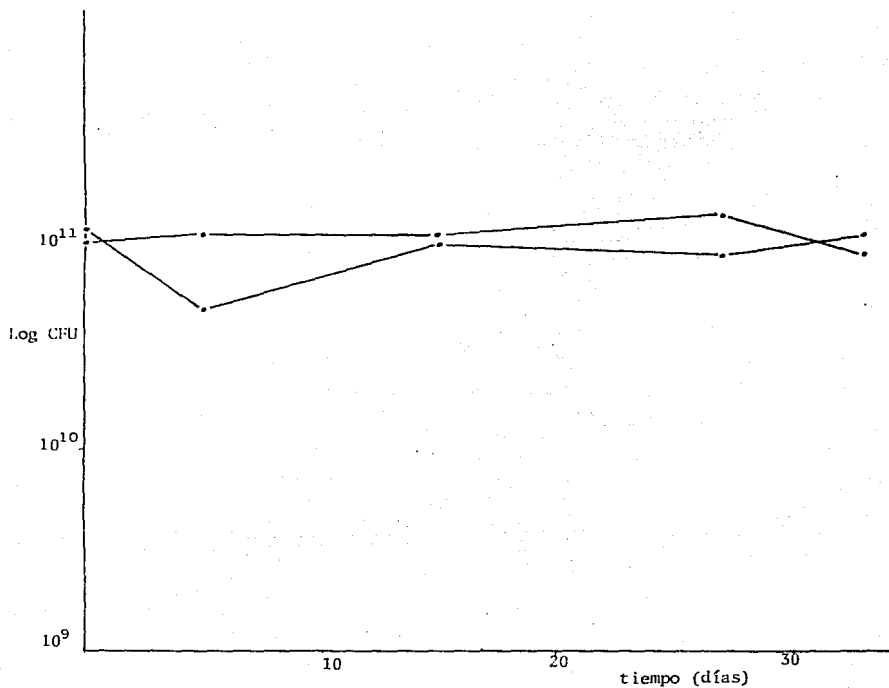


FIG. 9 VIABILIDAD DE STREPTOCOCCUS LACTIS NCDO 712
RESPECTO AL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Condiciones: La cepa fué crecida en fermentador de 1 lt, en condiciones controladas y se conservó en refrigeración a 4°C.

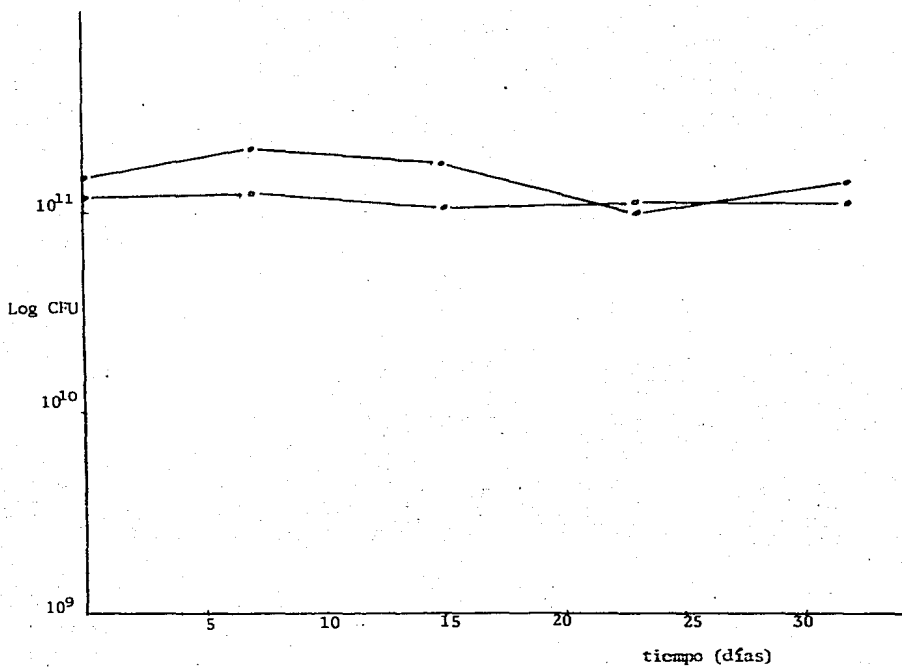


FIG. 10 VIABILIDAD DE STREPTOCOCCUS LACTIS NCD 712
RESPECTO AL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Condiciones: La cepa fué crecida en fermentador de 14 lt. en condiciones controladas y se conservó en refrigeración a 4°C.

La actividad es uno de los parámetros más importantes a determinar y que en cierta forma nos puede dar idea de la capacidad de los cultivos para crecer en leche. El hecho de que las cepas puedan recobrar su actividad normal con la resiembra implica que con el método de conservación empleado, se puede garantizar en cierta forma la estabilidad de los cultivos, pudiéndose recomendar en todo caso este método para uso industrial.

La actividad de S. cremoris durante los primeros 7 días de almacenamiento (Fig. 11), se vé estimulada y se aumenta un poco la acidez titulable de la leche cuando se inocula con éste microorganismo, tal vez este aumento sea debido al extracto de levadura ya que se puede observar el mismo efecto cuando se emplea leche suplementada con pequeñas cantidades de este producto. Otro factor que pudo haber contribuído es el hecho de mantener la fermentación por espacio de 24 horas puesto que en el escalamiento, con sólo 15 horas de fermentación, no se puede apreciar el mismo fenómeno. (Fig. 12).

La actividad de S. cremoris llega a niveles del 50% de la normal tras 15 días de almacenamiento a 4°C y tan sólo se alcanza a producir muy poca acidez después de 30 días, queriendo esto decir que S. cremoris sufre daños bastante considerables bajo estas condiciones. Durante resiembras subsiguientes de éste microorganismo, se tienen resultados bastante irregulares ya que algunos casos produce muy poca acidez (no se recupera la actividad) y en otros, la actividad vuelve a su nivel normal y en las siguientes resiembras se puede volver a perder con facilidad.

En S. lactis (Figs. 13 y 14), la actividad se mantiene en un rango aceptable por más tiempo. Cuando la cepa fué crecida en fermentador de 1 litro por 24 horas, la actividad se mantuvo en un rango más o menos estable por espacio de 20 días, tras los cuales cae sensiblemente, a los 24 días de almacenamiento, la actividad alcanza sólo el 50% de la normal.

Tanto en el escalamiento como en fermentador de 1 litro, se puede apreciar como en el caso de S. cremoris, un aumento en la actividad durante los primeros días de almacenamiento, retornando a su nivel normal a los pocos días

para entrar en una fase de decadencia, más acentuada en el esclamamiento.

Parece ser que el efecto estimulante del crecimiento - es debido a algún componente del medio de cultivo y además, en el caso de S. lactis, lo hace soportar las difíciles condiciones del medio.

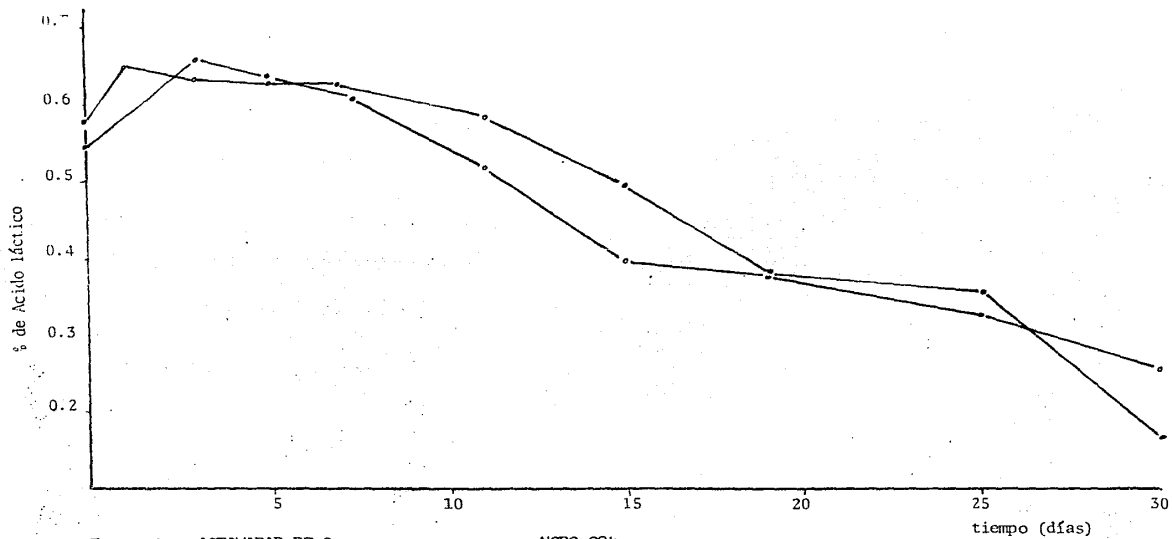


FIG. 11 ACTIVIDAD DE STREPTOCOCCUS CREMORIS NCDO 924
RESPECTO AL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Condiciones: La cepa fué criada en fermentador de 1 lt, en condiciones normales
y se conservó en refrigeración a 4°C.

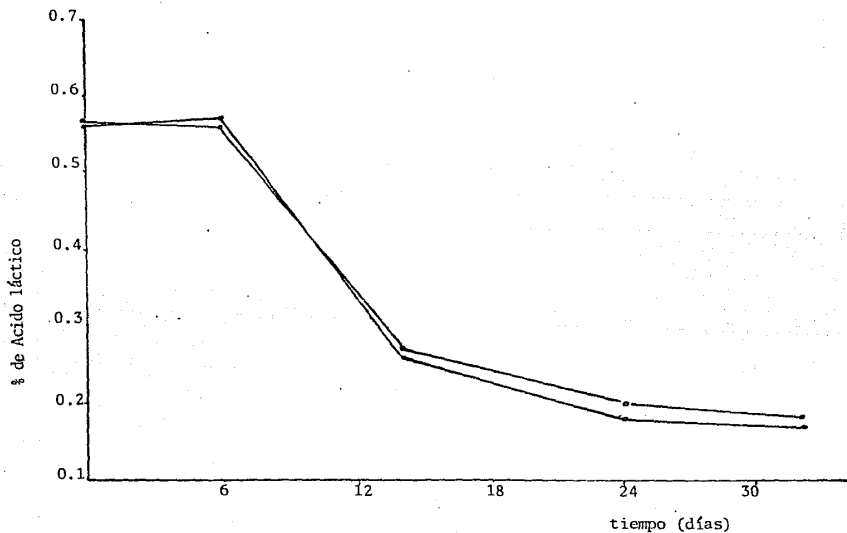


Fig. 12 ACTIVIDAD DE STREPTOCOCCUS CREMORIS NCDO 924
RESPECTO AL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Condiciones: La cepa fué crecida en fermentador de 14 lt, en condiciones normales y se conservó en refrigeración a 4°C.

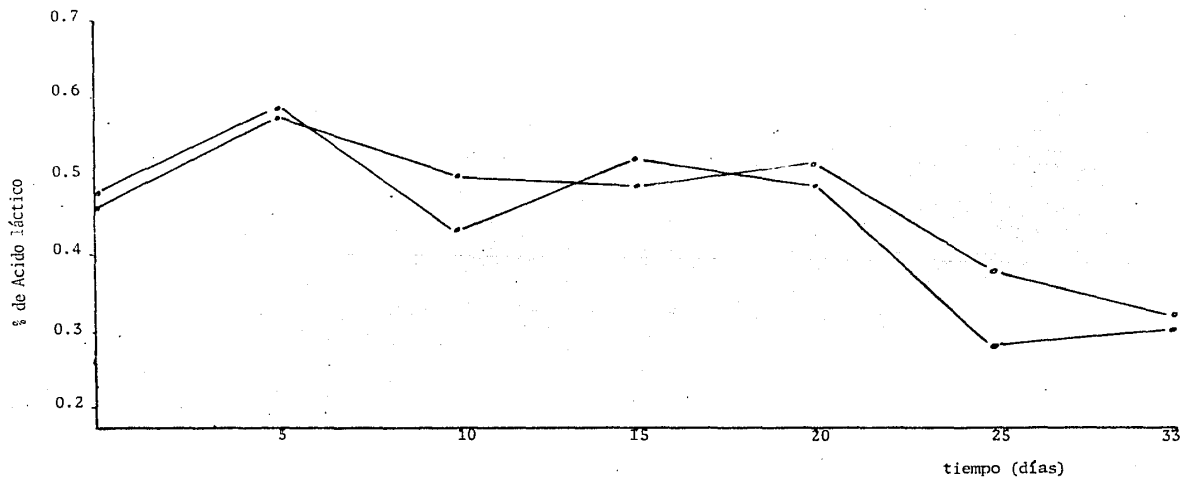


FIG. 13 ACTIVIDAD DE STREPTOCOCCUS LACTIS NCDO 712
RESPECTO AL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Condiciones: La cepa fué crecida en fermentador de 1 lt, en condiciones normales
y se conservó en refrigeración a 4°C.

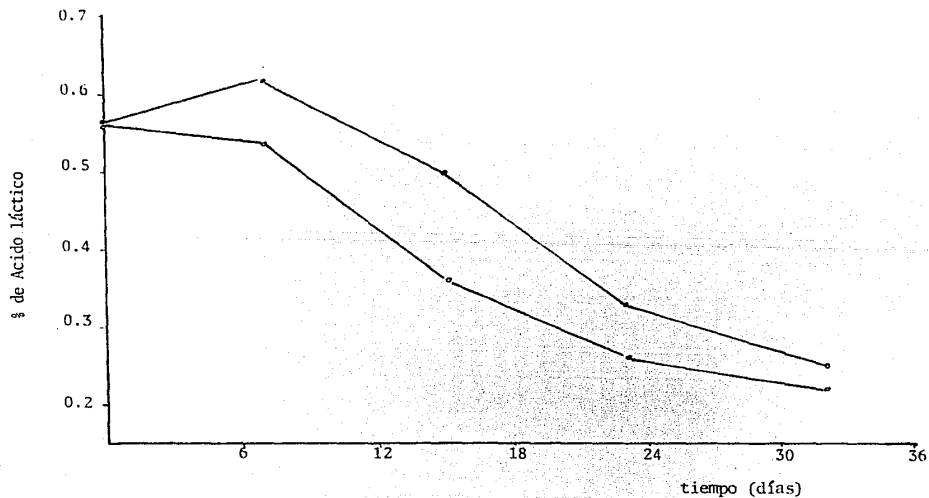


FIG. 14 ACTIVIDAD DE STREPTOCOCCUS LACTIS NCDO 712
RESPECTO AL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Condiciones: La cepa fué crecida en fermentador de 14 lt, en condiciones normales y se conservó en refrigeración a 4°C.

Tabla 12. Resultados.

Días	<u>Streptococcus cremoris</u>		Actividad*		<u>Streptococcus lactis</u>		Actividad	
	1 L.	14 L.	1 L.	14 L.	1 L.	14 L.	1 L.	14 L.
1	1.1×10^{11}	1.3×10^{11}	0.57	0.56	1.5×10^{11}	1.5×10^{11}	0.48	0.56
6	1.4×10^{11}	8.0×10^{10}	0.62	0.56	1.2×10^{11}	2.2×10^{11}	0.53	0.58
14	2.1×10^{10}	5.5×10^{10}	0.44	0.26	1.4×10^{11}	1.83×10^{11}	0.51	0.43
24	6.1×10^9	1.61×10^{10}	0.34	0.19	1.4×10^{11}	1.1×10^{11}	0.29	0.29
32	2.7×10^9	5.7×10^7	0.39	0.17	1.4×10^{11}	1.5×10^{11}	0.28	0.23

Actividad* - Acidez producida en 9 ml. de leche descremada e incubada a 30°C por 6 hrs.

Tabla 13.

Tiempos de duplicación* de S. cremoris y S. lactis en fermentador de 1 litro y de 14 litros en medio de caseinato de sodio.

<u>Streptococcus cremoris</u>		<u>Streptococcus lactis</u>	
<u>1 L.</u>	<u>14 L.</u>	<u>1 L.</u>	<u>14 L.</u>
0.7748 hrs.	0.7494 hrs.	0.6293 hrs.	0.5087 hrs.

* Los datos son los valores promedios de los tiempos de duplicación de las curvas antes expuestas.

8. Conclusiones.

Todo el desarrollo experimental, incluidos los estudios de cinética de crecimiento y de actividad, así como el de la viabilidad, fueron realizados muy similarmente a los efectuados por Goldhaber (1982).

En relación a las cinéticas de crecimiento de S. cremoris y S. lactis, se encontró que: a) S. lactis crece más rápido -- que S. cremoris; b) S. lactis entra en fase estacionaria más rápido que S. cremoris; c) se obtienen rendimientos celulares semejantes para los dos microorganismos al final de la fermentación; d) no existen diferencias notables en los rendimientos celulares para el escalamiento de la fermentación de -- Streptococcus lactis, igual sucede con S. cremoris.

Los tiempos de duplicación para S. cremoris no cambian en los dos sistemas (tabla 13) y mejoran un poco en el escalamiento para S. lactis.

Las cinéticas de crecimiento de las cepas rápidas de -- S. cremoris y S. lactis difieren completamente de las curvas reportadas por Goldhaber (1982). Las cepas rápidas de estrep-tococos rinden hasta 100 veces más células que las lentas, -- cultivadas en las mismas condiciones y en la mitad de tiempo.

S. lactis produce más ácido que S. cremoris al final de la fermentación y es capaz de metabolizar más rápido la lactosa. Las cepas rápidas de estreptococos producen varias veces más ácido que las cepas lentas en tiempos relativamente más cortos.

La mortandad de S. cremoris se acentúa con la exposición de éste microorganismo a pH bajo y S. lactis muestra ser mucho más resistente ya que mantiene poblaciones más ó menos -- estables en las mismas condiciones.

La viabilidad y la actividad muestran cierta correlación sólo en el caso de S. cremoris, para S. lactis ésta correlación no existe ya que aún manteniendo poblaciones altas, la actividad se aprecia en disminución. S. lactis en escalamiento, muestra más actividad que S. cremoris a los mismos tiempo.

pos de conservación en todo momento como se puede apreciar en la tabla 12, aunque no se puede observar el mismo fenómeno en el otro caso.

Golhaber (1982), reporta un comportamiento similar a éste para las cepas lentas sólo que los cambios en las curvas no son tan drásticos. Parece ser que las cepas se van haciendo más resistentes conforme van perdiendo actividad.

La actividad se mantiene en niveles suficientemente altos a través de éste sistema de conservación y es útil -- por un período de hasta 15 días para S. cremoris y de 24 -- días para S. lactis a nivel industrial, cumpliéndose el objetivo respecto a la producción y conservación de cultivos de estreptococos lácticos por refrigeración, puesto que sus propiedades tanto de actividad y viabilidad en los períodos mencionados, se encuentran dentro de las necesidades de la industria láctea.

9. Bibliografia.

- Ausavanadom, R. S., N., W.G. Young and G.H. Richardson, 1977. Lactic Bulk Culture System Utilizing Whey-Based - Bacteriophage Inhibitory Medium and pH Control. II, Reduction of Phosphate Requirements Under pH Control¹. - J. Dairy Sci. 60:8 1245-1251.
- Badings, H.T., H. Neeter., 1980. Recent Advances in -- the Study of Aroma Compounds of Milk and Dairy Products. Neth. Milk Dairy J. 34 9-30.
- Barach, J.T. 1979. Improved Enumeration of Lactic Acid Streptococci on Elliker Agar Containing Phosphate. App. Enviromen. Microbiol. 38:1, 173-174.
- Bergey's. 1974. Manual of Determinative Bacteriology. - 9a. Ed.- The Williams and Wilkins Company, Baltimore, - U.S.A.
- Chen, Y.L. and G.H. Richardson., 1977. Lactic Bulk Culture System Utilizing Whey-Based Bacteriophage Inhibitory Medium and pH Control. III. Aplicability to Cottage Cheese Manufacture¹. J. Dairy Sci. 60:8, 1252-1255.
- Citti, J.E., W.E. Sandine and P.R. Elliker. 1963. Some Observations on the Hull Method for Measurement of Proteolysis in Milk. J. Dairy Sci. 46:2, 337.
- Citti, J.E., W.E. Sandine and P.R. Elliker. 1965. Comparison of Slow and Fast Acid-Producing Streptococcus -- lactis¹. J. Dairy Sci. 48, 14-18.
- Collins, E.B., J.C. Bruhn. 1970. Roles of Acetate and - Piruvate in the Metabolism of Streptococcus diacetylactis. J. of Bacteriology, 103:3, 541-546.
- Collins, E.B. 1977. Influence of Medium and Temperature on End Products and Growth. J. Dairy Sci. 60:5 799-804.
- Cowell, G.R., J.A. Koburger and S.J. Weese. 1966. Storage of Lactic Streptococci. I. Effect of pH on Survival and Endogenous Metabolism in Phosphate Buffer¹. J. -- Dairy Sci. 49, 365-369.
- Cowman, R.A., H.E. Swaisgood and M.L. Speck. 1967. Proteinase Enzyme System of Lactic Streptococci. J. of -- Bacteriol. 94:4, 942-948.

- Cowman, R.A., S. Yoshimura, and H.E. Swaisgood. 1968. Proteinase Enzyme System of Lactic Streptococci. III. Substrate Specificity of Streptococcus lactis Intracellular Proteinase. J. of Bacteriol. 95:1, 181-187.
- Cowman, R.A. and M.L. Speck. 1969. Low Temperature as an Environmental Stress on Microbial Enzymes. Cryobiol 5:5, 291-299.
- Cowman, R.A., D.C. Westhoff, H.E. Swaisgood, and M.L. Speck. 1970. Proteinase System of Lactic Streptococci IV. Relationship Between Proteinase Activity and -- Growth at 32°C. J. Dairy Sci. 53:2, 126-131.
- Crater, P.L., E.M. Mikolajcik. 1965. Nucleic Acid Derivatives Associated With Group N Streptococci. I. Cell-Free Fraction¹. J. Dairy Sci. 48:1, 1-7.
- Dahiya, R.S., M.L. Speck. 1964. Growth of Streptococcus Starter Cultures in Milk Fortified with Nucleic Acid - Derivatives¹. J. Dairy Sci. 47, 374-377.
- Daniell, S.D., W.E. Sandine. 1981. Development and Commercial Use of a Multiple Strain Starter. J. Dairy -- Sci. 64:3, 407-415.
- Davies, F.L. and M.J. Gasson. 1981. Reviews of the progress of Dairy Science: Genetics of Lactic Acid Bacteria. J. Dairy Res. 48, 363-376.
- Davies, F.L., H.M. Underwood and M.J. Gasson. 1981. -- The Value of Plasmid Profiles for Strain Identification in Lactic Streptococci and Relationship Between - Streptococcus lactis 712, ML3 and C2. J. App. Bacteriol 51: 1, 325-337.
- Elliker, P.R., A.W. Anderson, G. Hanneson. 1956. An -- Agar Culture Medium for Lactic Acid Streptococci and - Lactobacilli. J. Dairy Sci. 39, 1611- 1612.
- Exterkate, F.A., 1985. A Dual-Directed Control of Cell Wall Proteinase Production in Streptococcus cremoris - AM1: A Possible Mechanism of Regulation During Growth in Milk. J. Dairy Sci. 68:3, 562-571.

- Exterkate, F.A. 1984. Location of Peptidases Outside and Inside the Membrane of *Streptococcus cremoris*. *App. -- Enviromen. Microbiol.*, 47:1, 177-183.
- Feary, T.W., J.A. Mayo. 1984. Detection of Streptococcal Mutants Presumed to be Defective in Sugar Catabolism., *App. Enviromen. Microbiol.*, 47:6, 1348-1351.
- Federation Internationale de Laiterc. 1980. Bulletin. - Starters in Manufacture of Cheese. Document 129 , Chap. 2, pp. 5-34.
- de Valdez, G.F., de Giori, G.S., A.P. de Ruiz Holgado - G. Oliver., 1985. Effect of the Rehydration Medium on the Recovery of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria. *App. Enviromen. Microbiol.*, 50:3, 1339-1341.
- Gherna, R.L., 1981. Preservation., *Manual of Methods - for General Bacteriology.*, American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Gibson, C.A., G.B. Landerkin, P.M. Morse. 1966. Effects of Additives on The Survival of Lactic Streptococci in Frozen Storage., *App. Microbiol.* 14:4, 665-669.
- Gilliland, S.E. and M.L. Speck. 1969. Biological Response of Lactic Streptococci and Lactobacilli to Catalase. *App. Microbiol.*, 17:6, 797-800.
- Gilliland, S.E. and M.L. Speck. 1974. Relationship of Cellular Components to the Stability of Concentrated - Lactic Streptococcus Cultures at -17°C . *App. Microbiol.* 27:4, 793-796.
- Gilliland, S.E., 1977. Preparation and Storage of Concentrated Cultures of Lactic Streptococci. *J. Dairy -- Sci.*, 60:5, 805-808.
- de Giori, G.S., G.F. de Valdez, A.P. de Ruiz Holgado, G. Oliver., 1985. Effect of pH and Temperature on the Proteolytic Activity of Lactic Acid Bacteria., *J. Dairy Sci.*, 68:3, 2160-2164.
- Goldhaber Sadovich, Eduardo. "Estudios para la Producción y Conservación de Algunos Microorganismos de Interés Lactológico. Tesis Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Iberoamericana, México, D.F. 1982.

- Harvey, R.J., 1965. Damage to *Streptococcus lactis* - Resulting from Growth at Low pH., *J. Bacteriol.*, 90, 1330-1336.
- Hillier, A.J., G.H. Rice., 1978. Transport of Purine Bases by *Streptococcus lactis*., *J. Dairy Res.*, 45:1 277-282.
- Hugenholtz, J., R. Splint, W. N. Konings, H. Veldkamp. 1987. Selection of Protease-Positive and Protease-Negative Variants of *Streptococcus cremoris*. *App. Environmental Microbiol.*, 53:2, 309-314.
- Huggins, A.R. and W.E. Sandine. 1984. Differentiation of Fast and Slow Milk-Coagulating Isolates in Strains of Lactic Streptococci. *J. Dairy Sci.*, 67:8, 1674- - 1679.
- Keen, A.R., 1972. Growth Studies on the Lactic Streptococci. II. The Effect of Agitation on the Growth -- Characteristics of *Streptococcus lactis* ML8 in Batch Culture., *J. Dairy Research*. 39, 141-150.
- Keen, A.R., 1972. Growth Studies on the Lactic Streptococci. III. Observations on Continuous Growth Behaviour in Reconstituted Skim-Milk., *J. Dairy Res.* 39 - 151-159.
- Keen, A.R., 1972. Growth Studies on the Lactic Streptococci. IV. Some Observations on Redox Potential. - *J. Dairy Res.*, 39, 161-165.
- Keenan, T.W., 1968. Metabolism of Volatile Compounds by Lactic Starter Culture. Microorganism. A Review. - *J. Dairy Sci.*, 51:10, 1561-1567.
- King, D.H., J.A. Koburger. 1969. Storage of Lactic - Streptococci. III. Mobilization of Intracellular Nitrogenous Compounds During Starvation., *J. Dairy Sci.* 52:11, 1715-1719.
- Kondo, J.K., McKay, L.L., 1985. Gene Transfer Systems and Molecular Cloning in Group N Streptococci: A Review., *J. Dairy Sci.* 68:9, 2143-2159.

- Kothari, S.L., V.K.N. Nambudripad., 1973. Isolation - and Identification of Stimulatory Substance Involved in the Associative Growth of Cheese Cultures. J. -- Dairy Sci., 56:4, 423-428.
- Law, D.A., E. Sezgin and M.E. Sharpe. 1976. Amino -- Acid Nutrition of Some Commercial Cheese Starters in Relation to their Growth in Peptone-Supplemented Whey Media. J. Dairy Res., 43, 291-300.
- Law, B.A., 1977. Dipeptide Utilization by Starter -- Streptococci. J. Dairy Res., 44, 309-317.
- Law, B.A., 1978. Peptide Utilization by Group N Strep-tococci. J. of General Microbiol., 105, 113-118.
- Lee, D.A. and E.B. Collins. 1975. Influences of Tempe-rate on Growth of Streptococcus cremoris and -- Streptococcus lactis. J. Dairy Sci., 59:3, 405-409.
- Lee, H.M. and J.A. Koburger. 1969. Extended Storage - of Streptococcus lactis in Phosphate Buffer¹. J. -- Dairy Sci., 52:9, 1453-1455.
- LLOYD, G.T. and E.G. Pont., 1973. Some Properties of -- Frozen Concentrated Starters Produced by Continuous - Culture. J. Dairy Res., 40, 157-167.
- Marth, E.H., 1962. Symposium on Lactic Starter Cultu-res. III. Certain Aspects of Starter Culture Metabo--lism., J. Dairy Sci., 45, 1262-1292.
- McKay, L., A. Miller. III, W.E. Sandine, and P.R. -- Elliker., 1970. Mechanisms of Lactose Utilization by Lactic Acid Streptococci: Enzymatic and Genetic Ana-lyses¹. J. Bacteriol., 102:3, 804-809.
- McKay, L.L. and K.A. Baldwin. 1974. Altered Metabolism in a Streptococcus lactis C2 Mutant Deficient in Lac-tic Dehydrogenase. J. Dairy Sci., 57:2, 181-186.
- McKay, L.L. and K.A. Baldwin. 1974. Simultaneous Loss of Proteinase- and Lactose-Utilizing Enzyme Activities in Streptococcus lactis and Reverseal of Loss by Trans-duction. App. Microbiol., 28:3, 342-346.

McKay, L.L., K.A. Baldwin and J.D. Efsthaliou. 1976. Transductional Evidence for Plasmid Linkage of Lactose Metabolism in *Streptococcus lactis* C2., App. and - Environmental Microbiology. 32:1, 45-52.

McKay, L.L., 1978. Microorganisms and Their Instability in Milk and Milk Products. Food Technology., May - pp. 181-185.

McKay, L.L., K.A. Baldwin and P.M. Walsh. 1980. Conjugal Transfer of Genetic Information in Group N Streptococci. App. Enviromen. Microbiol., 40:1, 84-91.

McKay, L.L. and K.A. Baldwin. 1984. Conjugative 40-Megadalton Plasmid in *Streptococcus lactis* subsp. -- diacetylactis DR03 Is Associated with Resistance to Nisin and Bacteriophage. App. Enviromen. Microbiol. 47:1, 68-74.

Molskness, T.A., W.E., Sandine and L.R. Brown. 1974. Characterization of Lac⁺ Transductants of -- *Streptococcus lactis*. Appl. Microbiol., 28:5, 753--758.

Moustafa, H.H. and E.B. Collins. 1968. Role of Galactose or Glucose-1-Phosphate in Preventing the lysis - of *Streptococcus diacetylactis*. J. Bacteriol., 95:2 - 595-602.

Nolan, R.A. and W.G. Nolan. 1972. Elemental Analysis of Vitamin-Free Casamino Acids. Appl. Microbiol., -- 24:1, 290-291.

Orberg, P.K. and W.E. Sandine. 1985. Plasmid Linkage of Proteinase and Lactose Fermentation in -- -- *Streptococcus lactis* NCDO 1414. J. Dairy Sci., 68:3, 572-580.

Orberg, P.K. and W.E. Sandine. 1985. Survey of Antimicrobial Resistance in Lactic Streptococci. Appl. - Enviromen. Microbiol., 49:3, 538-542.

Peebles, M.M., S.E. Gilliland and M.L. Speck. 1969. Preparation of Concentrated Lactic Streptococcus --- Starters. Appl. Microbiol., 17:6, 805-810.

Reddy, M.S., E.R. Vedamuthu, C.J. Wasam and G.W. --- Reinbold. 1972. Agar Medium for Differential Enumeration of Lactic Streptococci. Appl. Microbiol., 24, - 947-952.

- Rice, G.H., 1978. The Uptake of Amino Acids and Peptides by *Streptococcus lactis*. *J. Dairy Res.*, 45, 93-107.
- Richardson, G.H., C.T. Cheng and R. Young. 1977. Lactic Bulk Culture System Utilizing a Whey-Based Bacteriophage Inhibitory Medium and pH Control. I. Applicability to American Style Cheese. *J. Dairy Sci.*, 60:3 378-386.
- Richardson, C.A. Ernstrom, J.M. Kim and C. Daly. 1983. Proteinase Negative Variants of *Streptococcus cremoris* for Cheese Starters. 1983. *J. Dairy Sci.*, 66:11, 2278-2286.
- Richardson, G.H., 1984. Proteinase Negative Cultures - for Cheese Making. *Cultured Dairy Products Journal.*, - Feb. 1984, pp. 6-15.
- Robinson, R.K., 1981. Microbiology of Starter Cultures, The Microbiology of Milk Products. *Dairy Microbiology Vol. 2.* Applied Science Publishers LTD, London, Eng.
- Robinson, R.K., 1982. Dairy Starters Reviewed. *Dairy - Industries International.* 47 (1), 19-23.
- Samples, D.R., R.L. Richter and C.W. Dill. 1984. Measuring Proteolysis in Cheddar Cheese Slurries: Comparison of Hull and Trinitrobenzene Sulfonic Acid Procedures. *J. Dairy Sci.*, 67:1, 60-63.
- Sandine, W.E., P.R. Elliker, A.W. Anderson. 1960. Taxonomic Study of High Carbon Dioxide Producing Lactic Acid Streptococci Isolated from Mixed Strain Starter - Cultures. *J. Dairy Sci.*, 42, 799-808.
- Sandine, W.E., 1977. New Techniques in Handling Lactic Cultures to Enhance their Performance. *J. Dairy Sci.*, 60:5, 822-827.
- Sellers, R.L., 1981. Fermented Dairy Foods. *J. Dairy - Sci.*, 64:6, 1070-1076.
- Shelaih, M.S., A.Y.E. Gamay, S.L. Wright and G.H. --- Richardson. 1983. Temperature Sensitivities of Proteinase Negative Variants of Lactic Streptococci. *J. Dairy Sci.*, 66:11, 2287-2289.
- Sherman, J.M., 1955. *Streptococcus lactis* and the Streptococci of the So-called Lactic Group. *J. Dairy Sci.*, 38, 1184-1187.

- Simmons, J.C., D.M. Graham. 1959. Maintenance of Active Lactic Cultures by Freezing as an Alternative to -- Daily Transfer. *J. Dairy Sci.*, 42, 363-364.
- Selby, J.S., A.J. Hillier and G.J. Lees. 1975. The Nature of the Stimulation of the Growth of *Streptococcus lactis* by Yeast Extract. *J. Dairy Res.*, 42, 123-135.
- Smittle, R.B. and J.A. Koburger. 1968. Storage of Lactic Streptococci. II. Proteinase Synthesis Following -- Storage in Phosphate Buffer. *J. Dairy Sci.*, 51:11 1752-1755.
- Speckman, C.A., W.E. Sandine and P.R. Elliker. 1974. -- Lyophilized Lactic Acid Starter Culture Concentrates: Preparation and Use in Inoculation of Vat Milk for -- Cheddar and Cottage Cheese. *J. Dairy Sci.*, 57:2, 165-1973.
- Stahdhouders, J., 1976. Factors Affecting the Result -- of an Activity Test of Mesophilic Cheese Starters. -- B-Doc 48 International Dairy Federation.
- Stamer, J.R., 1979. The Lactic Acid Bacteria Microbes of Diversity. *Food Technology*. Jan 1979.
- Terzaghi, B.E. and W.E. Sandine. 1975. Improved Medium for Lactic Streptococci and Their Bacteriophages. -- *Appl. Microbiol.*, 29:6, 807-813.
- Mortimer, P. S., H. Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, -- H.G. Schelegel. 1981. The Family Streptococcaceae -- (Nonmedical Aspects). Chapter 129. *The Prokaryotes. -- A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Ed. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 1615-1630.
- Thomas, T.D. y R.D. Batt. 1968. Survival of *Streptococcus lactis* in Starvation Conditions. *J. Gen. Micro--biol.*, 50, 367-382.
- Thomas, T.D. and R.D. Batt. 1969. Degradation of Cell Constituents by Starved *Streptococcus lactis* in rela--tion to Survival. *J. Gen. Microbiol.*, 58, 347-362.
- Thomas, T.D. and R.D. Batt. 1969. Synthesis and Ribonucleic Acid by Starved *Streptococcus lactis* in Relation to Survival. *J. Gen. Microbiol.*, 58, 363-369.

- Thomas, T.D. and R.D. Batt. 1969. Metabolism of Exogenous Arginine and Glucose by Starved *Streptococcus lactis* in Relation to Survival. *J. Gen. Microbiol.*, 58, 371-380.
- Thomas, T.D., D.C. Ellwood and V.M.C. Longyear. 1979. Change from Homo- to Heterolactic Fermentation by *Streptococcus lactis* Resulting from Glucose Limitation in Anaerobic Chemostat Cultures. *J. Bacteriol.* 138:1, 109-117.
- Thomas, T.D. and K.W. Turner. 1981. Carbohydrate fermentation by *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis* Growing in Agar Gels. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41:6, 1289-1294.
- Thompson, J., K.W. Turner and T.D. Thomas. 1978. Catabolite Inhibition and Sequential Metabolism of Sugars by *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, 123:3, 1163-1174.
- Thompson, J., 1979. Lactose Metabolism in *Streptococcus lactis*: Phosphorylation of Galactose and Glucose Moieties in Vivo. *J. Bacteriol.*, 140:3, 774-785.
- Thunell, R.K. and W.E. Sandine. 1981. Phage Insensitive, Multiple-Strain Starter Approach to Cheddar Cheese Making. *J. Dairy Sci.*, 64:11, 2270-2277.
- Thunell, R.K., 1984. Frozen Starters from Internal-pH Control-Growth Cultures. *J. Dairy Sci.*, 67:1, 24-36.
- Turner, N., W.E. Sandine, P.R. Elliker and E.A. Day. 1963. Use of Tetrazolium Dyes in an Agar Medium for Differentiation of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *J. Dairy Sci.*, 49, 380-385.
- de Valdez, F.G., G.S. de Giori, A.A.P. de Ruiz Holgado and G. Oliver. 1983. Protective Effect of Adonitol on Lactic Acid Bacteria Subjected to Freeze-Drying. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45:1, 302-304.
- de Valdez, F.G., G.S. de Giori, A.P. de Ruiz Holgado, G. Oliver. Effect of Drying Medium on Residual Moisture Content and Viability of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49:2, 413-415.

Vegarud, G., H.B. Casterberg and T. Langsrud. 1983. - Autolysis of Group N Streptococci. Effects of Media - Composition Modifications and Temperature. J. Dairy - Sci., 66:11,2294-2302.

Westhoff, D.C., R.A. Cowman and M.L. Speck. 1970. -- Effect of Storage at 3°C on the Proteinase Enzyme -- System of Slow and Fast Strains of Lactic Streptococci. J. Dairy Sci., 53:8, 1023-1027.

Westhoff, D.C., 1970. Influence of the Growth Medium on the Proteinase System of Streptococcus lactis No. 3. J. Dairy Sci., 53:9, 1286-1287.

Wilkowske, H.H. and E.L. Fouts. 1957. Continuous and Automatic Propagation of Dairy Cultures. J. Dairy -- Sci., 40:1, 49-55.

Williamson, W.T. and M.L. Speck. 1962. Proteolysis - and Curd Tension in Milk Associated with Accelerated Starter Culture Growth. J. Dairy Sci., 45, 164-169.

Wright, S.L. and G.H. Richardson. 1962. Optimization of Whey-Based or Nonfat Dry Milk-Based Media for Production of pH Controlled Bulk Lactic Cultures. J. - Dairy Sci., 65:10, 1882-1889.

Yang, N.L. and W.E. Sandine. 1979. Acid-Producing - Activity of Lyophilized Lactic Streptococcal Cheese Starter Concentrates. J. Dairy Sci., 62:6, 908-915.