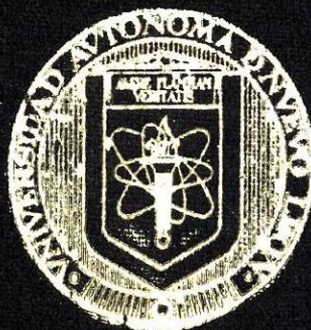


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CUATRO
CEPAS DE INTERES LACTOLOGICO
A PARTIR DE PRODUCTOS COMERCIALES**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
PRESENTA**

MA. DE LOS ANGELES CHARLES SOLIS

MARIN, N. L.

OCTUBRE DE 1991

T
SF253
Ch3
c.1



1080061783

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMIA



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CUATRO
 CEPAS DE INTERÉS LACTOLÓGICO
 A PARTIR DE PRODUCTOS COMERCIALES.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS
PRESENTA

MA. DE LOS ANGELES CHARLES SOLIS

MARINI, M. L.

OCTUBRE DE 1991

10851 e

T
SF253
Ch3



040.637
FA1
1991
Q.5

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA
DEPARTAMENTO DE INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CUATRO
CEPAS DE INTERES LACTOLOGICO
A PARTIR DE PRODUCTOS COMERCIALES


TESIS
QUE COMO REQUISITO PARCIAL,
PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS


P R E S E N T A

Ma. de los Angeles Charles Solís

COMISION REVISORA


Ph. D. Rigoberto González González


Ing. Manuel Treviño Cantú


Ing. M.C. Mauricio Garza Chapa

Marín N.L.

Octubre de 1991

**" TODO HOMBRE DEBE DECIDIR UNA VEZ EN LA VIDA:
SI SE LANZA A TRIUNFAR ARRIESGANDOLO TODO
O SE SIENTA A CONTEMPLAR
EL PASO DE LOS TRIUNFADORES "**

DEDICATORIAS

A DIOS:

**En agradecimiento por haberme colmado de bendiciones
toda mi vida, por haber sido siempre para mí, el
mejor de los amigos y por haberme permitido lograr
un triunfo más.**

A la Virgen MA. AUXILIADORA:

**A ti madre de bondad por haber
estado conmigo siempre dispuesta
a escuchar.**

A MIS PADRES:

Sr. José Ma. Charles T.

Sra. Ma. Elena Solís G.

A ti papá:

**Por haberme permitido aprender de ti que
sólo con esfuerzo, responsabilidad y
trabajo se logran las cosas que uno tanto
deseara. Gracias por todo tu amor.**

TE QUIERO.

A TI MAMA:

**Por haber inculcado siempre en mí
el afán de superación y el mirar siempre
hacia adelante como lo haz hecho tú.
"Cuando un hombre sabe a dónde va...
el mundo entero se aparta para darle paso"**

TE QUIERO.

A mis hermanos:

Dante Luis y José Karlo

**Por los momentos inolvidables que he mos
compartido juntos.**

**A mi abuelita Caritina y todos
mis tíos y primos, por su apoyo y cariño**

**A mi tío Lic. José Luis Solís G.
Por haber sido para mí, siempre el ejemplo
vivo de la superación y la sabiduría; gracias
por haberme permitido aprender de usted.**

A mis AMIGOS

Deyla	Janeth	Aldo	Omar	Guillermo
Edgar	Israel	Raúl	Abuelo	Berna
Patty	Rosa	Enri	Mundo	

**y todos mis demás compañeros por su cariño y
amistad desinteresada, por los sueños compartidos
y los inolvidables momentos.**

Al Ph. D. Rigoberto González González

**Por la brillante asesoría de este trabajo, así
como la amistad reflejada en la confianza y
entusiasmo para su realización.**

Gracias por sus grandes enseñanzas.

A todos MIS MAESTROS:

**En agradecimiento a los valiosos conocimientos
que me transmitieron y forjaron mi preparación.**

A mi NOVIO:

Ing. Luis Francisco Torres Ruiz:

Por su gran apoyo y comprensión, por el gran amor que siempre me ha demostrado de muchas maneras y por los maravillosos momentos que hemos compartido.

TE ADORO.

INDICE

	PAG
INTRODUCCION	1
REVISION DE LITERATURA	5
I.- ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LA LECHE	5
I.1 Introducci3n	5
I.2 Composici3n qu3mica de la leche	6
I.2.1 Carbohidratos	6
I.2.2 L3pidos	9
I.2.3 Prote3nas	10
I.2.4 Enzimas	11
I.2.5 Vitaminas	11
I.2.6 Sales Minerales	12
II.- PRINCIPALES ESPECIES BACTERIANAS DE INTERES LACTOLOGICO	14
II.1 Introducci3n	14
II.2 Streptococos	19
II.3 Leuconostocs	21
II.4 Lactobacilos	22
II.5 Micropacterium	25
II.6 Propionibacterium	26
III.- ACTIVIDAD MICROBIANA SOBRE LOS COMPONENTES DE LA LECHE	28
III.1 Carbohidratos	28

III.2 Acido cítrico - Producción de diacetilo y acetofna	33
III.3 Proteínas	36
III.4 Lípidos	38
IV.- PRODUCCION, CONSERVACION Y UTILIZACION	
DE INICIADORES	39
IV.1 Producción de iniciadores lácticos	39
IV.1.1 Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las bacterias	39
IV.1.2 Influencia del control de pH en el medio de cultivo	40
IV.1.3 Influencia de la temperatura en el medio de cultivo	41
IV.1.4 Influencia de la Actividad acuosa A_w	42
IV.1.5 Cultivos simples y cultivos mixtos	42
IV.2 Conservación de iniciadores	42
IV.3 Utilización de iniciadores	46
V.- ASPECTOS TECNICOS EN LA ELABORACION DE	
PRODUCTOS LACTEOS FERMENTADOS	50
V.1 Yoghurt	50
V.2 Queso Cheddar	51
MATERIALES Y METODOS	56
I.- AISLAMIENTO	57
II.- IDENTIFICACION	60
III.- DETERMINACION DE CONDICIONES OPTIMAS	62
IV.- ELABORACION DE PRODUCTOS LACTEOS FERMENTADOS	64
IV.1 Yoghurt	64
IV.2 Queso Cheddar	64

RESULTADOS	66
I.- AISLAMIENTO	66
II.- IDENTIFICACION	67
III.- ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES OPTIMAS DE CRECIMIENTO	71
III.1 Temperatura óptima	72
III.2 pH óptimo	77
IV.- ELABORACION DE PRODUCTOS LACTEOS FERMENTADOS	82
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	84
RESUMEN	87
SUMMARY	88
LISTA DE ABREVIATURAS	89
BIBLIOGRAFIA	90

INDICE DE TABLAS

TABLA		PAG.
1	Ventas de productos lácteos fermentados en EUA de 1960 a 1988	3
2	Consumo per cápita de productos lácteos fermentados en EUA	4
3	Principales propiedades físicas de la leche	6
4	Principales componentes de la leche	13
5	Nombres comunes de microorganismos en leches fermentadas	14
6	Características principales de las bacterias acidolácticas	18
7	Diferenciación de los estreptococos	21
8	Diferenciación del género <i>Leuconostoc</i>	22
9	Diferenciación de los lactobacilos	26
10	Esquemmatización de la Familia LACTOBACTERIACEA	27
11	Principales microorganismos de interés lactológico y su función más conocida dentro de la leche	48-49
12	Proceso general en la elaboración del queso	55

13	Selectividad de los medios de cultivo para bacterias acidolácticas	67
14	Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a los estreptococos lácticos	68
15	Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a los lactobacilos	69
16	Diferenciación morfológica y formas de agrupación de las bacterias acidolácticas	69
17	Producción de diacetilo por cepas de estreptococos lácticos	70
18	Cepas acidolácticas obtenidas en este trabajo	71
19	Condiciones óptimas de crecimiento de las bacterias aisladas	82

INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PAG.
1	Fórmula de la Lactosa	7
2	Mecanismo enzimático para la hidrólisis de la lactosa por medio de la enzima β -galactosidasa	28
3	Rura de asimilación de la lactosa cuando es hidrolizada por la β -galactosidasa en estreptococos	29
4	Oxidación de la lactosa y glucosa a través de las rutas de las Hexosas Monofosfato (HMP)	30
5	Diferentes rutas en el metabolismo de la galactosa en los estreptococos, así como los productos finales del metabolismo	32
6	Fórmula del ácido láctico	32
7	Fórmula del diacetilo	34
8	Fórmula de la acetofna	34
9	Ruta biosintética de los estreptococos lácticos para la producción de diacetilo a partir de citratos	34

10	Mecanismo de acción de la citrasa en la utilización de citratos por leuconostocs y estreptococos	35
11	Degradación proteolítica de proteínas por microorganismos iniciadores en queso	37
12	Curvas de crecimiento y acidificación de una bacteria acidoláctica	43
13	Preparación de fermentos lácticos	53
14	Curvas de crecimiento de <u>L. bulgaricus</u> en Caldo Láctico a pH 7 con diferentes temperaturas de incubación	73
15	Curvas de crecimiento de <u>L. acidophilus</u> en Caldo Láctico a pH 7 con diferentes temperaturas de incubación	74
16	Curvas de crecimiento de <u>S. Lactis</u> en Caldo Láctico a pH 7 con diferentes temperaturas de incubación	75
17	Curvas de crecimiento de <u>S. cremoris</u> en Caldo Láctico a pH 7 con diferentes temperaturas de incubación	76
18	Actividad de <u>L. bulgaricus</u> en Caldo Láctico con pH variable incubado a 45°C	78
19	Actividad de <u>L. acidophilus</u> en Caldo Láctico con pH variable incubado a 40°C	79

20	Actividad de <u>S. lactis</u> en Caldo Láctico con pH variable incubado a 35°C	80
21	Actividad de <u>S. cremoris</u> en Caldo Láctico con pH variable incubado a 35°C	81

INTRODUCCION

Desde que el hombre moderno domesticó el ganado caprino, ovino y vacuno, la leche de estos animales ha sido fermentada en un amplio número de productos. Los productos lácteos fermentados han sido preparados y disfrutados por siglos pero sólo recientemente se ha descubierto que ciertos micrororganismos específicos son responsables del sabor y textura únicos así como de atributos preservativos de estos alimentos. Muchos de estos microorganismos son habitantes normales del tracto intestinal del hombre, y la proliferación de éstos en la leche y su subsecuente consumo proporciona una mediada de protección extra contra las enfermedades.

Históricamente el éxito de las fermentaciones dependió de la facilidad de contaminación de la leche magra con bacterias acidolácticas. En 1890 el científico danés Storch descubrió que la leche agria y la maduración de la crema eran procesos dependientes de bacterias específicas. Posteriores investigadores lograron aislar bacterias de la leche agria y duplicaron la fermentación adicionando cepas selectas de regreso a la leche.

Las bacterias acidolácticas pueden dividirse básicamente en dos grupos: La tribu Lactobacillaceae, que comprende especies tan importantes como Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus acidophilus y Lactobacillus plantarum y la tribu Streptococcaceae en la que se incluyen Streptococcus lactis y Streptococcus cremoris.

Desde aquellos primitivos principios hasta hoy, la microbiología de los cultivos lácticos, es decir, la selección y preparación de bacterias acidolácticas para roles específicos en el procesamiento lechero, es hoy altamente sofisticada para producir

desde una bacteria en particular hasta mezclas de ellas para mejorar el proceso y la calidad del producto lácteo fermentado, cuyo consumo, al menos en los Estados Unidos, en los últimos 28 años ha aumentado considerablemente, como se puede observar en las tablas 1 y 2 citadas por Keneth Rash en 1990. (50)

Las cepas de bacterias lácteas se consiguen comercialmente en estado congelado y en estado liofilizado. Aquí las células bacterianas se mantienen en la fase logarítmica de crecimiento para asegurar la máxima actividad sobre la leche. El costo de estos iniciadores resulta un tanto caro por lo cual a través de este trabajo se propuso aislar cepas de interés lactológico a partir de productos fermentados comerciales y evaluar su actividad elaborando productos lácteos, pues debido al crecimiento de la industria lechera hacen falta cultivos capaces de producir fermentaciones eficientes y así, alentar el perfeccionamiento y expansión de nuevos procesos y productos.

Tabla1.- Venta de productos lácteos fermentados

1960-1988 EUA				
AÑO	YOGHURT	CREMA AGRIA	MANTEQUILLA	QUESO COTTAGE
—millones de libras—				
60	44	154	1140	858
65	61	179	1156	901
70	169	222	1130	1044
75	438	350	1011	991
80	581	410	928	1004
85	962	542	1052	960
86	1042	557	1022	970
87	1139	606	970	945
88	1255	615	910	938

De Milk Facts citado por Kenneth Rash en 1990. (50)

Tabla 2.- Consumo per cápita de productos lácteos fermentados en EUA

AÑO	YOGHURT	CREMA	MANTEQUILLA	QUESO
		AGRIA		COTTAGE
		—libras—		
60	0.3	-	-	4.8
65	0.3	-	-	4.7
70	0,8	1.1	5.5	5.1
75	2.0	1.6	4.7	4.6
80	2.6	1.8	4.1	4.4
85	4.0	2.3	4.4	4.0
86	4.3	2.3	4.2	4.0
87	4.7	2.5	3.7	3.8
88	5.1	2.5	3.7	3.8

Fuente: USDA citado por Kenneth Rash en 1990. (50)

REVISION DE LITERATURA

I.- ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LA LECHE

I.1 Introducción

La leche es un líquido segregado por las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos tras el nacimiento de la cría, el cual tiene una composición compleja, es blanco y opaco, de sabor dulce y pH cercano a la neutralidad (1, 12). Así mismo, es el alimento más importante para un mamífero y siempre se ha considerado como el primer alimento para el recién nacido. (31)

La leche es también una emulsión de materia grasa, en forma globular, así como una suspensión de materias protéicas en un suero constituido por una solución verdadera que contiene, principalmente lactosa y sales minerales. Aunque la más común es la proveniente del ganado vacuno, a través de la evolución humana se ha reconocido que la leche de otros mamíferos es de igual manera satisfactora de las demandas fisiológicas de humedad, energía y nutrientes. La composición de la leche varía de una especie a otra y durante el ciclo de la lactación. (1, 12, 31 y 45).

En la tabla 3 se pueden observar en forma resumida, las principales características físicas de la leche según Alais en 1981. (1)

Tabla 3.- Principales Propiedades Físicas de la Leche. (1)

ASPECTO	Coloración blanca; cuando es rica en grasas: ligeramente crema.
OLOR	No hay olor característico. Facilidad para retener olores del medio ambiente y recipientes.
SABOR	Medio dulce y neutro.
GRAVEDAD ESPECIFICA	Igual al peso en kilogramos de un litro de leche a 15°C.
pH	Varía con el aspecto sanitario de la mama, de la cantidad de CO ₂ disuelto, presencia de microorganismos.
ACIDEZ	0.15 - 0.16%
POTENCIAL DE OXIDOREDUCCION	En contacto con el aire = 0.130 voltios
VISCOSIDAD	Más viscoso que el agua
PUNTO DE CONGELACION	-0.539°C
PUNTO DE EBULLICION	100.17°C al nivel del mar.
INDICE DE REFRACCION	1.3440 - 1.3485.

Los principales componentes químicos de la leche son el agua, lípidos, proteínas, lactosa y sales minerales, los cuales varían dependiendo de factores tales como la raza de la vaca, la alimentación, la época del año e incluso la hora en que se ordeña. A continuación se examinará con más detenimiento cada uno de los anteriores componentes.

I.2 Composición química de la Leche

I.2.1 CARBOHIDRATOS

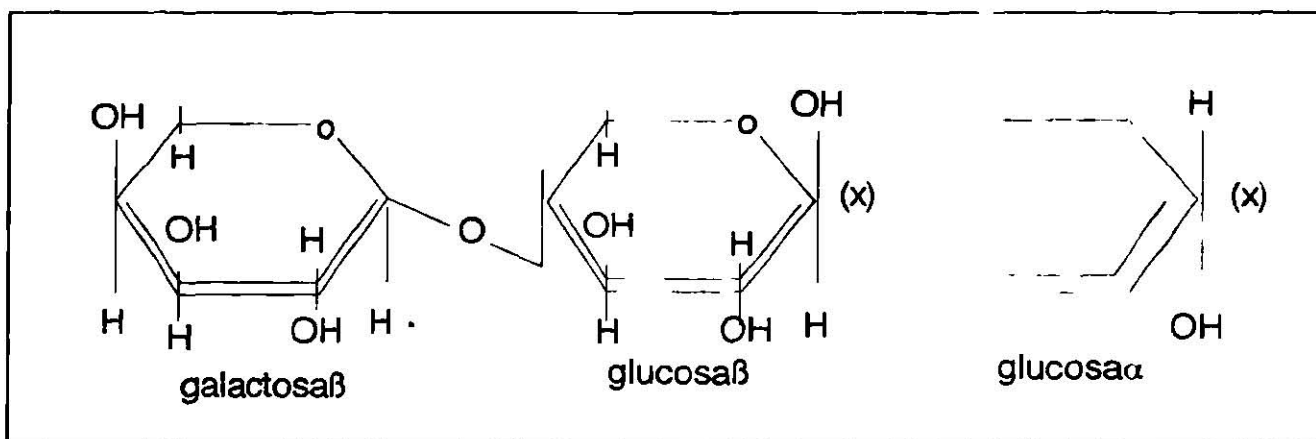
La lactosa es el principal carbohidrato de la leche, ya que es el único azúcar libre

que existe en cantidad importante; sin embargo también se encuentran pequeñas cantidades de glucosa, galactosa, sacarosa, cerebrósidos y algunos aminoazúcares derivados de la hexosamina. A pesar de que estos últimos azúcares están en concentraciones muy bajas, pueden ejercer una influencia muy importante en la estabilidad de la leche, sobre todo en aquella que ha sido sujeta a tratamientos térmicos. La lactosa tiene aproximadamente el 15% de la dulzura de la sacarosa, y contribuye, junto con las sales, al sabor global de la leche. (2)

La leche de vaca contiene cerca de 4.8% de lactosa. En la naturaleza, la lactosa solo se encuentra en la leche y se distingue de los azúcares comunes por su estabilidad en el tracto digestivo aparte de que no es sólo un azúcar energético. Para los seres humanos y para numerosos animales la lactosa es, en la práctica la única fuente de galactosa. (20)

La lactosa es un disacárido formado por la condensación de una molécula de galactosa y otra de glucosa a través de un enlace glucosídico β (1-4); existen dos formas isoméricas, α y β que se diferencian por sus propiedades físicas y por la posición de un -OH en el carbono (x) de la glucosa. (Figura 1). (1, 2)

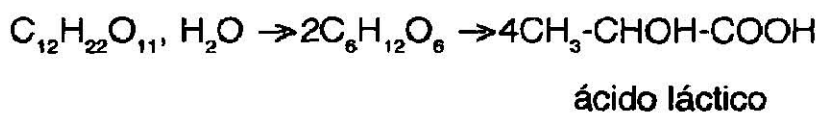
Figura 1 Fórmula de la Lactosa



Por otro lado, la lactosa es el componente más lábil frente a la acción microbiana; en efecto la leche es fácilmente presa de bacterias de diversos tipos, que transforman la lactosa en ácido láctico y en otros ácidos alifáticos. Las distintas transformaciones realizadas por microorganismos sobre la leche se ven a continuación:

a) Transformación en ácido láctico:

Es por mucho la más importante. Numerosas bacterias realizan esta transformación, cuyo esquema teórico es:



El ácido formado puede ser levógiro (L), dextrógiro (D) o racémico, por existir un carbón asimétrico. La acidificación espontánea es el hecho más comunmente observado en la leche conservada a temperatura ambiente. La acidez se eleva muy lentamente al principio, luego, tras algunas horas (según la temperatura), muy rápidamente.; en general, se frena un poco cuando el contenido de ácido láctico llega al 1%. En este momento solamente 1/4 de la lactosa ha sido degradada, esta detención se debe al efecto inhibitor del ácido sobre las bacterias. Si se neutraliza el medio, se puede conseguir la transformación de toda la lactosa. (1)

Antes de llegar a la proporción del 1% del ácido, aproximadamente hacia el 0.6%, se cuagula la leche. El ácido ha roto el equilibrio entre el estado coloidal y la solución, teniendo como consecuencia primera la insolubilización de la caseína. (1)

Como en todas las reacciones bioquímicas, se forman pequeñas cantidades de subproductos junto al producto principal de la fermentación. En general por cada 100 partes de lactosa transformada se obtiene 96 de ácido láctico y 5 de subproductos

diversos (CO_2 , ácido butírico, acetoféna, etc.). (1)

b) Transformación en alcohol

En la práctica, ésta transformación es menos frecuente que la anterior. Se produce en las industrias lácteas, y constituye un peligro, sobre todo por la formación de gas durante el desuerado de los quesos, en las cremas mal cuidadas procedentes de las granjas, etc. (1)

c) Transformación en ácido butírico

Se produce a partir de lactosa o ácido láctico, con formación abundante de gas, en medio neutro o poco ácido.

Aparece en la leche o en el suero fuertemente alterados. Al olor desagradable del ácido butírico se añade el producido por fermentaciones pútridas concomitantes. (1)

1.2.2 LIPIDOS

Los triglicéridos son los componentes más importantes de los lípidos de la leche ya que constituyen aproximadamente el 98% del material extraíble con disolventes no polares. Dentro de la categoría de lípidos también están incluidos los fosfolípidos, los esteroides, los pigmentos, las vitaminas liposolubles A, D, E, y K y otras sustancias en concentraciones muy bajas.

El aspecto más interesante de los triglicéridos de la leche es su composición de

ácidos grasos de estos lípidos depende directamente de los mismos factores que influyen en la composición global de la leche. (2, 25)

I.2.3 PROTEINAS

Las caseínas y las proteínas del suero son los dos grandes grupos de proteínas de la leche, se encuentran en forma de suspensión coloidal y existen grandes diferencias entre sus estructuras y sus propiedades químicas.

a) Caseínas

Son un conjunto de polipéptidos sintetizados en la glándula mamaria de la vaca, que forman la fracción protéica más importante de la leche, ya que suman hasta el 85% de las proteínas totales. Las caseínas pertenecen al grupo de las fosfoproteínas y por definición son las proteínas de la leche que precipitan a un pH de 4.6 a 20 °C. La estabilidad de las caseínas se altera fácilmente a valores de pH bajos, y por la presencia de cationes divalentes, pero son estables a la mayoría de los tratamientos térmicos empleados. Existen principalmente en la leche como micelas, que son complejos proteicos solubles con un alto grado de organización estructural y estabilizadas por una fuerte interacción a través de puentes hidrófobos, de hidrogeno iónicos y de calcio. (1, 2)

Las micelas están constituidas por cuatro fracciones de caseínas. alfa, beta, kappa y delta (clasificadas de acuerdo a su movilidad electroforética) y se encuentran en una proporción de 55, 25, 15 y 5% respectivamente. (2, 25)

b) Proteínas del Suero

Son compactas, globulares, con un peso molecular que varía entre 14 000 y 1000 000 daltons; son solubles en un intervalo de pH muy amplio y en estado nativo no se asocian con la caseína. Las proteínas del suero constan de por lo menos 8 diferentes fracciones, entre las cuales las principales son la beta-lactoglobulina, la alfa-lactalbúmina, las inmonoglobulinas, la albúmina bovina y las proteasas peptonas. En general, son muy sensibles al calor y menos al ácido, al contrario de lo que sucede con las caseínas, lo que se debe a que su mecanismo de estabilidad opera por hidratación y no por carga eléctrica. Estas proteínas contienen aminoácidos azufrados muy lábiles al calor y las temperaturas de pasteurización desnaturalizan una fracción de ellas con la consecuente formación de grupos sulfhidrilo muy reactivos; éstos actúan como antioxidantes y por lo tanto los productos lácteos que hayan recibido un tratamiento térmico son menos susceptibles a las reacciones de oxidación. (1, 2)

I.2.4 ENZIMAS

Las enzimas se encuentran distribuídas en la leche, ya sean unidas a las micelas de caseína, a la membrana del glóbulo de grasa o en forma libre en el suero. Las más importantes son las lipasas, proteasas, fosfatasas, catalasas, lactoperoxidasas y xantina oxidadas. (2, 25)

I.2.5 VITAMINAS

La leche contiene la mayoría de las vitaminas; las liposolubles se encuentran

interaccionando con la fase lípida, mientras que las hidrosolubles se localizan en el suero. (2)

I.2.6 SALES MINERALES

Las principales sales y minerales de la leche suelen estar presentes como cloruros, fosfatos y citratos de calcio, magnesio, sodio, potasio y se encuentran tanto en estado coloidal como en solución. (1, 2)

Todo lo anterior lo podemos resumir en la siguiente tabla 4 que muestra en forma breve los principales componentes de la leche;

Tabla 4: Principales componentes de la Leche (1, 1 y 25)

1.- CARBOHIDRATOS	a) Azúcares neutros: Lactosa b) Azúcares nitrogenados: Glucosamina N-acetilada Galactosamina N-acetilada c) Azúcares ácidos Acidos siálicos
2.- LIPIDOS	Triglicéridos Fosfolípidos Esteroles Pigmentos Vitaminas liposolubles A, D, E, K.
3.- PROTEINAS	a) Caseínas alfa beta kappa delta b) Proteínas del suero beta-lactoglobulina alfa-lactalbúmina inmunoglobulinas albúmina bovina proteosas peptonas
4.- ENZIMAS	Lipasas Proteasas Fosfatasas Catalasas Lactoperoxidasas Xantina oxidasas
5.- VITAMINAS	Vit. A Ac. Pantoténico Vit. D Ac. Nicotínico Vit. E Biotina Tiamina Vit. B ₆ Riboflavina Vit. B ₁₂ Vit. C
6.- SALES MINERALES	Calcio Magnesio Ac. cítrico Fósforo Sodio Potasio Cloruro

II.- PRINCIPALES ESPECIES BACTERIANAS DE INTERES LACTOLOGICO

II.1 Introducción

En los productos lácteos fermentados realizados en forma casera se lleva a cabo una fermentación espontánea, es decir que el inóculo se obtiene de una producción previa y su identidad microbiana es desconocida; pero a una escala industrial el conocimiento de las especies bacterianas juega un papel muy importante ya que las propiedades sensoriales de sabor, olor y viscosidad son resultado directo de acciones bacterianas específicas. (1)

Las bacterias utilizadas son mesófilos o termófilos, términos que indica sus temperaturas óptimas de crecimiento, las cuales oscilan entre los 22°C y los 40°C, respectivamente. Los nombres comunes de los microorganismos reconocidos en las fermentaciones lácteas se citan en la tabla 5.

Tabla 5: Nombres comunes de microorganismos en leches fermentadas

<p>Género Lactobacillus</p> <p><u>L. delbruekii</u></p> <p><u>L. delbruekii</u> subsp. lactis</p> <p><u>L. delbruekii</u> subsp. bulgaricus</p> <p><u>L. acidophilus</u></p> <p><u>L. helveticus</u></p> <p><u>L. casei</u></p> <p><u>L. brevis</u></p> <p><u>L. fermentum</u></p> <p><u>L. kefir</u></p>	<p>Género Leuconostoc</p> <p><u>L. mesenteroides</u></p> <p><u>L. mesenteroides</u> subsp. dextranicum</p> <p><u>L. mesenteroides</u> subsp. cremoris</p> <p><u>L. lactis</u></p>
<p>Género Pediococcus</p> <p><u>P. pentosaceus</u></p> <p><u>P. acidilactici</u></p>	<p>Género Propionibacterium</p> <p><u>P. freudenreichii</u> subsp. shermanii</p> <p><u>P. freudenreichii</u> subsp. freudenreichii</p>

Género Streptococcus

S. lactis
S. lactis subsp. diacetylactis
S. lactis subsp. cremoris
S. thermophilus

Género Bifidobacterium

B. bifidum
B. longum
B. infantis
B. breve

Levaduras

Torulasporea delbruekii
Kluyveromyces marxianus subsp. marxianus
Kluyveromyces marxianus subsp. bulgaricus
Candida kefir
Saccharomyces cerevisiae

Género Acetobacter

A. aceti

(31)

Los microorganismos que se encuentran en la leche y sus productos pueden estudiarse por las características que poseen en común, y así se les pueden clasificar desde varios puntos de vista ya sea por su acción sobre los componentes de la leche, de acuerdo a su fuente de origen o la más común que es tomar a los microorganismos desde el punto de vista taxonómico, como integrantes de grupos morfológicos, por ejemplo: micrococcos, estreptococos o bacilos. (16)

Las bacterias de interés lactológico más importantes se agrupan en la familia LACTOBACTERIACEAE. La importancia práctica de las bacterias pertenecientes a esta familia es considerable por varias razones: La producción de ácido y el descenso del pH; lo que da como resultado una protección de las sustancias alimentarias debido a la inhibición de las bacterias de la putrefacción en medio ácido, un establecimiento de las condiciones físico-químicas favorables a diversas transformaciones en la industria láctea, una fermentación láctica "aromatizante", que permite la obtención de productos ácidos con un sabor deseado: crema, mantequilla, yoghurt, etc., propiedades higiénicas resultantes de la acción antiséptica del ácido láctico en el intestino, así como su

importancia en la producción industrial de ácido láctico. (1, 15)

Además dichas bacterias pueden presentar otros efectos útiles o perjudiciales, como son: la producción de enzimas que intervienen en la degradación de las proteínas, en especial de la caseína en el curso de la maduración de los quesos, la producción de sustancias inhibidoras responsables de la selección de las especies, así como una valoración microbiológica de las vitaminas y aminoácidos aprovechando las exigencias nutritivas de las bacterias lácticas. (1, 15)

Los miembros de la familia LACTOBACTERIACEAE son comunmente bacilos o cocos grandes o pequeños, inmóviles, no esporulados, gram positivos, catalasa negativos. Son anaerobios facultativos o microaerófilicos, dan poco crecimiento en la superficie de los medios. Las necesidades de nutrición de este grupo son complejas: el medio debe aportar una mezcla compleja de aminoácidos y factores de crecimiento, especialmente de vitamina B. Los disacáridos (lactosa, sacarosa, maltosa) son corrientemente mejores alimentos que las hexosas de las que están formados (glucosa, fructuosa, galactosa). Los azúcares se transforman en ácido láctico, en una proporción igual o superior al 90%, por la acción de las bacterias lácticas "homofermentativas" (sólo producen ácido láctico) y al 50 % para las denominadas "heterofermentativas", éstas últimas forman, además CO₂, ácido acético, etanol, glicerol y otras sustancias. El comportamiento óptico del ácido láctico (D o L) producido es característico del tipo de organismo y del medio. (15)

Las bacterias lácticas son de gran importancia para la fabricación de sauerkraut o col agria, encurtidos y en la industria láctea son indispensables en la fabricación de leches fermentadas, quesos y mantequillas. (15)

Estas bacterias están ampliamente distribuídas. Se han encontrado que las albergan ciertas plantas, algunos alimentos, los utensilios lecheros, el estiércol y la saliva,. La acidificación natural de la leche es debida a estas bacterias, cuyo ácido láctico produce la coagulación de la caseína. (15)

La familia Lactobacteriaceae está formada por 5 géneros: las bacterias esféricas incluídas en los géneros Streptococcus, y Leuconostoc y las bacilares incluídas en Lactobacillus, Microbacterium y Propionibacterium. (1, 15, 16)

Todas las anteriores características las podemos resumir en la siguiente tabla 6 con datos mencionados por Foster y Alais: (1, 14)

Tabla 6: Características principales de las Bacterias Acidolácticas. (1, 15)

FAMILIA	Lactobacteriaceae
MORFOLOGIA	Bacilos Cocos grandes o pequeños
MOVILIDAD	Inmóviles
CRECIMIENTO EN PRECENCIA DE O ₂ LIBRE	Microaerófilicos
REACCION DE GRAM	Gram +
PRUEBA DE LA CATALASA	Negativa
NECESIDADES NUTRICIONALES	Vitaminas Aminoácidos o péptidos Carbohidratos fermentables
TIPOS DE FERMENTACIONES	Homofermentativas: ácido láctico Heterofermentativas. ácido láctico + otros productos
UTILIDAD INDUSTRIAL	Producción de col agria, encurtidos, leches fermentadas, quesos, mantequillas, etc.
MEDIO NATURAL	Plantas, utensilios lecheros, alimentos, estiércol, saliva.
GRUPOS DE ESPECIES INVOLUCRADOS	Streptococcus Leuconostoc Lactobacillus Microbacterium Propionibacterium

II.2 Estreptococos

Estas especies constituyen habitualmente la flora dominante de la leche, crema y quesos frescos. A pesar de su nombre, los estreptococos adoptan frecuentemente la forma diplococos. Todos son homofermentativos y se dividen en cuatro grupos:

A) Piogénicos

Comprenden numerosas especies de estreptococos patógenos para el hombre y los animales; los microorganismos representativos son: S. pyogenes y S. agalactiae, no proliferan a 10°C o a 45°C. Por lo general no cuagula la leche. S. pyogenes origina faringitis séptica, escarlatina y otras enfermedades y S. agalactiae ocasiona mastitis en las vacas. (1, 11, 15)

B) Viridans o termófilo

Las bacterias de este grupo no se desarrollan a temperaturas inferiores a 18°C; por el contrario pueden cultivarse a 45°C. La especie más característica es S. thermophilus; este estereptococo se desarrolla todavía a 50°C; es muy sensible a la sal, y es importante en la fabricación de quesos, tales como el Suizo, así como en unión con Lactobacillus bulgaricus forma el cultivo del yoghurt.

Se encuentran otros estreptococos termófilos en los ecrementos. El hallado con más frecuencia en el estiércol de vaca y el más abundante en el tubo digestivo del cerdo adulto es el S. bovis. (1, 15, 16)

C) Lactis

Son bacterias homofermentativas, agentes habituales de la coagulación de la leche a temperatura ambiente. Se desarrollan aún a 10°C pero no a 45°C y no poseen

caracter patógeno. S. lactis fue descrito por primera vez por Lister. Se encuentra en la leche en forma de pares de cocos formando cadenas cortas. Cada célula mide 0.5 a 1.0 μ de diámetro. No forman esporas. Originalmente existe en los utensilios lecheros, el ensilaje, piel de las vacas y algunas plantas, pero ha llegado a ser el más típico habitante de la leche. Las cepas de S. lactis exigen un cierto número de vitaminas para su óptima proliferación: biotina, niacina, tiamina, ácido pantoténico, piridoxina y ácido fólico, tiene una temperatura óptima en 30°C y una escala de temperatura de 10 a 40°C S. cremoris tiene muchas propiedades en común con S. lactis, así como aproximadamente los mismos requerimientos de vitaminas y aminoácidos. Se utilizan para los mismos fines que S. lactis y junto a éste en cultivos mixtos. S. diacetylactis se considera como cepas de S. lactis, las cuales se hallan en condiciones de producir aparte de la fermentación láctica, la fermentación de sales cítricas o citratos, formando ácidos volátiles, alcoholes y aldehídos, pero principalmente acetoina (acetil metil carbinol) y diacetilo -las dos sustancias aromáticas más importantes- en el área de productos lácteos. (1, 11, 15)

D) Enterococos

Están constituidos por S. faecalis, S. liquefaciens, S. zymogenes y S. durans. Estas bacterias proliferan tanto a 10 como a 40 °C. Existen como habitantes naturales del tracto intestinal del hombre y de los animales. Son relativamente termoestables por lo que pueden permanecer tanto en la leche cruda como en la leche pasteurizada. Hidrolizan las proteínas con relativa intensidad, formando frecuentemente sustancias de sabor amargo. (11, 15)

La tabla 7 nos muestra la diferenciación de los estreptococos según Demeter. (11)

Tabla 7: Diferenciación de las especies de estreptococos segun Demeter (11)
(extracto)

Especie	Crecimiento con:						Fermentación o desdoblamiento de:		
	Celsius		pH		Cloruro Na		Maltosa	Sacarosa	Lactosa
	10°	45°	9'6	2%	4%	6'5%			
<i>Pyogenes</i>	-	-	-	+	(-)s	-	+s	+	+s
<i>Agalactiae</i>	-	-	-	+	(+)	(-)s	+	+	(+)
<i>Liquefaciens</i>	+	+	+	+	+	+s	+	(+)	(+)
<i>Zymogenes</i>	+	+	+	+	+	+s	+	(+)	(+)
<i>Durans</i>	+	+	+	+	+	+s	+	(-)	+
<i>Bovis</i> ⁴	-	+	-	+	w	-	+	(+)	+
<i>Lactis</i>	+	-7	-8	+	+	-	w	-	+
<i>Cremoris</i>	+	-	-	+	-	-	ws	(-)	+
<i>Thermophilus</i>	-	+	-	-	-	-	(-)	+	+

7 = Crecimiento a 43°C. 8 = Crecimiento a pH 9'2

w = variable. s = raro.

II.3 LEUCONOSTOC

Son células esféricas que se encuentran por pares y cadenas; se les pueden considerar como estreptococos heterofermentativos. Producen ácido acético, etanol, bióxido de carbono y ácido láctico DL, L(+) y D(-), partiendo de carbohidratos fermentables. No son particularmente activos en la leche y rara vez la coagulan.

Por la capacidad que tienen las especies *Leuconostoc dextranicum* y *Leuconostoc citrovorum* de fermentar el ácido cítrico, produciendo diacetilo y acetofina se consideran las dos especies más importantes generadoras de aroma. Ambos son

gram +, de 0.6 a 1.0 de diámetro. Proliferan mejor entre 25 y 30°C por lo general no sobreviven a la pasteurización. Son muy susceptibles a los antibióticos. La Tabla 8 muestra la diferenciación de las tres especies del género *Leuconostoc*: (10, 11, 15, 5)

Tabla 8: Diferenciación del género *Leuconostoc*

	Fermentación		
	ácido cítrico	sacarosa	pentosa
<u><i>L. mesenteroides</i></u>	-	+	+
<u><i>L. dextranicum</i></u>	+	+	-
<u><i>L. citrovorum</i></u>	+	-	-

(10)

II.4 LACTOBACILOS

Las diferencias más importantes para la tecnología lactológica entre este género y los estreptococos están en su mayor poder acidificante y en su capacidad proteolítica más intensa. La acidez alcanzada por los estreptococos es menos de 1% y un pH máximo de 4.3 a 4.5 mientras que los lactobacilos alcanzan una acidez del 1 al 3% y un pH de hasta 3.2 a 3.5. Son bacilos largos y delgados, formando la mayoría de las especies cadenas. Son microaerofílicos, catalasa negativos, gram +, fermentan los azúcares dando como producto final ácido láctico. Comprende tres grupos:

A) *Thermobacterium*

Son bacillos largos, aislados, raramente formando cadenas con temperaturas óptimas de crecimiento alrededor de los 40°C, son homofermentativos. Aquí se encuentran:

a) L. bulgaricus

Existen en la leche bronca, también en algunos quesos duros; junto con Streptococcus thermophilus se usa para la fabricación del yoghurt, así como de otras formas de leches fermentadas.

b) L. jughurti

Como L. bulgaricus, sin embargo acidifica más intensamente.

c) L. helveticus

En la leche cruda, en el cuajar de los terneros, en quesos duros; junto con S. thermophilus sirve, especialmente para la fabricación de queso Emmental y Gruyere.

d) L. lactis

Existe en las máquinas de ordeñar y en los utensilios en contacto con la leche y por ello también es la especie del género Lactobacillus que existe con mayor frecuencia en la leche cruda. Participa en la maduración de quesos duros.

e) L. acidophilus

Existe con relativa frecuencia en el intestino de niños y adultos, sobre todo con una alimentación en la que predomina la leche, lactosa y dextrina. Por eso, L. acidophilus usado como complemento dietético puede tener diversos beneficios nutricionales.

f) L. delbruekii

Existe en materias vegetales en fermentación. Se utiliza en grandes cantidades para la fabricación de ácido láctico de uso industrial, también para hacer fermentar las maltas. (15, 28, 53)

B) Streptobacterium

Son bacilos cortos que se encuentran formando cadenas un poco largas; sus temperaturas óptimas de crecimiento oscilan alrededor de 30°C y son homofermentativos.

a) L. casei

Existe como L. lactis en las máquinas de ordeñar y en los utensilios en contacto con la leche, por eso, es junto a éste, el Lactobacilo de más frecuente aparición en la leche cruda. Muchas cepas sobreviven a la pausterización corta.

b) L. plantarum

Existe en la leche y queso, así como en materiales vegetales en fermentación. Juega un importante papel en la fabricación de levadura, col agria, encurtidos y ensilaje. (11, 15, 53)

C) Betabacterium

Los que se encuentran en la leche, se desarrollan muy lentamente y producen poco ácido, en forma de una mezcla de ácidos láctico, acético, succínico, etc.; producen también un poco de alcohol. Su característica dominante es la producción de gas en cantidad importante durante la fermentación de los azúcares. Su intervención en la leche es nefasta, puesto que pueden provocar el hinchamiento precoz de la cuajada o del queso recientemente fabricado.

a) L. fermentii

Es termófilo; forma parte de la microflora de los cuajos naturales, y como se encuentra en abundancia, es responsable de la "apertura de los quesos de pasta cocida."

b) L. brevis

Es mesófilo y no se desarrolla por encima de los 38°C, puede provocar el hinchamiento de los quesos de tipo Holanda.

D) Bifidobacterium

Son bacillos heterofermentativos, sin producción de bióxido de carbono.

a) L. bifidus

Se diferencia de todos los otros lactobacilos, por crecer en condiciones estrictas de anaerobiosis y por su marcada tendencia a formar células ramificadas. Se encuentran como diversas cepas en el intestino del hombre. Se sabe que en el intestino de los adultos, la flora bacteriana intestinal gram positiva puede estar constituida hasta más del 95% de cepas de L. bifidus. (11, 15)

Demeter (10) en la tabla 9 nos da la diferenciación del género Lactobacillus.

II.5 MICROBACTERIUM

Las bacterias de este género son pequeñas, bacilares, inmóviles, gram +, no esporuladas, catalasa +, aeróbicas, homofermentativas, producen ácido láctico y, a veces adoptan forma de empalizada. Microbacterium lacticum es una especie muy abundante. Las microbacterium son muy resistentes al calor, aún no produciendo esporas. Crecen entre los 15 y los 35°C, siendo la temperatura óptima de crecimiento de unos 30°C. (15, 16)

Tabla 9 Diferenciación del género *Lactobacillus*. (11)

	Fermentación o desdoblamiento de			Crecimiento A(°C):		
	Lactosa	Sacarosa	Maltosa	15	45	48
<i>Thermobact. lactis</i>	+	+	+	-	+	+
<i>Thermobact. bulgaricus</i>	+	-	-	-	+	+
<i>Thermobact. jughurti</i>	+	-	-	-	+	+
<i>Thermobact. helveticus</i>	+	-	+	-	+	+
<i>Thermobact. acidophilus</i>	+	+	+	-	V	-
<i>Streptobac. casei</i>	+	V	V	+	-	-
<i>Streptobac. plantarum</i>	+	+	+	+	V	-
<i>Betabact. brevis</i>	-	-	+	+	-	-
<i>Betabact. fermentii</i>	V	V	+	-	+	-

Interpretación de los signos:

+ = Fermentan o positivos.

- = No fermentan o negativos.

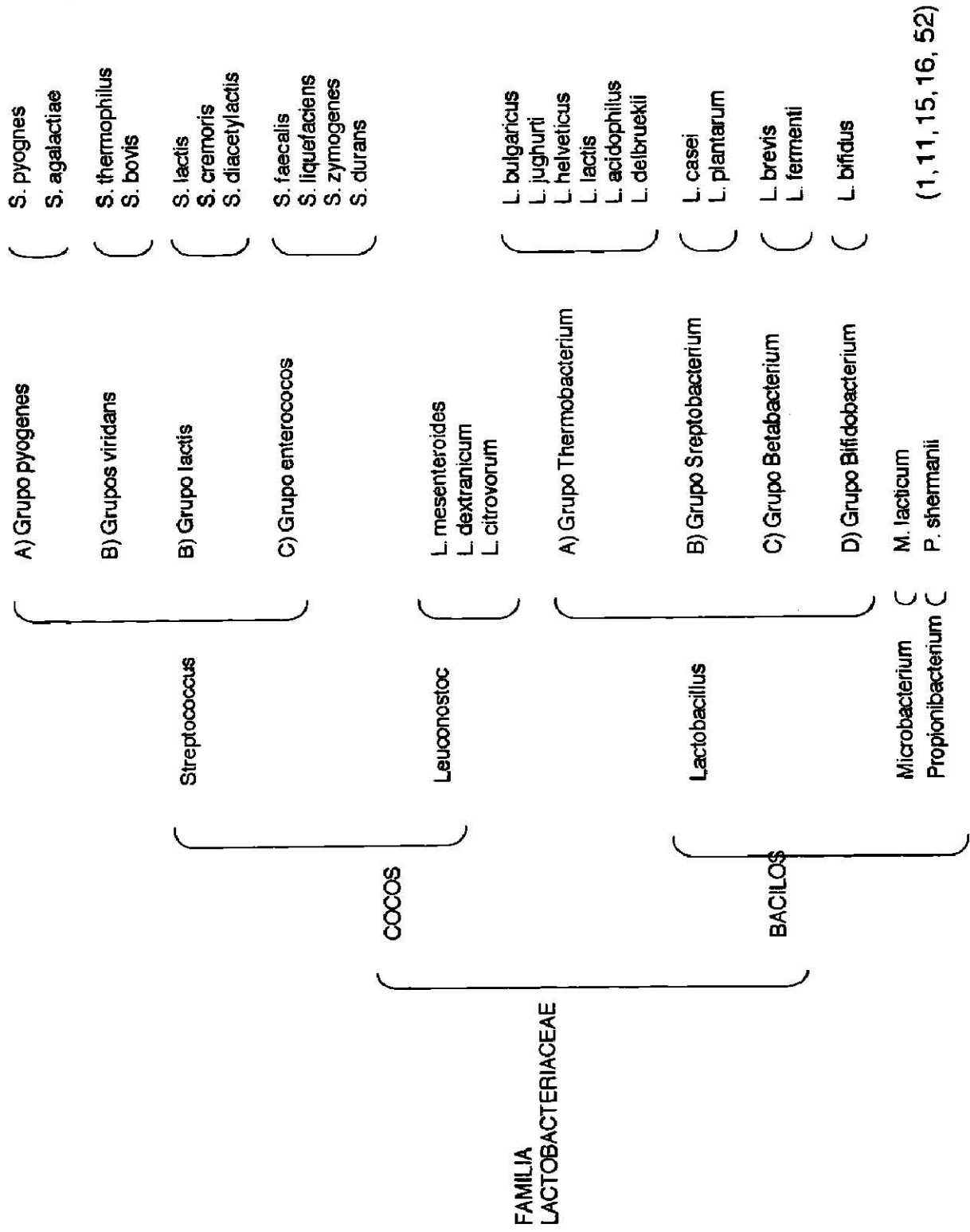
V = Resultados variables.

II.6 .- PROPIONIBACTERIUM

Son bacterias pequeñas, inmóviles, gram +, no esporuladas, catalasa positiva, anaeróbicas o aeróbicas, generalmente bacilares, a menudo en forma de cocos y, a veces en cadenas. Fermentan el ácido láctico, los carbohidratos y los polialcoholes a ácido propiónico, ácido láctico y bióxido de carbono. En el queso Gruyere ciertas especies (*Propionibacterium shermanii*) fermentan los lactatos produciendo gas que ayuda a la formación de hoyos, contribuyendo también al sabor. (11, 15, 16)

La familia LACTOBACTERIACEA y sus divisiones se muestran en la siguiente tabla 10.

Tabla 10: Esquematización de la Familia LACTOBACTERIACEAE (Frazier, Foster, Demeter)



III.- ACTIVIDAD MICROBIANA SOBRE LOS COMPONENTES DE LA LECHE

La forma en que se lleva a cabo la acción microbiana sobre los principales componentes de la leche, es decir, la ruta que sigue el microorganismo para producir los metabolitos de interés en la industria láctea se analizará con respecto a carbohidratos, citratos, proteínas y lípidos.

II.1 Carbohidratos

S. lactis y S. cremoris tienen dos modos de acción sobre la lactosa antes de ser finalmente asimilados; uno es el hidrólisis de la lactosa por la acción de la enzima β -galactosidasa, que rompe la lactosa en glucosa y galactosa, como se muestra en las figuras 2 y 3. (43)

Figura 2: Mecanismo enzimático para la hidrólisis de la lactosa por medio de la enzima β -galactosidasa. (51)

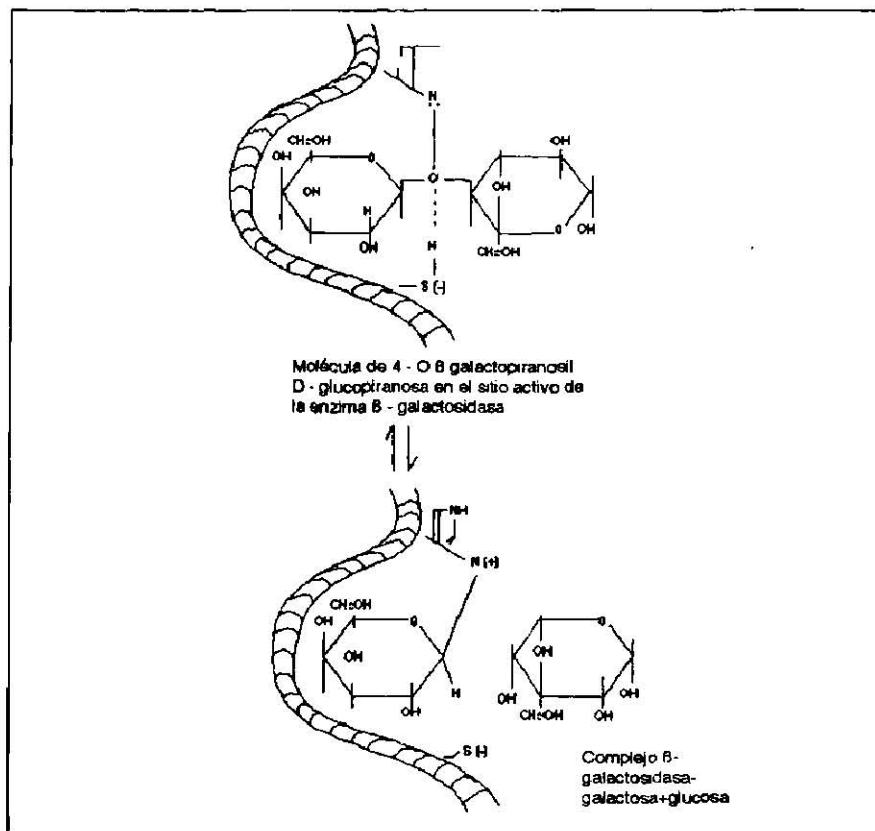
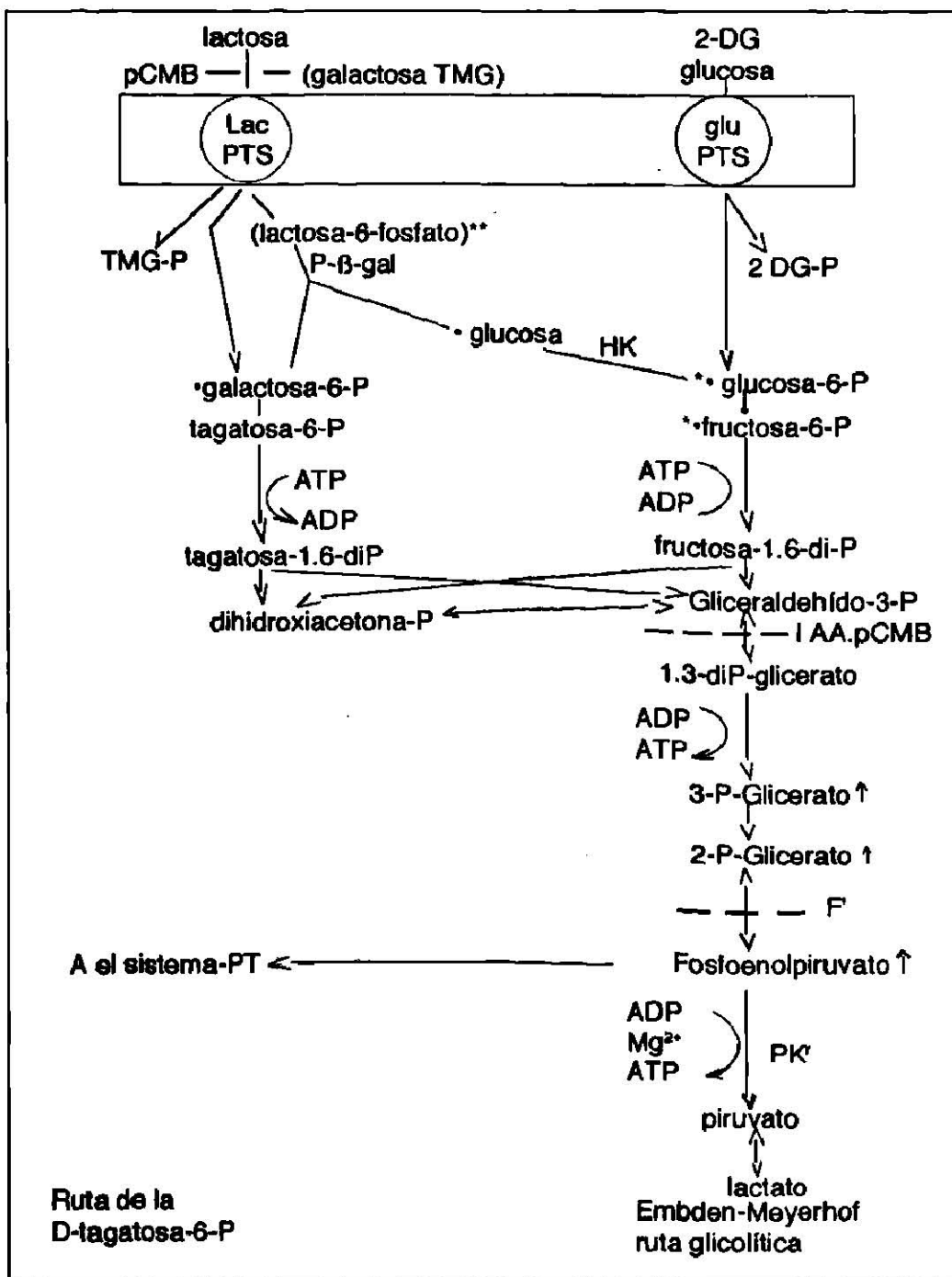


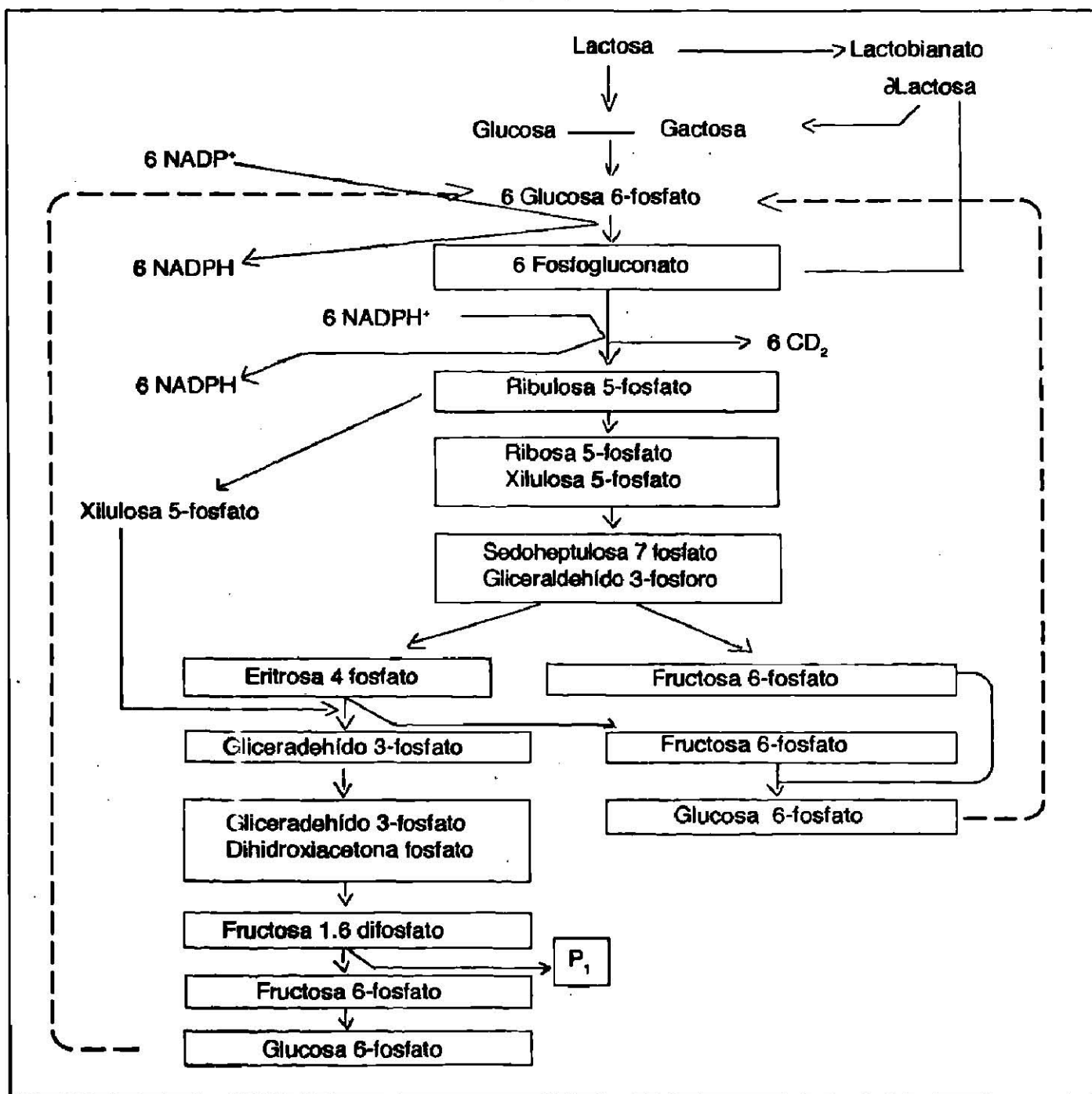
Figura 3: Ruta de asimilación de la lactosa cuando es hidrolizada por la

β -galactosidasa en estreptococos; (p-CMB) p-cloromercuribenzoato; (IIA) idoacetato; (F-) fluoruros; (PTS) sistema fosfotransferasa; β -D-fosfogalactosidasa galactohidrolasa (P- β -gal); (HK) hexocinasa; (PK) piruvatocinasa; (TMG) metil-B-D-tiogalactopiranósido; (2-DG) 2-deoxi-D-glucosa. (44)



El otro modo de acción es por medio de la enzima lactosa deshidrogenasa que oxida la lactosa en lactobionato β -lactona antes de su rompimiento en gluconato y galactosa como se muestra en la figura 4.

Figura 4: Oxidación de la lactosa y glucosa a través de las rutas de las Hexosas Monofosfato (HMP). (44)



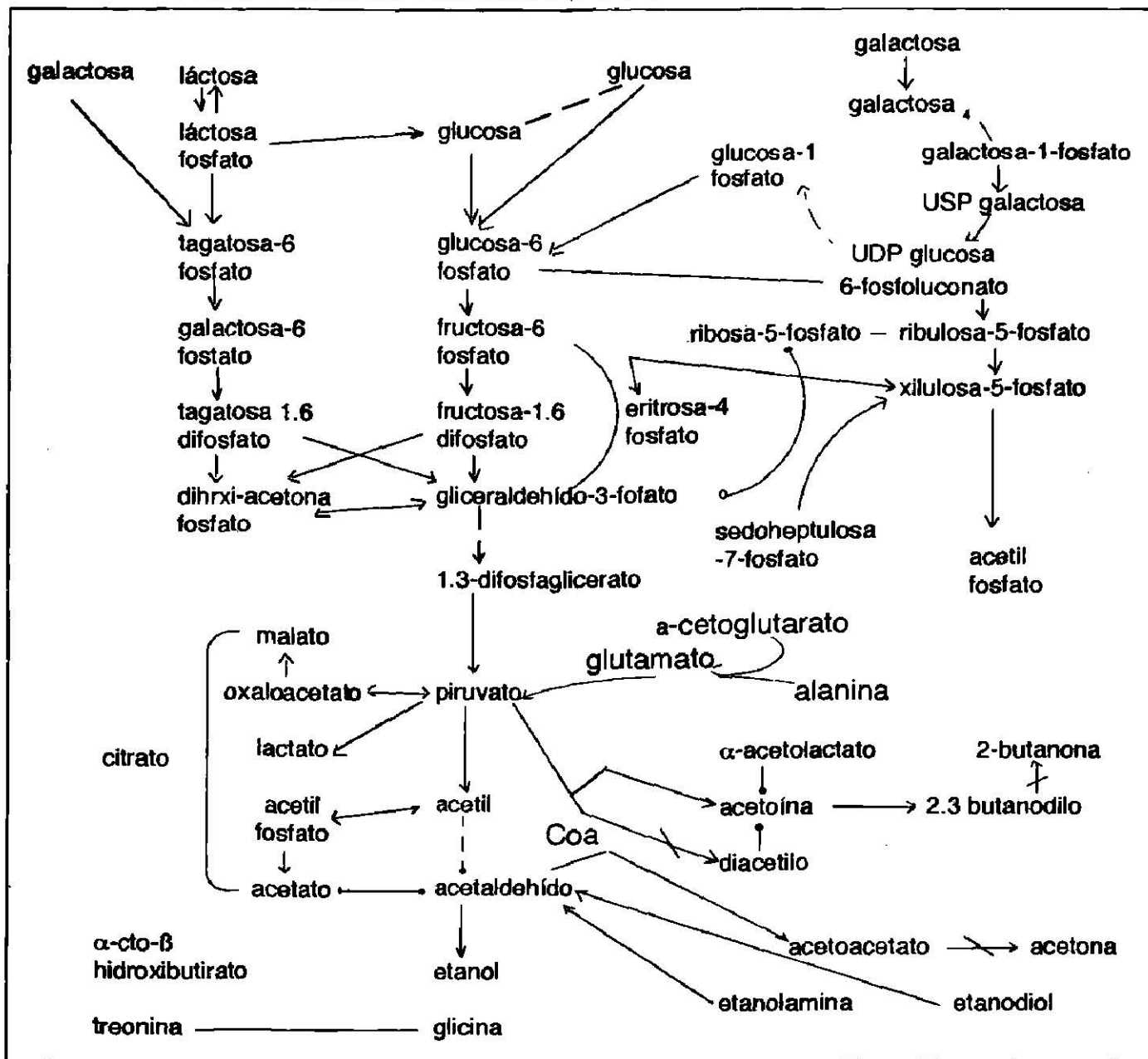
A pesar de que los estreptococos mesófilos en general presentan poca o nula actividad de β -galactosidasa, esta enzima se ha encontrado en S. lactis y S. cremoris (23, 44). En el caso de S. thermophilus, un estudio demostró que cuando se agregaba galactosa extracelular al medio de cultivo dicho azúcar inhibía la actividad de β -galactosidasa debido a que interferían en el transporte dentro de la célula de la lactosa. (21)

En los lactobacilos la actividad de β -galactosidasa parece ser más común como lo demuestran los estudios realizados por Toba (60) en 1981 donde encontró actividad en todas las especies de lactobacilos, excepto en L. casei.

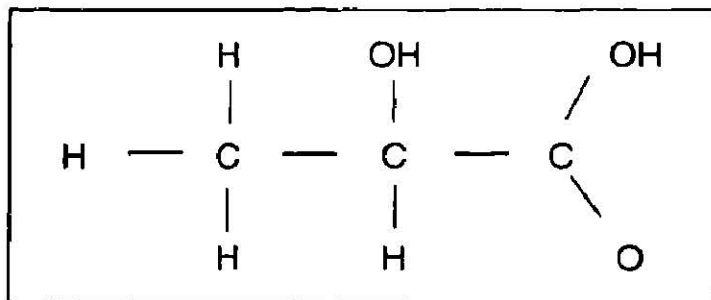
Debido a la poca o nula actividad de β -galactosidasa en los estreptococos lácticos, al compararse con la actividad apreciable de β -fosfogalactosidasa, ésta encima parece ser la más importante para la asimilación de la lactosa. (44)

La β -fosfogalactosidasa rompe la lactosa fosfato en glucosa y galactosa 6-fosfato. La glucosa es metabolizada por la ruta de Embden-Meyerhoff hasta ácido láctico, como se muestra en la figura 5.

Figura 5: Diferentes rutas en el metabolismo de la galactosa en los esterptococos, así como los productos finales del metabolismo. Los números indican las secuencias de las reacciones (Pérez)



En la siguiente figura 6 se muestra la fórmula del ácido láctico: (15)



El átomo de carbono que aparece señalado con un asterisco (*) tiene cada una de sus valencias satisfechas por grupos diferentes, de esta manera el compuesto tiene actividad óptica y puede existir como ácido láctico L(+), levógiro; D(-), dextrógiro y como ácido láctico DL (una mezcla de dos formas que no tienen actividad óptica), todo depende del microorganismo causante de la fermentación. En la mayoría de los casos, los estreptococos metabolizan más de 90% de la lactosa a ácido láctico, aunque este ácido no es el único metabolito de interés. (15)

II.2 Acido cítrico - Producción de diacetilo y acetofina.

Existen ciertos metabolitos de gran importancia en la industria láctea que están directamente involucrados en la producción de sabor en productos tales como mantequilla, buttermilk y quesos. (44, 26)

Las principales bacterias que fermentan los citratos son Leuconostoc citrovorum y Streptococcus lactis subsp. diacetyllactis para dar diacetilo (2, 3 - butanodiona), acetyl-metil carbinol (acetofina o 3-hidroxi-2-butanona), 2, 3 - butileno glicool (2, 3 - butanodiol), bióxido de carbono, ácido acético y ácido propiónico como productos principales.

De entre los productos formados en la fermentación de citratos, sin duda alguna el diacetilo es el que más contribuye al sabor y al aroma. (15)

Todas las cepas de estos organismos fermentan la glucosa y la fructuosa con producción considerable de ácido láctico, primordialmente ácido láctico D(-). La fórmula del diacetilo y la acetofina, productores de sabor y aroma, se muestran en las figuras 7 y 8.

Figura 7: fórmula del diacetilo (15)

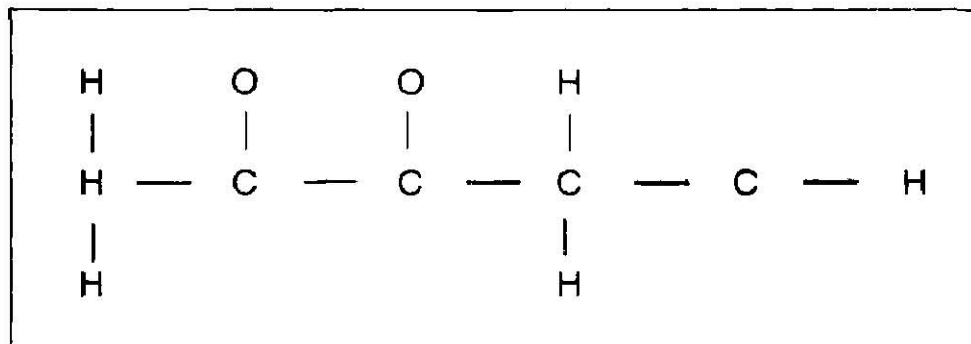
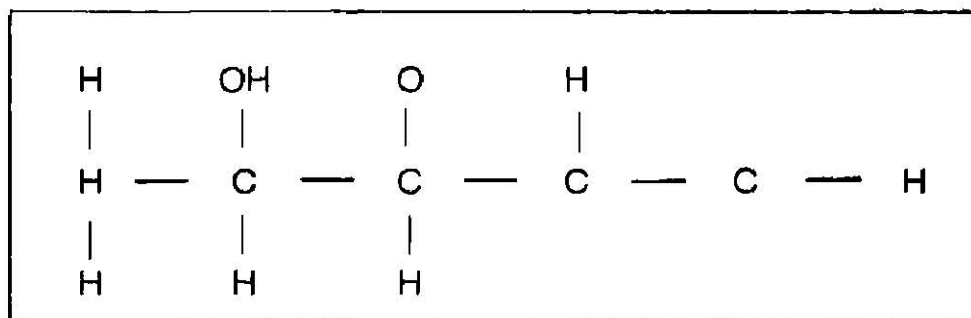
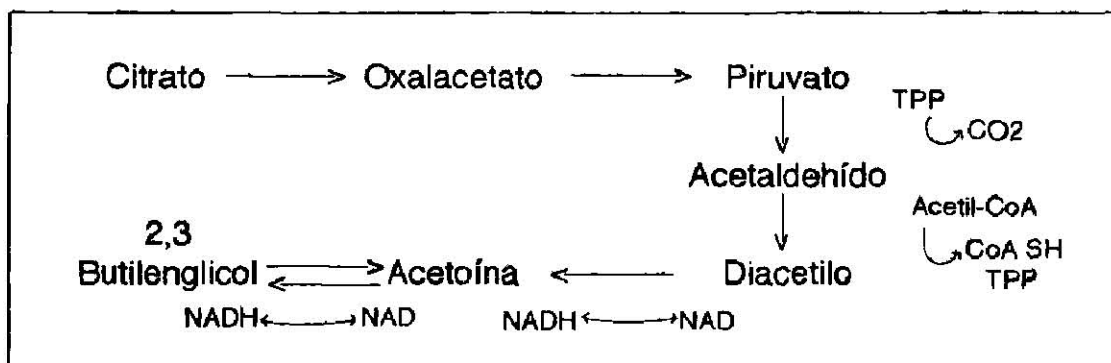


Figura 8: fórmula de acetoina (15) (acetil metil carbinol)



S. diacetylactis fermenta los carbohidratos principalmente por la bien conocida vía de la glucólisis hasta ácido pirúvico, para obtener energía y permitir la síntesis de material celular. Esto lo podemos observar en la figura 9. (44)

Figura 9: Ruta biosintética de los estreptococos lácticos para la producción de diacetilo a partir de citratos.



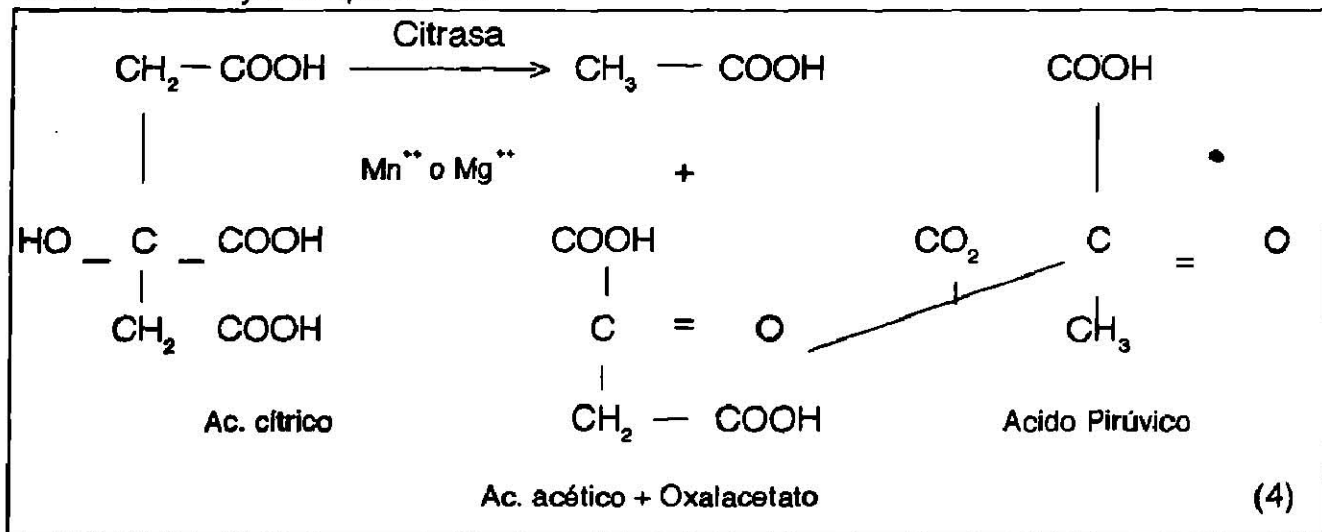
CoA = Coenzima A

TPP = Pirofosfato de Tiamina (42)

El suplemento de NAD está limitado y el NADH + H debe ser reoxidado para continuar la oxidación de la glucosa. El mecanismo primario utilizado por las bacterias lácticas es utilizar el piruvato como aceptor de hidrógeno y formar ácido láctico, por lo tanto en ausencia de otro aceptor de hidrógeno poco ácido pirúvico está disponible para la producción de diacetilo y acetoina. (3)

Cuando el citrato está presente en el modelo, los microorganismos tienen una vía alternativa para la producción de ácido pirúvico, sin la producción simultánea de NADH. Por la degradación del citrato no hay producción de energía pero existe ácido pirúvico en exceso que se puede utilizar en la síntesis de diacetilo y acetoina. La citrasa es constitutiva de *S. diacetylactis*. El mecanismo de acción de esta enzima lo podemos observar en la figura 10.

Figura 10: Mecanismo de acción de la citrasa en la utilización de citratos por leuconostocs y estreptococos



La cantidad de diacetilo producida no será importante mientras el pH del medio no baje hasta valores de 5.5 o menos; esto se debe a que la citrato permeasa, enzima responsable de la entrada del citrato a las células es más activa a estos valores de pH. También la diacetilreductasa (reduce el diacetilo a acetofina) es a su vez menos activa, lo que permite la acumulación de diacetilo en el producto lácteo elaborado. También el crecimiento bacteriano a pH's bajos es más lento, resultando en una mayor disponibilidad de ácido pirúvico para su uso en la producción de diacetilo, debido a que las células requieren menos piruvato para las síntesis de materiales celulares. (44)

II.3 Proteínas

Los microorganismos juegan un papel muy importante en la degradación de las proteínas de la leche y subproductos aún cuando hay grandes diferencias en la actividad proteolítica entre una cepa y otra. (44)

Para los estreptococos lácticos aumentar su número de células en la leche es función de su sistema enzimático proteolítico asociado a su pared celular que cataliza la hidrólisis de la proteína láctea a péptidos de 7 a 16 aminoácidos residuales.

El sistema proteolítico de estas bacterias abarca dos categorías:

1) proteinasas,

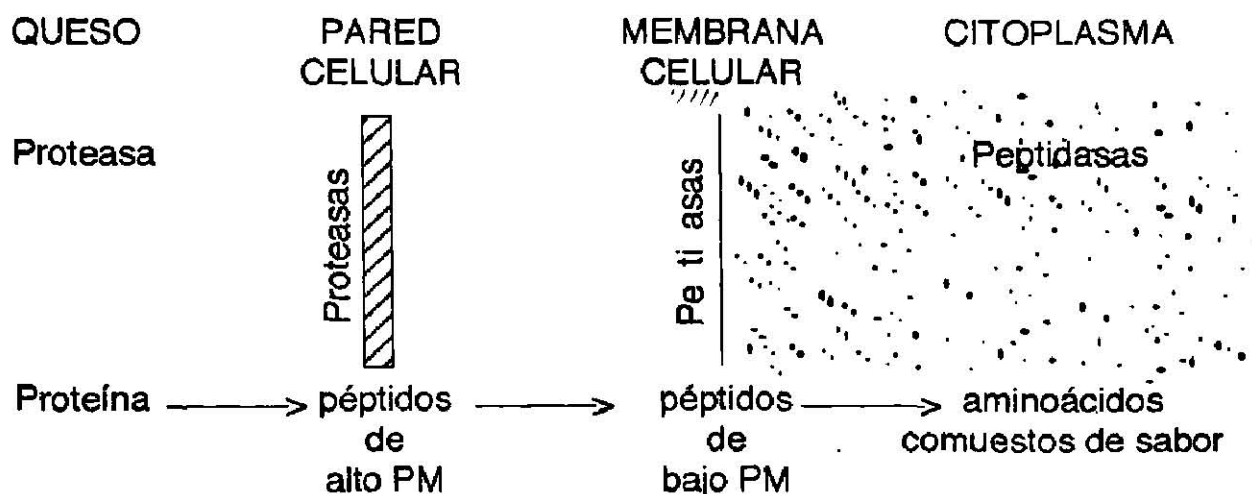
que hidrolizan proteínas nativas

2) Peptidasas,

que rompen los enlaces de los péptidos producidos por la acción de proteinasas. ambas encontradas tanto intracelular como extracelularmente y su gran importancia radica en su participación durante la maduración de los quesos. (24)

Estas enzimas, sumadas a la renina y las proteasas de la leche producen una hidrólisis parcial de la caseína, lo cual resulta en las típicas modificaciones en el sabor y textura de los quesos madurados. En la figura 11 se muestra la manera en que se lleva a cabo la degradación proteolítica durante la maduración de los quesos por microorganismos.

Figura 11: Degradación proteolítica de proteínas por microorganismos iniciadores en queso. (42)



El crecimiento de microorganismos depende de un suplemento adecuado de fuentes viables de carbono y nitrógeno. Si los organismos iniciadores poseen la enzima que hidroliza la lactosa, la fuente de carbono es ilimitada. Sin embargo, no sucede lo mismo con la fuente de nitrógeno porque los péptidos y aminoácidos libres están presentes sólo en grado limitado en la leche, por la limitada capacidad biosintética de los iniciadores y su requerimiento de aminoácidos para crecer es de gran importancia la selección de cepas con alta capacidad proteolítica. (49)

La mayor parte de las investigaciones en esta área se orienta a la localización de nuevas enzimas que intervienen en la degradación proteolítica como en 1987 lo hicieron Jaques Meyer y Regula Jordi, (41) en la purificación y caracterización de la enzima X-prolyl-dipeptidil-aminopeptidasa extraída de Lactobacillus lactis y Streptococcus cremoris que hidroliza péptidos después de la prolina, cuando el aminoácido está en la penúltima posición.

II.4 Lípidos

Las bacterias acidolácticas son sólo un poco lipolíticas en comparación de otros grupos de bacterias como Pseudomonas, Aerobacter, Acinetobacter y Flavobacterium. Los estreptococos lácticos usados en la fabricación de quesos contienen un sistema enzimático complejo, proteolítico y lipolítico que se considera crítico en el desarrollo del sabor y textura del queso. (23)

La lipólisis durante la maduración de los quesos, es, en primera, el resultado de la hidrólisis de la grasa de la leche catalizada por varias enzimas bacterianas estereolíticas y lipolíticas, cuyos productos incluyen el acetaldehído, formaldehído, cetona, 2-butanona, 2-pentanona, 3-metilbutanol, 2-heptanona, 2-nonanona, 2-undecanona, 2-tridecanona, 2-pentadecanona, diacetilo, 2-decanol, 2-dodecanol y acetoina, todos influyen considerablemente en las propiedades sensoriales. (44, 13)

IV.- PRODUCCION, CONSERVACION Y UTILIZACION DE INICIADORES

Conocemos como iniciadores a las bacterias activas crecidas en leche o suero, adicionadas durante la industrialización de la leche, para impartir ciertas características y una cantidad predecible a los productos de ella derivados. El cultivo puede ser una cepa de un microorganismo o varias cepas y/o especies llamado cultivo mixto. Los cultivos iniciadores son hoy generalmente liofilizados con componentes de la leche y distribuidos comercialmente en estado seco o congelado. (29, 44)

En los años de 1910-1920, Orla-Jensen, Von Freudenreich, J.M. Sherman, Hammer y otros microbiólogos de la leche renombrados, por separado, aislaron bacterias y prepararon con ellas cultivos puros para leches y quesos fermentados. Entre estos microorganismos se encontraban los estreptococos lácticos, leuconostocs, lactobacilos y bacterias acidopropiónicas. (29) Actualmente la producción de iniciadores se realiza a escala industrial y a continuación se detalla este proceso.

IV.1 Producción de iniciadores lácticos

IV.1.1 Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las bacterias.

En la producción de altas concentraciones de microorganismos de interés lactológico, la leche ha dejado de ser el medio óptimo para su crecimiento, esto ha sido principalmente debido a la dificultad que presentan las bacterias para efectuar la degradación de las proteínas y satisfacer sus necesidades nitrogenadas, es decir, que al ser propagadas en leche se tornan dependientes de su actividad de proteasa. (6)

Otro factor que hace a la leche no ser el medio ideal, es la alta concentración

de lactosa que posee, pues cuando los microorganismos alcanzan la fase estacionaria del crecimiento siguen produciendo ácido láctico que al acumularse, los perjudica. (53)

Además, también influyen los inhibidores presentes en la leche cuando ésta proviene de animales tratados con antibióticos. Por esto hay una continua búsqueda de medios de cultivo más económicos que satisfagan las necesidades de este tipo de bacterias, como la utilización del permeato de suero (solución de lactosa y sales que resultan de la ultrafiltración del suero de la leche para recuperar las proteínas) por Christopherson y Zottola en 1989, (9) y la leche en polvo ultrafiltrada procesada por calor por Premaratne y Cousin en 1988. (46)

Aún así, la leche sigue usándose como medio de propagación de los cultivos a nivel planta, por lo que debe cumplir una serie de requisitos para poder usarse con esta finalidad:

- 1.- Provenir de vacas normales y sanas que estén secretando un producto de naturaleza físico-química normal.
- 2.- No ser originada de animales que estén siendo tratados con antibióticos, sulfamidas u otros agentes terapéuticos que puedan inhibir el crecimiento microbiano.
- 3.- No tener un número excesivo de bacterias pues podrían sobrevivir a la pasteurización y desarrollarse en el cultivo.

IV.1.2 Influencia del control del pH en el medio de cultivo

La población alcanzable de cultivos lácticos se puede incrementar notablemente si se mantiene el pH del medio constante a niveles favorables. (44)

El pH óptimo encontrado para los esterptococos lácticos varía entre 6.8 y 6.0 con lo que la biomasa puede alcanzar niveles hasta 15 veces mayores. Aunque puede no haber diferencias significativas a valores de pH entre 5.5 y 7.0, sí debe recalcar el gran aumento alcanzado a pH controlado. (44)

El compuesto utilizado en el control del pH también puede influir en los niveles de biomasa como lo reporta Gilliland en 1977, (17) donde comparando el hidróxido de amonio y el hidróxido de sodio, el primero permitió alcanzar de 1,5 a 2.5 veces más células a un período de incubación menor.

En el caso de L. acidophilus Gilliland en 1990 menciona como pH óptimo de cultivo a 5.5. (19)

IV.1.3 Influencia de la temperatura en el medio de cultivo

La temperatura es otro parámetro a considerar de gran importancia. Las bacterias acidoláticas de mayor importancia en la industria láctea, tiene temperaturas óptimas de crecimiento entre los 30°C y los 45°C dependiendo de la especie que se trate. (44)

Para S. cremoris la temperatura óptima de crecimiento varía entre cepas de 28°C a 30°C, de igual manera para S. Lactis. (44)

En el caso de S. thermophilus se reportan temperaturas entre 35 y 42°C dependiendo de la cepa y para L. bulgaricus entre 43 y 46°C. (48)

IV.1.4 Influencia de la Actividad acuosa Aw

Larsen et al. en 1989 y 1990, (33 y 35) reportaron que al modificar la Aw de la leche, había cambios en la producción de ácido y crecimiento por L. bulg. y S. therm.

IV.1.5 Cultivos simples y cultivos mixtos.

Muchos cultivos utilizados en América, contienen dos o más cepas o especies de microorganismos lácticos, con el propósito de incrementar el sabor. Las cepas y especies son seleccionadas por su velocidad de crecimiento y producción de ácido láctico, por la formación de aroma y bióxido de carbono, por su resistencia a bacteriófagos y algunos por dar viscosidad a los productos. En el caso de queso cottage hace falta una producción rápida de ácido y aroma (1, 29)

Para producir la combinación de cepas o especies los microorganismos se preparan como mezcla y se adicionan a la leche, esperando que no haya un desbalance en los componentes y cada cepa haga su contribución. (6)

IV.2 Conservación de iniciadores

Para llevar a cabo una selección adecuada de una determinada cepa es necesario tomar en cuenta aspectos tan importantes como:

1) Temperatura de crecimiento y actividad

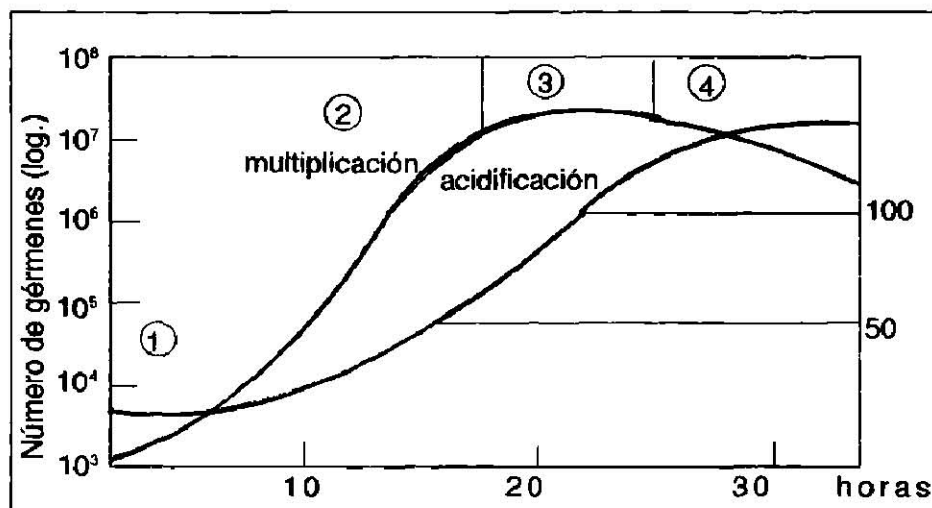
El grado óptimo no es siempre el mismo para las distintas actividades; por ejemplo, algunos estereptococos lácticos dan un aroma más pronunciado a un temperatura inferior a la óptima para su crecimiento y producción de ácido. Es igualmente

necesario considerar la temperatura límite de crecimiento y la resistencia al calentamiento. (1)

2) Acidificación

La aptitud de una cepa determinada no se mide solamente por el máximo de acidez que puede producir, es necesario conocer también la velocidad de acidificación. La siguiente curva muestra la sucesión de las fases del desarrollo microbiano, por una parte, y por otra, el desfase de la curva de acidificación. Aquí podemos distinguir cuatro partes en la curva, correspondiente al número de organismos, expresando en logaritmo, con respecto al tiempo de incubación.

Figura 12: Curvas de crecimiento y acidificación de una bacteria láctica. (1)



La fase de lactancia o de adaptación (1) depende del volumen inoculado y del estado fisiológico de las bacterias, puede ser muy corta con un inóculo procedente de un cultivo aditivo; la fase logarítmica (2) tiene una pendiente constante para una cepa dada y un medio dado; cuando se acaba el número de células se acerca a su máximo y la acidez está aún lejos de su valor límite. Las dos últimas fases son las de máxima (3) y de descenso (4) y corresponde al agotamiento de sustancias

nutritivas en el medio, o bien a la concentración de una sustancia inhibidora resultante del metabolismo microbiano, por ejemplo el ácido láctico. (1)

El poder acidificante está en relación con la resistencia de cada cepa en los medios ácidos. Los estreptococos, que producen de 0.5 a 1% de ácido y rebajan el pH hasta 4.5, no soportan la acidez producida por los lactobacilos, estos últimos pueden bajar el pH hasta 3.5.

3) Producción de sustancias aromáticas

En el caso de las cepas empleadas en lactología, se busca especialmente la producción de diacetilo, para quesos. En el caso del yoghurt no es el estreptococo, sino el lactobacilo el productor de sustancias aromáticas. (1)

4) Actividad proteolítica

Las bacterias lácticas tienen una acción proteolítica muy limitada durante la preparación y utilización de los cultivos. No ocurre lo mismo en la fabricación de quesos, donde la acción de sus proteasas se añade a las del cuajo para degradar la caseína.

En el caso de S. lactis, especie común como fermento, éste tiene una actividad proteolítica muy débil en relación a los lactobacilos. La selección de las cepas con alto nivel de actividad proteasa es de gran utilidad en la aceleración de la maduración de los quesos, ya que da una proteólisis más rápida.

5) Variabilidad de las cepas

Durante los períodos de tiempo prolongados, ciertas cepas varían su poder acidificante, mientras que otras presentan una buena estabilidad. La disminución del poder acidificante es más frecuente en los medios artificiales que en la leche. Así mismo, también influye el lugar de origen de la cepa pues éstas pueden no comportarse de la misma manera en otro lugar a menos que tengan una gran

capacidad de adaptación. (1)

6) Viscosidad de los cultivos

Es interesante conocerla cuando se trata de cepas para leches fermentadas y quesos de pasta fresca. La viscosidad depende de las propiedades de la cepa; la acidez alcanzada, así como la temperatura de pasteurización de la leche o de la crema tienen también una influencia comprobada. (1)

7) Sensibilidad a los fagos

Probablemente existen bacteriófagos específicos de todas las cepas de bacterias lácticas que se utilizan como fermentos, y constituyen una de las causas más importantes de producción lenta de ácido. (1)

Una vez seleccionada la cepa de interés, es necesario elegir el método más adecuado para su conservación, el que debe preservar y mantener todas las características de la especie. Las técnicas más utilizadas son:

A) Resiembra periódica a medios frescos

Este método de transformación se utiliza en los microorganismos de interés lactológico primordialmente en períodos de experimentación cortos, pero muy pocos a escala industrial, dada la frecuente contaminación con fagos. Cuando se va a emplear este procedimiento para mantener una colección de cultivos, se deben determinar tres cosas: el medio de cultivo adecuado, la temperatura propia para incubarlo y mantenerlo y el tiempo necesario para hacer las resiembras. (43)

B) Preservación con una capa de aceite mineral

Muchas bacterias se preservan bien cubriendo el agar en que están creciendo con aceite mineral estéril. Para cultivos en agar inclinado deberá cubrir más o menos 1.5 cm del pico del agar. El mantenimiento de la viabilidad bajo este tratamiento varía

según la especie pero generalmente, es cuestión de años. (43)

C) Liofilización

Es el proceso de congelar y sublimar el agua de la preparación congelada, es decir, las células se secan rápidamente mientras son congeladas.

Cientos de microorganismos son capaces de ser congelados por liofilización durante largos períodos, cuando son mantenidos al vacío, aparte el volumen es reducido y los cultivos son fácilmente almacenados. La liofilización se ha utilizado en la conservación de los microorganismos de interés lactológico, alcanzando buenos resultados tanto manteniendo la viabilidad como también la actividad de los cultivos.

(59)

D) Congelación

La facilidad con que se puede obtener nitrógeno líquido (temperatura de -196°C) ha permitido a los investigadores usarlo para la conservación de cultivos. Se acepta generalmente que las células en; la fase estacionaria máxima son más resistentes al daño por congelación y descongelación que las células en la fase inicial o logarítmica de crecimiento. El porcentaje de células sobrevivientes también se incrementan con la densidad celular, posiblemente porque las células lisadas pueden producir sustancias crioprotectoras.

En este procedimiento, las células son congeladas con un agente protector como glicerol o dimetil sulfóxido. (43, 19)

IV.3.- Utilización de iniciadores

Los microorganismos iniciadores dependen en gran medida del producto por elaborar, ya que cada especie bacteriana o fúngica tiene características especiales en cuanto a degradación y producción de metabolitos, que influyen en aspectos

sensoriales del producto determinado. (15, 43)

Las fermentaciones son un método para modificar las condiciones de un producto, para hacer, lo más atractivo su consumo.

La formación de sustancias de sabor y olor se debe fundamentalmente, como se mencionó anteriormente, a la acción de los iniciadores en los componentes de la leche, en particular en las proteínas y lípidos. Para ejemplificar las fermentaciones, podemos observar la tabla 11, que nos muestra los microorganismos utilizados en los productos lácteos fermentados más comunes, su función principal y los compuestos involucrados en la formación de sabor y olor

Tabla 11. Principales microorganismos de interés lactológico y su función más conocida dentro de la leche. (55, 56)

Microorganismos	Compuestos Producidos	Función más conocida	Producto lácteo
<i>Propionibacterium shermani</i>	Acido propiónico Dimetil sulfido Etanol 1-propanol 1-butanol	Sabor y formación de hoyos	Queso Suizo Queso Emmental Queso Camembert
<i>Lactobacillus lactis</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>		Acido y sabor	Leche búlgara Yoghurt Kefir Kourmiss
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Acido láctico	Acido	Leche acidófila
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Acido Láctico Acetaldehído Acido Acético	Acido	Queso Emmental Queso Cheddar Yoghurt
<i>Streptococcus diacetylactis</i>	Diacetilo Acido láctico Acido acético Acetona Acido propiónico Acido butírico Acido valérico	Acido y sabor	Crema agria Mantequilla madurada Queso Buttermilk
<i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i>	Acido láctico	Acido	Buttermilk Crema agria Queso Limburger
<i>Leuconostoc citrovorum</i> <i>Leuconostoc dextranicum</i>	Acido láctico Acido acético Etanol Bióxido de carbono	Sabor	Buttermilk Queso cottage Mantequilla madurada
			Queso Cottage Queso Cheddar Queso Quarg Crema agria Queso Quarg

<i>Streptococcus durans</i> <i>Streptococcus faecalis</i>	Acido láctico Aminas	Acido y sabor	Queso Italiano suave Queso Cheddar Queso Suizo Queso Limburger
<i>Penicillium roqueforti</i>	Metil cetonas 2-Pentanol	Sabor	Quesos azules
<i>Clostridium butyricum</i>	Acidos grasos volátiles (butílico, valérico, etc.)	Sabor	Queso Suizo
<i>Candida mycoderma</i>	Acidos grasos volátiles Compuestos carbonilos	Sabor	Queso Limburger
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Acido acetona-acético	Sabor	Queso Limburger
<i>Aspergillus oryzae</i>	Compuesto volátiles de sulfuro	Sabor	Queso Camembert

Cabe mencionar que la investigación en el campo de los cultivos lácticos, están tan avanzados que diversos investigadores están trabajando con cepas lácticas, ya a nivel genético como Feirtag (14), Kondo (28), y Wolfe (62) en la búsqueda de cepas superproductivas, y fáciles de cultivar.

V.- ASPECTOS TECNICOS EN LA ELABORACION DE PRODUCTOS LACTEOS FERMENTADOS

V.1 YOGHURT

El yoghurt es un producto lácteo fermentado que resulta de una simbiosis entre bacilos acidoláticos (Lactobacillus bulgaricus) y estreptococos termófilos (Streptococcus thermophilus).

Para el control del proceso resulta importante la proporción que guardan entre sí. En un buen yoghurt deben encontrarse alrededor de 100 bacilos por cada 100-120 estreptococos. (10)

El yoghurt industrial se hace con leche de vaca, en general muy descremada y a veces enriquecida en extracto seco por adición de leche en polvo, en una proporción alrededor del 2%. Se somete a una intensa pasteurización a 85°C durante 30 a 60 segundos. La siembra se realiza por adición del 2% al 5% del fermento láctico y la mezcla se distribuye en recipientes, que se llevan a la incubadora a 45°C; tras 2 a 5 horas la leche se cuaja y dichos envases se enfrían rápidamente. (1)

La leche debe ser de alta calidad, evitando principalmente aquella que contenga antibióticos residuales, resultantes de la terapia de mastitis en las vacas, los cuales inhiben el crecimiento de las bacterias acidolácticas y, por tanto, la producción de ácido, además de que pueden ocurrir serios problemas a consumidores alérgicos o sensitivos. (34)

El alto valor terapéutico del yoghurt ha sido definido por muchos investigadores, el consumo de éste, es común en las áreas del mundo donde la absorción deficiente de la lactosa es predominante, pues se ha encontrado que dicha leche fermentada es bien tolerada por los sujetos deficientes en lactasa; (18) pero el efecto benéfico del yoghurt depende de la ingestión de bacterias viables y la supervivencia de los microorganismos es afectada por el pH del medio. Como S. thermophilus no es ácido tolerante como L. bulgaricus, aún se cuestiona si el organismo sobreviviría a las condiciones del pasaje gástrico. En 1987 Wong et al. (citado por Shah et al, 1990) (57) no pudo demostrar que S. thermophilus sobrevivía a condiciones ácidas, pero sí que su enzima β -galactosidasa no sólo resistía tales condiciones, sino que además ayudaba a la digestión de la lactosa. En resumen, puede ser que las bacterias no resistan al pH's tan bajos, lo cual sería pensar que no contribuirían al enriquecimiento de la flora intestinal, más sin embargo, la enzima con actividad de lactosa puede resistir y ejercer la absorción intestinal de la lactosa, aún así no hay que olvidar que el número de células viables es un factor de importancia en la calidad del yoghurt (27), ya que según la FAO (1977) en el producto final las bacterias deben estar viables y en abundancia.

Cabe señalar, que se han hecho investigaciones donde se ha tratado de sustituir la leche de vaca en el yoghurt por otro tipo de ingrediente, como es el caso de Chang que en 1990 reportó la utilización de leche de soya (8)

V.2 Queso Cheddar

El Queso Cheddar se originó hace muchas décadas en el pueblo de Cheddar Inglaterra, y ahora se encuentra distribuido por todo el mundo. Según Alais en 1970

(1) se encuentra clasificado dentro de los quesos de pasta prensada.

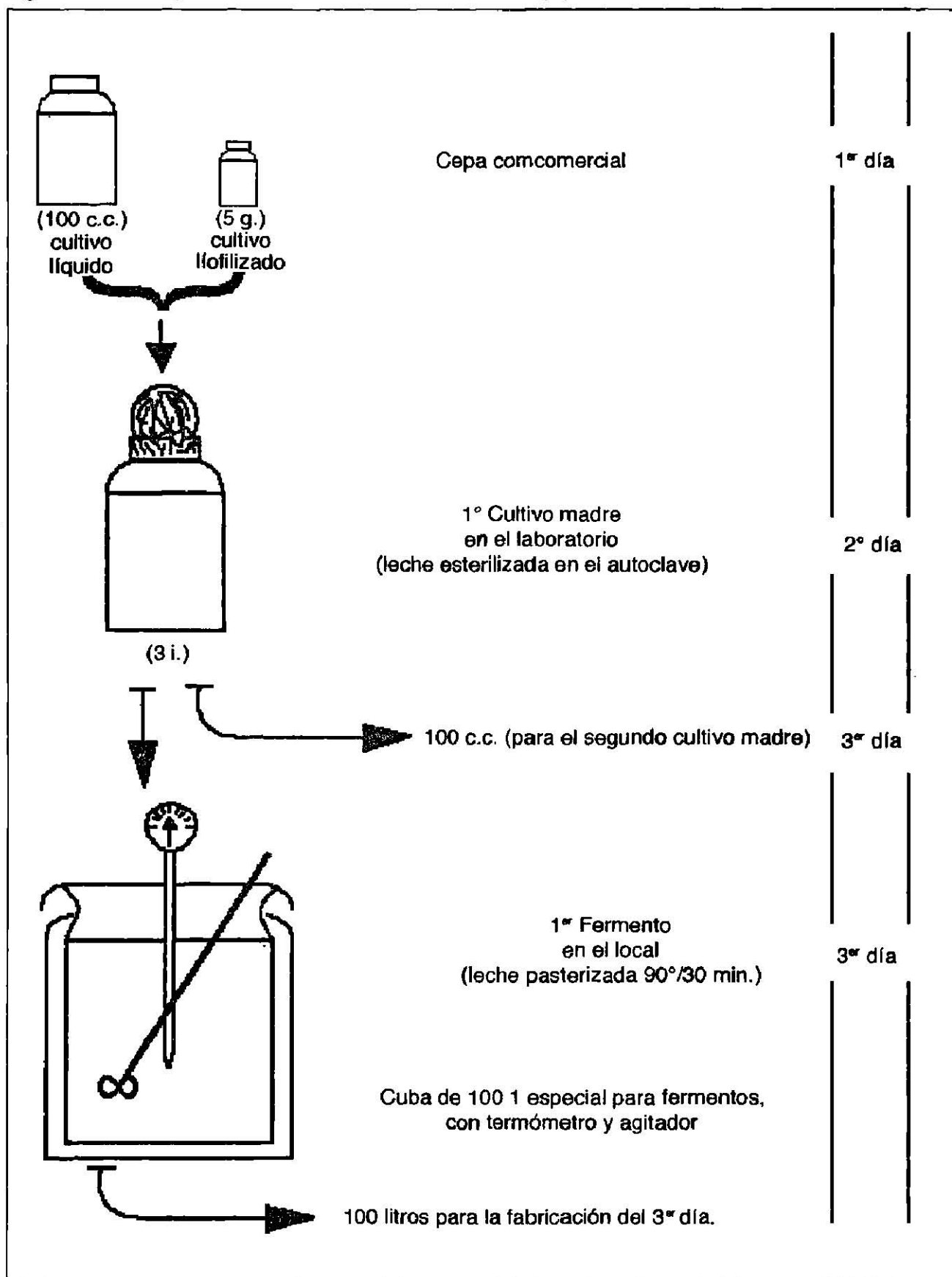
En aquellos tiempos, las prácticas sanitarias eran inadecuadas y permitían la ploriferación de bacterias productoras de gas que dan al queso un sabor "sucio". La etapa característica en la elaboración de este tipo de quesos, la chedarización, se hizo práctica común.

La chedarización es la etapa en la que la cuajada templada es apilada y reapilada en la cuba durante dos horas. Durante este período el ácido láctico aumenta rápidamente hasta llegar a un punto donde las bacterias coliformes son destruídas por los iones de hidrógeno libres. Específicamente sólo dos hoyos de gas estan permitidos por la U.S.D.A. en grados para la calidad del queso. El color del queso Cheddar es variable, blanco o amarillo, pero siempre uniforme y nunca moteado.

PRINCIPIO: El patrón de fermentación para queso Cheddar es iniciado con la cuajada de la leche coagulada con renina. El desarrollo del ácido láctico a partir de la lactosa por los estreptococos lácticos inicia tempranamente y continúa con firmeza en la cuajada durante las etapas de fabricación en la cuba de queso.

Los cultivos bacterianos usados para queso Cheddar son invariablemente estreptococos acidolácticos (Streptococcus lactis y Streptococcus cremoris). La figura 13 muestra como se lleva a cabo la preparación de los fermentos lácticos, partiendo ya sea de un cultivo líquido o de un cultivo liofilizado, para su adición a la leche antes de la coagulación. (29, 54)

Figura 13.- Preparación de fermentos lácticos. (1)



Recientemente, Puchades et al. (47) encontró que el número de aminoácidos libres durante la maduración, signo de una mayor proteólisis, era incrementado añadiendo cepas adicionales de Lactobacillus casei antes de la renina, este mismo estudio ha sido respaldado por otros investigadores como Lee et al. (36, 37) que en 1990 reportó resultados similares, lo mismo que Laleye y Litopoulou (38) en el mismo año. En 1989 Litopoulou también aisló *Pediococcus*, que podrían también estar involucrados en la proteólisis.

En general, el proceso de elaboración se basa en las siguientes etapas, que se encuentran esquematizadas en la tabla 12. Después de la adición de los cultivos a la leche a una temperatura de entre 30°C y 35°C esta es cuajada, los cubos formados son cocinados en el suero, usualmente entre 37.8 y 39.4°C. El suero es entonces removido y los cubos de la cuajada, al tiempo que adquieren más ácido láctico, forman un estado cohesivo. Esta masa es cortada en bloques.

El apilamiento y reapilamiento de los bloques de cuajada por un período prolongado es llamado chedarización, en esta etapa hay una represión de las bacterias coliformes productoras de gas, control de humedad en la cuajada y se da el tiempo necesario para incrementar el ácido láctico para separar el calcio de la paracaseína dicálcica relativamente inerte y transformarla en paracaseína monocálcica y paracaseína libre. Estas formas de caseína dan propiedades plásticas al queso resultante, y suficiente sustrato para la acción enzimática permitiendo el desarrollo de sabor y textura propios durante la maduración (29).

Actualmente, la mayor parte del queso Cheddar producido es madurado a

2.2°C durante 4 a 12 meses.

Los sistemas enzimáticos que están activos en la maduración y desarrollo del sabor de estos quesos incluyen las proteasas, peptidasas, lipasas, aminio ácido descarboxilasas y amino ácido deaminasas, aunque generalmente la proteólisis se reconoce como un indicador seguro de la maduración.

Tabla 12: Proceso general en la elaboración del queso. (1)

Fases principales		Acciones y modificaciones
1. Maduración de la leche (\pm fermento láctico).	Leche	<ul style="list-style-type: none"> - Desarrollo limitado de la microflora acidificante y, a veces, de una flora de micrococcos que prepara el "terreno".
2. Coagulación (cuajado) (+cuajo)	Cuajada fresca + lactosuero	<ul style="list-style-type: none"> - Formación del gel.
3. Corte de la cuajada y desuerado (\pm trabajo mecánico o cocido).		<ul style="list-style-type: none"> - Ruptura del gel, aceleración de la sinéresis y separación de la mayor parte del agua. - Acidificación láctica que favorece el desuerado e inhibe determinadas bacterias.
4. Colocación en molde.	Queso fresco	<ul style="list-style-type: none"> - Continuación de desuerado y de la destrucción de la lactosa; el contenido en agua debe aproximarse al valor óptimo.
5. Salado.	Queso salado	<ul style="list-style-type: none"> - Secado (complemento del desuerado). - Influencia sobre el sabor. - Selección de microorganismos. - Influencia sobre las actividades enzimáticas.
6. Maduración.	QUESO MADURADO	<ul style="list-style-type: none"> - Destrucción completa de la lactosa. - Neutralización de la pasta. - Pérdida de agua. - Proteólisis y lipólisis con formación de productos aromáticos. - Formación de la corteza.

MATERIALES Y METODOS

La presente investigación fue realizada en las instalaciones de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, ubicada en el kilómetro 17 de la carretera Marín-Zuazua en el municipio de Marín N.L.

La duración aproximada fue de siete meses, iniciando en agosto de 1990 para concluir en abril de 1991.

El objetivo principal fue aislar cepas puras de interés lactológico en estado viable a partir de productos comerciales. Los productos utilizados con este propósito fueron yoghurt, queso cheddar y una mezcla de cultivos liofilizados recomendados para la elaboración de queso cheddar.

El material y equipo utilizado se cita a continuación:

Material de vidrio (Matraces, pipetas, cajas de petri, etc.)

Mecheros

Cámara de sembrado

Azas de platino

Reactivos para pruebas bioquímicas (que se especificarán en el texto)

Medios de cultivos selectivos (que se especificarán posteriormente)

Incubadora Blue M

Autoclave

Espectrofotómetro Sequoia Turner ajustado a 690 nm

I.- AISLAMIENTO

Lo primero que se hizo fue obtener productos lácticos de interés. Se eligió el yoghurt en presentación natural y el queso cheddar en presentación de bloque de 1/2 kg, la mezcla de cultivos liofilizados fue proporcionada por la Planta de Lácteos de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L.

Una vez obtenidas las fuentes de microorganismos se procedió a sembrar en medios de cultivo previamente consultados.

En el caso de las bacterias del yoghurt se probó su crecimiento en los siguientes medios de cultivo: Agar Jugo de Tomate recomendado por Colomé et al. en 1986 que contiene por litro de agua destilada 20 grs. de jugo de tomate, 10 grs. de peptona de carne, 10 grs. de peptona de caseína y 11 grs. de agar bacteriológico; Agar de Soya Trypticase tomando de Desrosier en 1987 que por litro de agua destilada contiene 15 grs. de peptona de caseína, 5 grs. de peptona de Soya, 5 grs. de NaCl y 15 grs. de Agar.

Agar lees que por 1000 ml. contiene 10 grs. de peptona, 10 grs. de extracto de levadura, 5 grs. de lactosa, 5 grs. de sacarosa, 3 grs. de CaCO_3 carbonato de calcio, 3 grs. de fosfato de potasio K_2HPO_4 y 18 grs. de agar bacteriológico; y Agar Láctico que por cada litro de agua destilada contienen 20 grs. de triptona, 5 grs. de extracto de levadura, 2.5 grs. de gelatina, 5 grs. de glucosa, 5 grs. de sacarosa, 5 grs. de lactosa, 4 grs. de Cloruro de Sodio NaCl, 1.5 grs. de acetato de sodio, 0.5 grs. de ácido ascórbico y 15 grs. de agar bacteriológico.

Para el cultivo de los estreptococos lácticos utilizamos estos medios de cultivo Agar triptona y glucosa que por cada 1000 ml de agua destilada contiene 3 grs. de extracto de carne, 2 grs. de extracto de levadura, 5 grs. de triptona, 1 gr. de glucosa y 15 grs. de Agar bacteriológico; Agar Láctico recomendado por Demeter en 1965 cuyos ingredientes por litro ya se mencionaron con anterioridad y el Agar selectivo para estreptococos que contiene por litro de agua destilada 14.4 grs. de Peptona de Caseína, 5 grs. de Peptona de Soya, 4 grs. de NaCl, 1 gr de citrato de Sodio, 0.2 de L-cistina, 0.2 g. de Sulfito de Sodio, 5 g de glucosa, 0.2 g de Sodio azida, 13 g de Agar bacteriológico.

Para cultivar las bacterias de yoghurt se utilizaron las siguientes técnicas sobre cada uno de los medios.

a) Sembrar directamente en una azada del producto sobre la caja con medio de cultivo.

b) En tubos de ensaye con caldo nutritivo (Por c/litro: 5 gr de Peptona de Gelatina y 3 gr de Extracto de Carne se inoculó una azada del producto y se incubó por 24-48 hrs. a 40°C, posteriormente se sembró en cajas de petri por los métodos de estrías y difusión.

En todos los casos incubando a una Temperatura de 40°C por 24 a 48 horas.

Para la siembra de los cultivos liofilizados (polvo), se tomó una azada del polvo y se inoculó en caldo nutritivo incubándose a una temperatura de 35°C por 24 hrs. después de lo cual se sembró en cajas de petri con medio de cultivo por estrías y difusión, incubándose a 35°C por 24-48 hrs.

Para la siembra del queso Cheddar se hizo lo siguiente: en las condiciones más

estériles posibles se desembolsó el queso y de su parte interior y con un cuchillo estéril se cortaron pequeños fragmentos que se introdujeron en tubos con caldo nutritivo, los cuales después de una breve agitación se incubaron a 30-35°C por 24 horas, después de lo cual se transfirió a cajas con medios de cultivo por estrías y difusión. Incubando a una temperatura de 35°C por 24-48 horas.

Después de 4 o 5 resiembras y desechar las cajas contaminadas se eligió el medio de cultivo apto para las bacterias de interés tomando en cuenta los siguientes aspectos:

- 1) Facilidad para el manejo
- 2) Grado de clarificación obtenido
- 3) Grado de selectividad
- 4) Facilidad de contaminación
- 5) Rapidez de crecimiento
- 6) Disponibilidad de los reactivos

La forma de las colonias fueron checadas del medio de cultivo y se seleccionaron varias de los distintos medios, posteriormente se checó su morfología bajo el microscopio utilizando la tinción diferencial de gram, la cual consiste en preparar un frotis de la colonia seleccionada, que se cubre con una solución de cristal violeta por un minuto, después de enjuagar se pone una solución de lugol, se lava por 30 segundos con etanol al 95% y por último se utiliza una solución de safranina como colorante de contraste. Las bacterias están clasificadas en función de la tinción del gram en positivas y negativas. Las bacterias de interés lactológico son gram + por lo que se rechazaron las colonias que dieron negativa la tinción de gram.

Al mismo tiempo que se checó la tinción de gram de las colonias seleccionadas,

también se checó la forma y disposición de las células bacterianas (cocos o bacilos, aislados o agrupados, en cadenas cortas, largas, racimos, etc.).

Una vez seleccionadas las colonias de características apropiadas, se efectuaron más resiembras hasta obtener de cada una un cultivo puro y por duplicado en caja de petri con el medio de cultivo apropiado. Los cultivos puros fueron conservados en refrigeración de 4°C para su uso posterior.

II.- IDENTIFICACION

Para la identificación de cada una de las cepas encontradas se procedió a seguir una serie de pruebas bioquímicas basadas en las tablas publicadas por Demeter en 1956 (10) para lactobacilos y estreptococos, y por Jacobs en 1960. (22)

Las pruebas realizadas se ordenan como sigue:

1) Fermentación con azúcares

Para realizar esta prueba se eligió un caldo libre de azúcares (caldo nutritivo), añadiéndole un 0.5% del azúcar de interés (maltosa, fructuosa, sacarosa), se disolvió y esterilizó en tubos donde posteriormente se inoculó el cultivo en cuestión, incubando a 30-40°C por 24 horas, observando turbidez como presencia de crecimiento.

2) Prueba de la catalasa

En un portaobjetos se tomó una azada de la colonia y sobre el frotis se agregó una gota de agua oxigenada. La señal de efervescencia se consideró como que la

muestra era catalasa + y la ausencia de efervescencia como catalasa -.

3) Crecimiento con Cloruro de sodio

Para esta prueba se utilizó caldo láctico (modificación del agar láctico sin añadir los ingredientes gelificantes, agar bacteriológico y gelatina) con 2%, 4% y 6.5% de NaCl en tubos de ensaye con una azada de la colonia en cuestión; se incubó de 30°C a 40°C dependiendo de la bacteria por 24 horas, checando la turbidez como signo de crecimiento.

4) Separación selectiva de Streptococcus thermophilus y Lactobacillus bulgaricus:

Se prepararon tubos de leche magra estéril (leche natural), una serie de los cuales contenía de 0.2-0.25% de azul de azul de bromotimol y otra de 0.05-0.1% de verde de metilo. Después de inocular los tubos con una azada de yoghurt e incubar a 40-42°C por 24 horas, en el azul de bromotimol se desarrollaban los estreptococos y en el verde de metilo los lactobacilos.

5) Fermentación de la leche magra para medir acidez y diferenciar Lactobacillus bulgaricus de Lactobacillus acidophilus.

Se colocó la leche magra en tubos de ensaye esterilizándose e inoculándose con las cepas de interés al 1-2%, se incubó a 40°C. Se checó el descenso del pH cada hora. Si el pH llegaba a 5 en menos de dos horas era Lactobacillus acidophilus.

6) Producción de diacetilo

En tubos de ensaye colocamos 2 ml de cultivo de 24 horas incubado a una temperatura de 30-35°C de la colonia a estudiar, se añadieron 2 ml de Hidróxido de Sodio al 40%, 1 ml de creatina al 0.2% disuelta en etanol al 95%, y α -naftol; la intensidad del color rojo que se forma en la superficie después de mezclar bien da un índice aproximado del contenido de acetoina mas diacetilo segun Hammer en 1935, mencionando por Foster. (15)

III.- Determinación de condiciones óptimas

Una vez que se identificaron las cepas, se eligió una de cada especie encontrada y se determinaron sus condiciones óptimas de crecimiento (pH y temperatura) y se determinó su tiempo de generación. Para ésto, se colocaron 10 ml de caldo láctico en matraces modificados (matraces de 50 ml con un tubo de ensaye adaptado para leer directamente al espectrofotómetro.), se esterilizaron y se inocularon cada una de las cepas.

Los inóculos se prepararon un día antes en tubos con el mismo medio incubados a temperaturas entre 30°C y 40°C para transferirlos en la fase exponencial de crecimiento.

El primer aspecto que se determinó fue la temperatura óptima de crecimiento, para lo cual se ocuparon siete matraces con el medio todos ajustados a pH 7, variando la temperatura de incubación. Las temperaturas a probar fueron 20°C, 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 45°C y 60°C numeradas del 1 al 7, respectivamente.

Se realizaron mediciones espectrofotométricas cada 30 minutos hasta llegar a

la fase estacionaria (aproximadamente 8 horas) midiendo la absorvancia de la luz por las bacterias a 690 nm.

Una vez determinada la temperatura óptima de crecimiento de cada cepa, se procedió a determinar su pH óptimo, para la cual se utilizaron 10 matraces modificados de 50 ml cada uno con 10 ml de caldo láctico ajustados a cinco diferentes pH's utilizando un buffer de fosfatos 0.01 M combinado el pH con HCl 0.1 N o con NaOH 0.1 N según el caso. Los pH's probados fueron 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0 los cuales se hicieron por duplicado. Ya esterilizados los matraces, se incubaron con las cepas de interés y se incubaron a la temperatura óptima de cada cepa determinada en la anterior prueba.

De la misma manera que para la temperatura, se hicieron mediciones cada 30 minutos. De los datos obtenidos en esta prueba se determinó el tiempo de duplicación según la siguiente fórmula:

$$k = \frac{1}{t_g} = \frac{\text{Log}_{10}A_f - \text{Log}_{10}A_o}{(t_f - t_o) (0.301)}$$

donde:

t_g = constante de la velocidad de crecimiento instantánea

(Tiempo de generación o duplicación)

k = constante de crecimiento (número de duplicaciones por minuto)

A_f = lectura de absorvancia final del intervalo

A_o = lectura de absorvancia inicial del intervalo

$(t_f - t_o)$ = diferencia de tiempo entre las dos lecturas (58)

IV.- Elaboración de Productos Lácteos fermentados

IV.1 Yoghurt

a) Preparación del stock

En tubos de ensaye con 10ml de leche pasteurizada se inoculó una azada de la colonia de L. bulgaricus y en otro tubo de la colonia de S. lactis, ambas cepas obtenidas en este trabajo. Posteriormente se incubó a 40°C por 24 hrs.

b) A un litro de leche se le enriqueció con un 3% de leche en polvo para aumentar su contenido de sólidos, después se pasteurizó a 72°C por 16 segundos. Una vez pasteurizada se enfrió hasta 45°C.

c) Se inoculó la leche con el 1% de L. bulgaricus y un 1% de S. lactis

d) Se incubó a 40°C por 4 horas.

IV.2 Queso Cheddar

Preparación de inóculos:

1er. día En 10 ml de la leche colocamos una azada de S. lactis y en otros 10 ml una azada de S. cremoris. Se incubó a 35°C por 24 hrs.

2do. día Se virrieron los inóculos anteriores en matraces con 100 ml de leche pasteurizada, incubándose a la misma temperatura por el mismo tiempo.

Fabricación del queso:

Pasteurizada la leche a 72°C por 16 segundos se ajustó la temperatura a 35°C, después de lo cual se inoculó con el 1% de cada cepa. Se esperó de 15 a 30 minutos hasta que la leche se acidificara hasta aproximadamente 2.1%. Con el cuajo se

coaguló la leche durante 25 minutos después de lo cual se cortó la cuajada y se agitó durante 5 minutos. Elevamos la temperatura paulatinamente hasta 38°C por 45 minutos, agitando a intervalos, desueros la masa y la dejamos en reposo por 15 minutos, cortamos la masa en bloques pequeños después de lo cual procedimos a la Chedarización. Apilamos los bloques y los volteamos durante 15 minutos, hasta que el suero alcanzó un pH de 5.2 Los bloques los fragmentamos más y salamos al 3%. Moldeamos y prensamos a 10-20 lb por una hora. Desmoldamos, volteamos y volvimos a prensar a 60-70 lb por 20 horas. Se desmoldó y se secó la corteza a 13°C con una humedad relativa del 70% durante 3 días después de lo cual parafinamos y maduramos a 4°C el mayor tiempo posible (29, 30, 40, 54)

RESULTADOS

I.- Aislamiento

De los medios de cultivo utilizados, el que mejor resultado nos dio fue el Agar Láctico ya que resultó en un buen crecimiento y diferenciación de las colonias de las bacterias de interés tanto las del yoghurt como las del queso, lo que nos facilitó el seguir trabajando con ellas, pues para establecer los cultivos puros a través de resiembras sólo preparamos un sólo medio de cultivo.

En el caso del medio de jugo de tomate el inconveniente que encontré fue el mismo jugo de tomate ya que su presentación opaca impedía una buena clarificación del medio y, por tanto daba una mala diferenciación de las colonias; con respecto al agar soya tripticasa resultó poco selectivo pues permitía el crecimiento de otros tipos de bacterias (contaminantes) y el agar lees nunca logró una clarificación completa.

Para aislar los estreptococos, el agar selectivo, resultó poco efectivo pues las colonias no alcanzaban gran tamaño; el agar triptona glucosa resultó con ciertas ventajas pero era muy similar al agar láctico el que además tenía más nutrientes lo cual se reflejó en un mayor tamaño de las colonias y una mejor diferenciación de ellas. La tabla 13 nos muestra la selectividad de los medios de cultivo que utilizamos en este trabajo.

Tabla 13: Selectividad de los medios de cultivo para bacterias acidolácticas

MEDIO DE CULTIVO	LACTOBACILOS	ESTREPTOCOCOS
Jugo de Tomate	*	
Soya Trypticasa	*	*
Láctico	*	*
Selectivo para estreptococos		*
Tryptona-glucosa		*

Utilizando el agar láctico y las técnicas ya mencionadas logramos aislar dos especies de estreptococos y dos especies de lactobacilos los que mantenidos a 4°C en cajas de petri separados por cultivos puros procedimos a su identificación por pruebas bioquímicas. La elección de la temperatura de refrigeración fue la recomendada por Tsai et al. 1989. (61)

II.- IDENTIFICACION

Los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas los podemos resumir en las siguientes tablas. La tabla 14 muestra los datos obtenidos al trabajar con los estreptococos lácticos aislados a partir de dos mezclas de cultivo liofilizados claves 101 y 11, y queso cheddar. Las claves de las muestras las podemos interpretar de la siguiente manera: L 101 y L 11 de la letra a hasta la letra d significa que las muestras fueron obtenidas de las mezclas de cultivos liofilizados clave 11 o 101 y cuatro colonias elegidas al azar sembradas como cultivos puros. CHCH del número 1 al 3 significa que las muestras fueron obtenidas a partir de queso cheddar de tres diferentes colonias de bacterias.

Tabla 14: Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a los estreptococos lácticos.

Muestra	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento con NaCl		Azúcares			Catalasa
	a 45°C	a pH 9.6	2%	4%	Maltosa	Fructuosa	Sacarosa	
L 101 a	-	-	+	+	+	+	-	-
L 101 b	-	-	+	-	-	+	-	-
L 101 c	-	-	+	+	+	+	-	-
L 101d	-	-	+	+	+	+	-	-
L 11 a	-	-	+	+	+	+	-	-
L 11 b	-	-	+	-	-	+	-	-
L 11 c	-	-	+	-	-	+	-	-
L 11 d	-	-	+	-	-	+	-	-
CHCHC 1	-	-	+	-	-	+	-	-
CHCO 2	-	-	+	-	-	+	-	-
CHCH 3	-	-	+	+	+	+	-	-

En la siguiente tabla 15 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a los lactobacilos para su diferenciación. Las claves se refieren a tres marcas diferentes de yoghurt.

Tabla 15: Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a los lactobalilos

Muestra	Crecimiento con NaCl		Crecimiento a 45°C	Catalasa	Azúcares			pH=5 en menos de dos horas
	2%	4%			Maltosa	Sacarosa	Fructuosa	
Yog 1	+	-	+	-	-	-	-	-
Yog 2	+	-	+	-	-	-	-	-
Yog 3	+	-	-	-	+	+	+	+

La siguiente tabla 16 nos muestra la morfología de las células bacterianas así como las formas de agrupación presentadas por las mismas en nuestra observación al microscopio.

Tabla 16: Diferenciación morfológica y formas de agrupación de las cepas acidolácticas

COCOS		BACILOS	
Muestra	Forma de agrupación	Muestra	Forma de agrupación
L 101 a	Pares, cadenas cortas.	Yog 1	Cadenas largas
L 101 b	Cadenas largas	Yog 2	Cadenas largas
L 101 c	Pares aislados	Yog 3	Pares y cadenas cortas
L 101 d	Cadenas cortas		
L 11 a	Pares, cadenas cortas		
L 11 b	Cadenas largas		
L 11 c	Pares y cadenas largas		
L 11 d	Cadenas largas		
CHCH 1	Cadenas largas		
CHCH 2	Cadenas largas		
CHCH 3	Cadenas cortas		

Cabe señalar que la prueba que Demeter recomienda para la separación selectiva de los estreptococos termófilos y los lactobacilos bulgáricos a partir de yoghurt usando leche magra con azul de bromotinol y verde de metilo, no nos dio resultado ya que sólo se observó la presencia de lactobacilos.

A las cepas de estreptococos lácticos se les aplicó la prueba para analizar la presencia de diacetilo lo que significaba, en caso de dar positiva, que dicha cepa podría tratarse de S. diacetylactis. Los resultados son mostrados en la tabla 17.

Tabla 17: Producción de diacetilo por cepas de estreptococos lácticos

L101 a	-
L 101 b	-
L 101 c	-
L 101 d	-
L 11 a	+
L 11 b	-
L 11 c	-
L 11 d	-
CHCH 1	-
CHCH 2	-
CHCH 3	-

De las tablas de resultados anteriores detectamos la presencia de 1 cepa de S. lactis y 1 de S. cremoris a partir de la mezcla de cultivos liofilizados clave 101; 1 cepa de S. lactis, 1 cepa de S. cremoris y 1 cepa de S. diacetylactis a partir de las mezclas de cultivos liofilizados clave 11; 1 cepa de S. lactis, 1 cepa de S. cremoris a partir de queso cheddar; 2 cepas de L. bulgaricus a partir de yoghurt comercial de dos diferentes

marcas y 1 cepa de L. acidophilus de una marca de yoghurt distinta, todo esto lo resumimos en la tabla 18

Tabla 18: Cepas acidolácticas obtenidas en este trabajo

Cultivos liofilizados	1 <u>S. lactis</u>
clave 101	1 <u>S. cremoris</u>
Cultivos liofilizados	1 <u>S. lactis</u>
clave 11	1 <u>S. cremoris</u>
	1 <u>S. diacetylactis</u> *
Queso Cheddar	1 <u>S. lactis</u>
	1 <u>S. cremoris</u>
Yoghurt	2 <u>L. bulgaricus</u>
	1 <u>L. acidophilus</u>

* Aparentemente es S. diacetylactis por haber dado positiva la prueba de producción de diacetilo, pero hace falta una investigación más exacta.

III.- Establecimiento de condiciones óptimas de crecimiento

Las siguientes gráficas muestran los resultados de las mediciones espectrofotométricas realizadas a las siguientes cepas : 1 de S. lactis, 1 de S. cremoris, 1 de L. bulgaricus y 1 de L. acidophilus.

III.1 Temperatura óptima:

La figura 14 nos muestra las distintas curvas de crecimiento de la cepa de L. bulgaricus a distintas temperaturas, donde podemos observar que su temperatura óptima fue de 45°C, aunque en el rango de 35°C y hasta 45°C se ve un buen crecimiento, todo concuerda con la literatura reportada al respecto.

La figura 15 nos muestra las curvas de crecimiento de L. acidophilus donde encontramos como temperatura óptima los 40°C que está dentro del rango mencionado en la bibliografía, el rango encontrado por nosotros osciló entre los 30°C y los 40°C, ya que a partir de los 45°C disminuyó en gran medida su actividad.

La figura 16 es la curva de crecimiento a distintas temperaturas de S. lactis cuya temperatura óptima fue de 35°C, aunque se comportó bien en el rango de 30°C y hasta 40°C.

La figura 17 nos muestra reacción de la cepa S. cremoris a las distintas temperaturas probadas, la óptima resultó encontrarse a 35°C, pero a 37°C todavía tiene muy buena actividad.

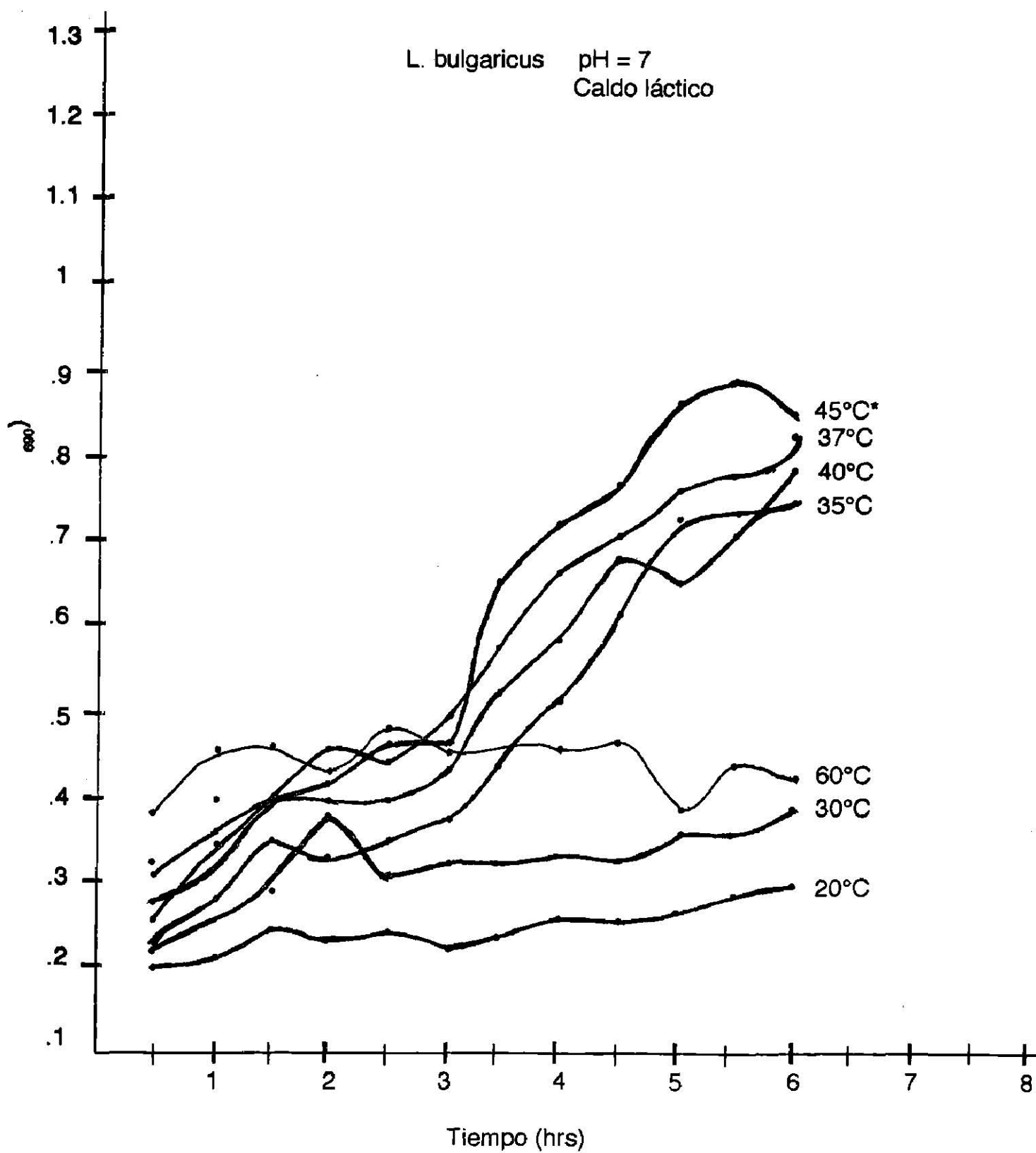
Figura 14: Curvas de crecimiento de *L. bulgaricus* a pH 7 con temperaturas variables.

Figura 16: Curvas de crecimiento de *S. lactis* a temperaturas variables y a pH 7.

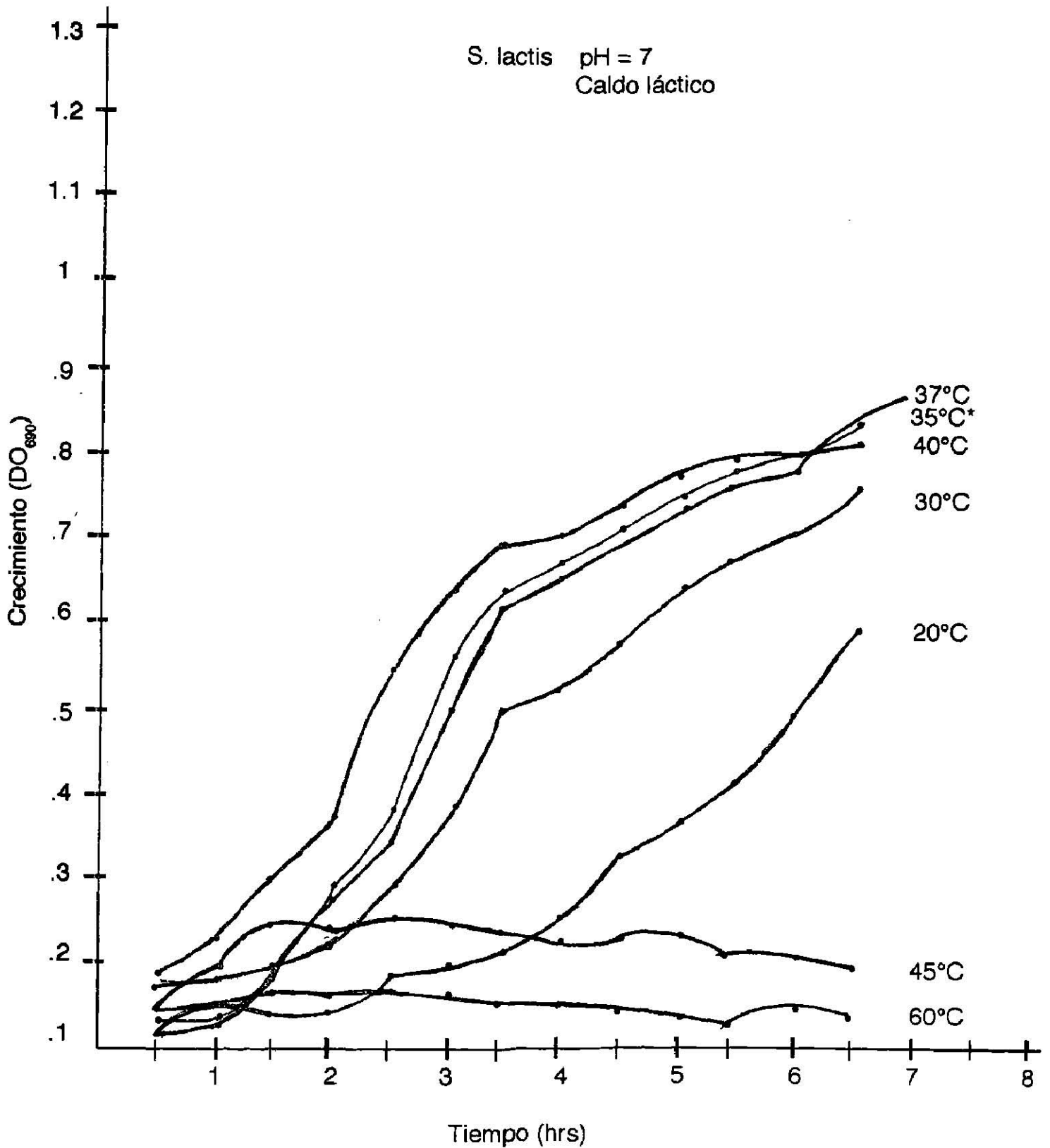
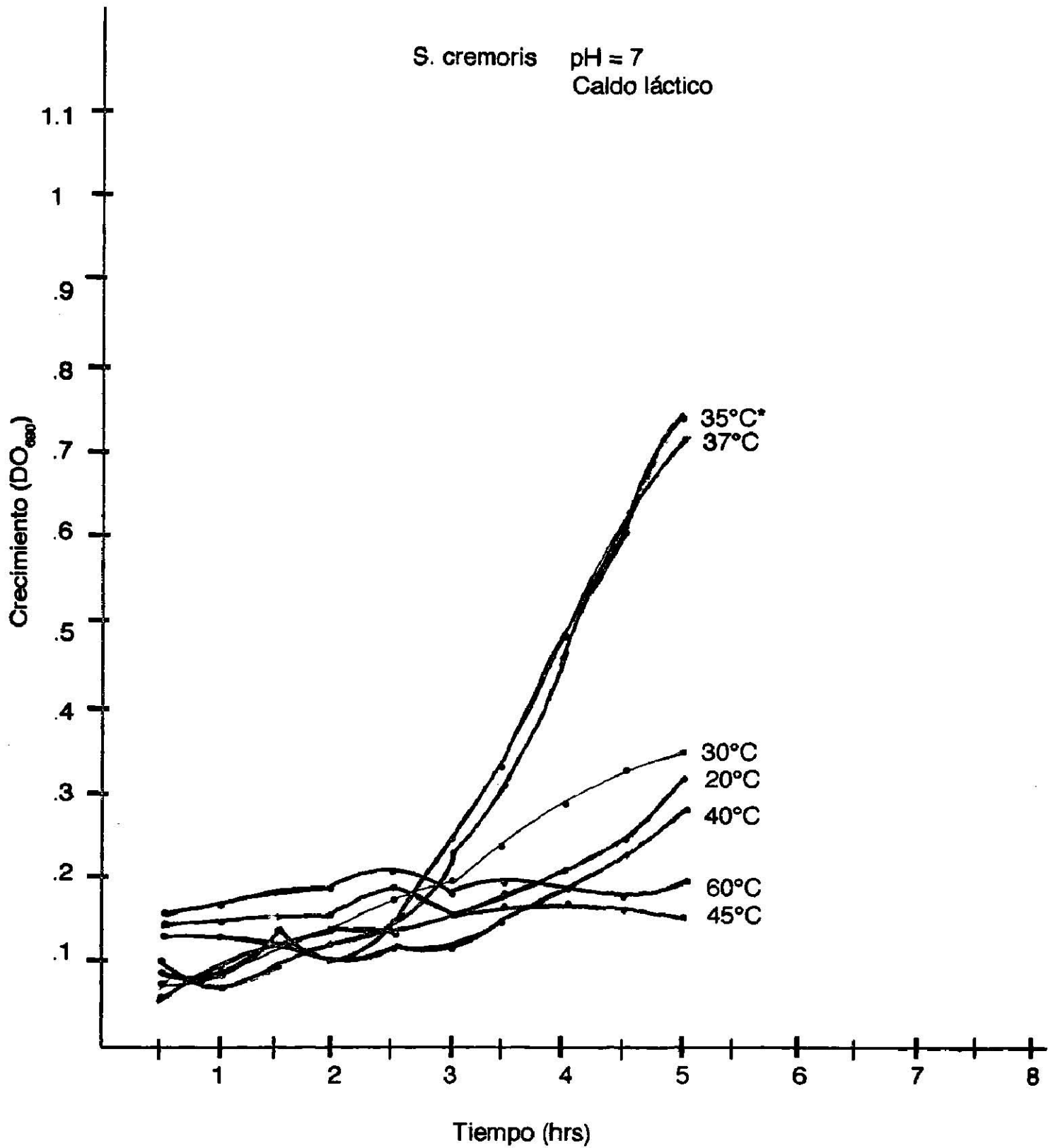


Figura 17: Curvas de crecimiento de *S. cremoris* a temperatura variable y a pH 7.

III. 2 pH óptimo

La figura 18 nos muestra la actividad mostrada por L. bulgaricus con respecto a pH's variables, incubándose a una temperatura de 45°C donde se obtuvo su máxima actividad a pH = 6.5.

La figura 19 se refiere a la actividad de L. acidophilus, donde se ve su pH óptimo a 6, incubado a 40°C.

En la figura 20 observamos que incubando S. lactis a su temperatura óptima de 35°C el pH al que alcanzó mayor actividad fue de 7.

La figura 21 se refiere a la actividad alcanzada por S. cremoris incubando a la temperatura de 35°C donde obtuvimos un pH óptimo de 6.5.

A partir de las curvas donde se tenían la temperatura y el pH óptimos para cada

Figura 18: Curvas de crecimiento de *L. bulgaricus* a una temperatura de incubación de 45°C y pH variable

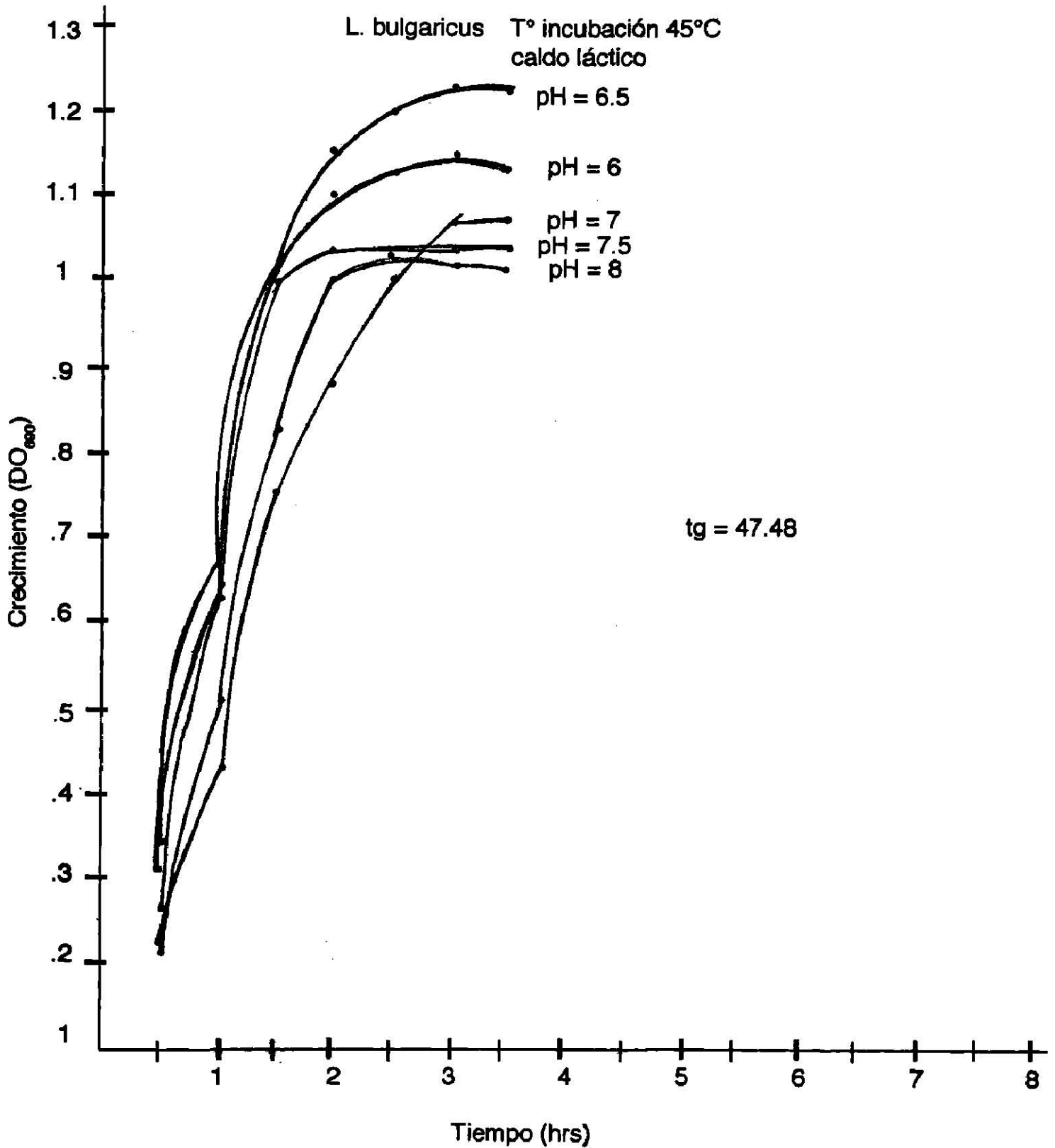


Figura 19: Curvas de crecimiento de L. acidophilus a una temperatura de incubación de 40°C y pH variable.

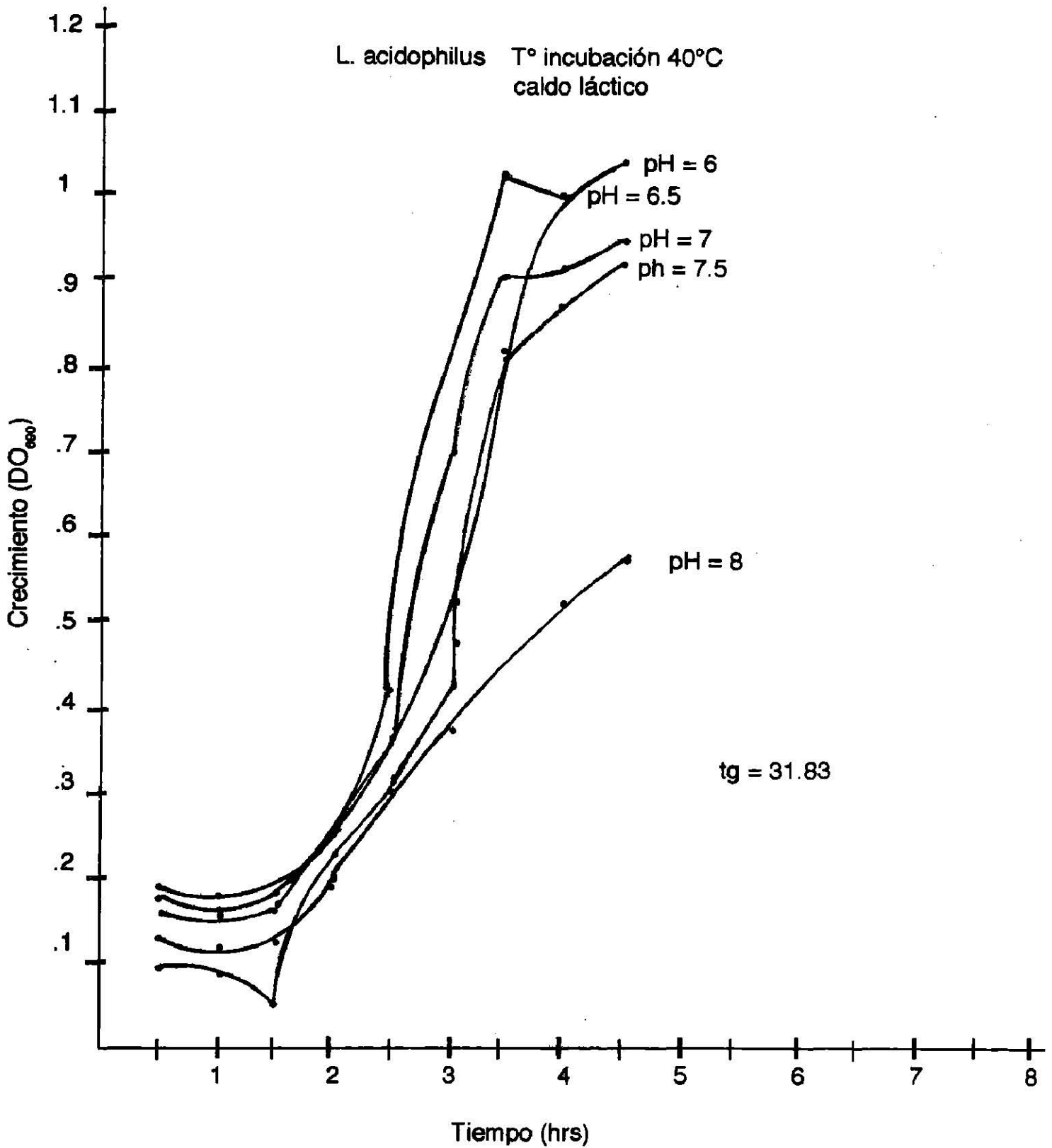


Figura 20: Curvas de crecimiento de *S. lactis* a la temperatura de incubación de 35°C y a pH variable

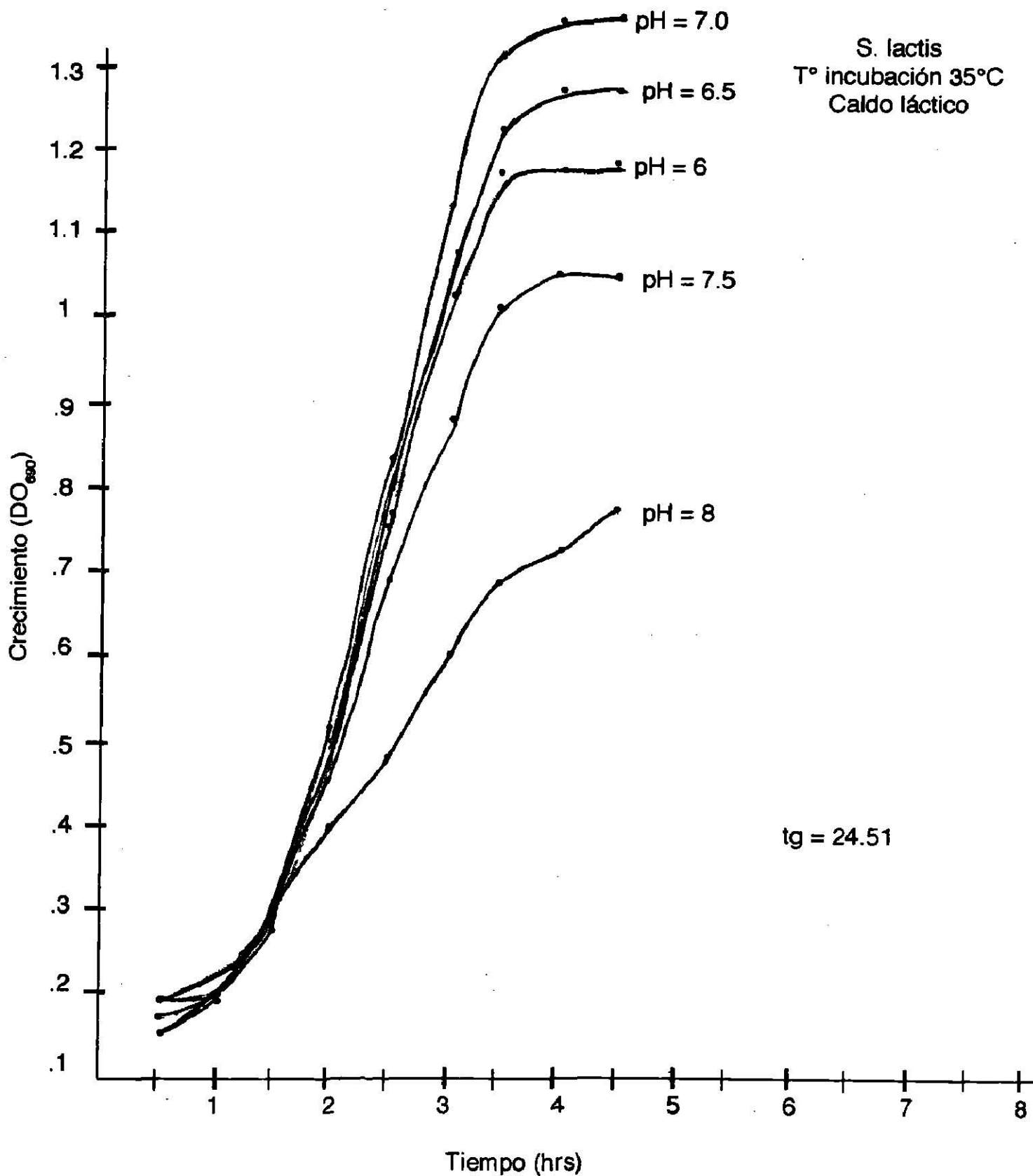
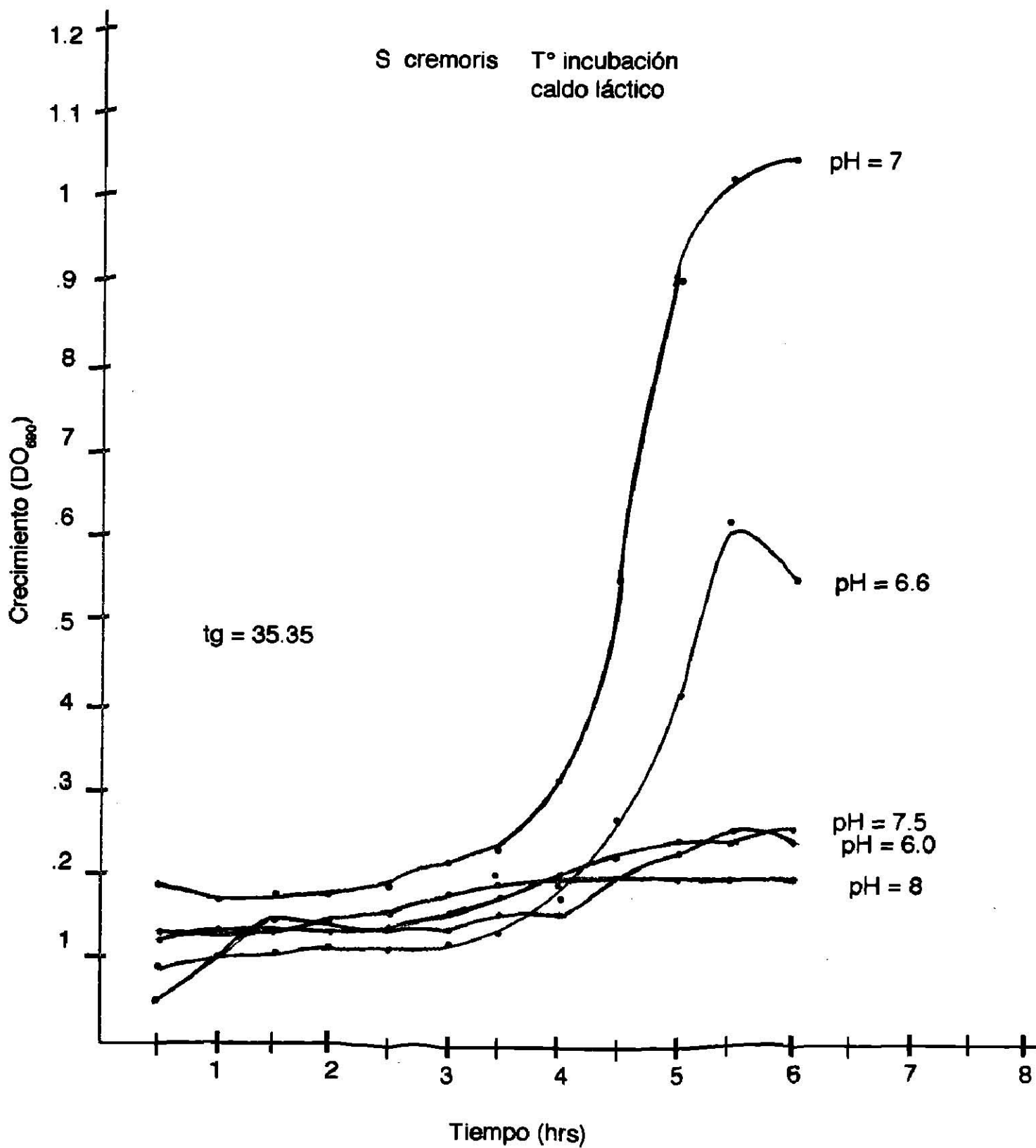


Figura 21: Curvas de crecimiento de *S. cremoris* a temperatura de incubación de 35°C y pH variable.



cepa, obtuvimos los tiempos de generación o de duplicación en minutos, los resultados finales se muestran a continuación en la tabla 19.

Tabla 19: Condiciones óptimas de crecimiento para las cuatro cepas de bacterias acidolácticas

	Temperatura óptima	pH óptimo	Tiempo de duplicación
<i>S. lactis</i>	35°C	7	25 minutos
<i>S. cremoris</i>	35°C	7	35 minutos
<i>L. bulgaricus</i>	45°C	6.5	47 minutos
<i>L. acidophilus</i>	40°C	6	32 minutos

IV.- Elaboración de productos

IV.1 Yoghurt

Aunque la idea inicial era elaborarlo con las cepas mencionadas en la literatura (*L. bulgaricus* y *S. thermophilus*), tuvimos problemas para aislar el *S. thermophilus* a partir del yoghurt.

Alais (1) reporta que esta bacteria se inactiva a pH's abajo de 5, como la bacteria se encuentra en una simbiosis con *L. bulgaricus* y ésta última es la mayor productora de acidez, probablemente esto hizo que los termófilos no crecieran al tratar de cultivarlos.

A falta de esta cepa se decidió elaborar el producto con L. bulgaricus y S. lactis en una proporción de 1:1. El resultado obtenido fue de un sabor ácido agradable no muy distinto de las marcas comerciales y el coágulo formado tuvo muy buena consistencia.

IV.2 Queso Cheddar

Siguiendo las indicaciones de las técnicas consultadas, se logró obtener un queso pequeño a partir de 4 litros de leche, el cual se realizó de una manera un tanto rústica en el laboratorio pero las bacterias probadas dieron muy buen resultado dándonos muy buena acidez y un olor agradable (ácido-cremoso). Posteriormente se puso a 4°C para su maduración.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Teniendo como base los objetivos planteados y el resultado del presente estudio, se concluye y recomienda lo siguiente:

1.- Se concluye que las bacterias acidolácticas no deben considerarse sólo como aporte de ácido láctico, ya que constituyen una fuente de bacterias activas, capaces de multiplicarse en la leche, producir sabor y aroma agradables y ayudar al enriquecimiento de la flora intestinal, participando en la degradación de la lactosa consumida por la participación de su enzima β -galactosidasa.

2.- Los cultivos lácticos deben estar activos y puros para su mejor aprovechamiento por lo que es imprescindible evitar su contaminación con especies extrañas e impedir ser atacados por bacteriófagos.

3.- Es posible aislar bacterias lácticas a partir de productos comerciales, teniendo cuidado de elegir un buen medio de cultivo con los nutrientes requeridos por dichos microorganismos y de trabajar en las condiciones mas asépticas posibles.

4.- El Agar Láctico utilizado en este trabajo para el cultivo de bacterias acidolácticas resultó el idóneo para nuestros propósitos, así como una modificación a partir de él: el Caldo láctico que se logró eliminando los elementos gelificantes a partir del primero.

5.- Se logró aislar cuatro cepas de interés lactológico pertenecientes a los géneros bacterianos Lactobacillus y Streptococcus dichas bacterias son: S. lactis, S.

cremoris, L. bulgaricus y L. acidophilus; las células pasaron a formar parte del cepario del Laboratorio de Microbiología Industrial de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L.

6.- Las condiciones óptimas de crecimiento para cada una de las cepas aisladas fueron determinadas por medio de lecturas de absorbancia a 690 nm coincidiendo con la literatura reportada consultada para la elaboración de este trabajo.

7.- Es posible utilizar las cepas aisladas en la elaboración de productos de interés comercial, pues éstas fueron probadas en la elaboración de yoghurt y queso cheddar de buena calidad organoléptica.

Las recomendaciones que se desprenden de este trabajo son las siguientes.

1.- Para la utilización de las cepas aisladas se sugiere vigilar la calidad de la leche usada como sustrato, evitando la presencia de antibióticos que podrían ocasionar una fermentación lenta o nula.

2.- Probar otros tipos de medios de conservación, como la liofilización para lograr un mayor tiempo de viabilidad de las colonias y una mayor actividad.

3.- Sugerimos seguir investigando sobre otro tipo de microorganismos de interés lactológico, no sólo bacterias, tratando de aislarlas y aprovecharlas en productos comerciales. En especial las bacterias involucradas en la producción de aromas agradables para enriquecer las cepas ya aisladas, probando medios de cultivo más selectivos y pruebas de identificación más complejas y eficaces.

4.- Se recomienda seguir trabajando en la búsqueda de cepas de las mismas especies pero más activas a partir de otro tipo de productos o directamente de la contaminación de la leche al aire libre para favorecer el crecimiento de cepas nativas.

5.- Si fuera posible, trabajar con las cepas aisladas para mejorarlas a nivel genético y aumentar su eficacia sobre la leche.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue aislar cepas de bacterias acidolácticas a partir de productos lácteos comerciales. Para esto utilizamos queso cheddar y yoghurt, al mismo tiempo usamos microorganismos liofilizados para comparar nuestros resultados. Primero aislamos en diferentes medios de cultivo para seleccionar el apropiado. Encontramos que el Agar Láctico fue el medio óptimo de crecimiento para los microorganismos aislados. Cultivos puros de estos microorganismos fueron utilizados para determinar sus características bioquímicas, y su morfología fue determinada bajo el microscopio. Estos ensayos fueron usados para identificar y separar cuatro diferentes especies de bacterias acidolácticas de diferentes fuentes: Streptococcus lactis, Streptococcus cremoris, Lactobacillus bulgaricus y Lactoibacillus acidophilus. También aislamos aparentemente una cepa más de Streptococcus diacetylactis.

Las condiciones óptimas para el crecimiento microbiano fueron determinadas así como los indicadores de crecimiento en los cultivos puros de estos microorganismos: S. lactis creció mejor a 35°C, a un pH de 7 y tuvo un tiempo de generación de 25 minutos. Resultados similares fueron obtenidos para S. cremoris excepto porque éste tuvo un tiempo de generación de 35 min. L. bulgaricus creció a 45°C y a un pH 6.5 con un tiempo de generación de 47 min., con L. acidophilus encontramos un mejor crecimiento a 40°C y a un pH de 6 con un tiempo de generación de 32 min.

Las condiciones óptimas fueron utilizadas para preparar un inóculo que fue utilizado para elaborar exitosamente yoghurt y queso cheddar con propiedades organolépticas apropiadas.

SUMMARY

The object of this work was to isolate lactic acid strains from commercial dairy products. We utilized cheddar cheese and yoghurt. At the same time we used lyophilized microorganisms to compare our results. First we isolated in different media to select the appropriated. We found that the lactic agar was the optimal media of growth for the isolated microorganisms. Pure cultures of this microorganisms were utilized to determinate biochemical characteristics, and morphology was determined under the microscope. These assays were used to identify and separate four different species of lactic acid bacteria from different sources. Strptococcus lactis, Strptococcus cremoris, Lactobacillus bulgaricus, and Lactobacillus acidophilus. Also we isolated an expected Strptococcus diacetylactis.

Optimal conditions for microbial growth determined as well as the growth rates in pure cultures of these microorganisms. Strptococcus lactis, grew better at 35°C, pH 7 and it has a generation time of 25 minutes. Similar results were obtained with Strptococcus cremoris except that the generation time was 35 minutes. Lactobacillus bulgaricus grew at 45°C and pH 6.5 with a generation time of 47 minutes. with Lactobacillus acidophilus we found better growth at 40°C and pH 6 with a generation time of 32 minutes.

The optimal conditions were utilized to prepare an inoculum which was utilized to elaborate successfully yoghurt and cheddar cheese with appropriated organoleptic properties.

LISTA DE ABREVIATURAS

<u>L.</u>	<u>Lactobacillus</u>
<u>S.</u>	<u>Streptococcus</u>
<u>P.</u>	<u>Propionobacterium</u>
<u>B.</u>	<u>Bifidobacterium</u>
<u>A.</u>	<u>Acetobacter</u>
<u>M.</u>	<u>Microbacterium</u>
Vit	Vitamina
Ac	Acido
NADH	Nicotin adenin dinucleótido
c.c	Centímetros cúbicos
grs	Gramos
hrs.	Horas
lb.	Libras

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alais Ch. 1981. Ciencia de la Leche. Editorial CECSA. México.
- 2.- Badui D.S. 1986. Química de los Alimentos. Editorial Alhambra. México.
- 3.- Collins E. B. and Bruhn J. C. 1970. Role of Acetate and Pyruvate in the Metabolism of S. diacetylactis. J. Dairy Sci. 53:121.
- 4.- Collins E. B. 1972. Biosynthesis of Flavor Compounds by Microorganismos. J. Dairy Sci. 55:1022.
- 5.- Collins E.B. and Speckman R. A. 1976. Influence of Acetaldehyde on Growth and Acetoin Production by L. citrovorum. J. Dairy Sci. 57:1428
- 6.- Collins E. B. 1977. Influence of Medium and Temperature on End Product and Growth. J. Dairy Sci. 60:799.
- 7.- Colomé J. S. y Cano R. J. 1986. Microbiology. West Publishing Company USA.
- 8.- Chang C. Y. and Stone M. B. 1990. Effect on Total Soy Milk Solids on Acid Production Selected Lactobacilli. J. Food Sci. 55:1643.
- 9.- Christopherson A. T. and Zottola E. A. 1989. Whey Permeate as a Medium for Mesophilic Lactic Acid Streptococci. J. Dairy Sci. 72:1701.

- 10.- Demeter K. J. 1969. Lacto-bacteriología. Editorial Acribia. España.
- 11.- Demeter K. J. y Elbertzhagen H. 1971. Elementos de Microbiología Lactológica. Editorial Acribia. España.
- 12.- Desrosier N. W. 1987. Elementos de Tecnología de Alimentos. Editorial CECSA México.
- 13.- El Soda M., Abdel W. H., Ezzat N. and Ismail A. 1983. The Esterolytic and Lipolytic Activities of Lactobacilli from Thermobacterium Group. J. Dairy Sci. Abstracts. Vol. 66
- 14.- Feirtag J. M. and McKay L. L. 1987 Isolation of Streptococcus lactis C₂ Mutants Selected for Temperatures Sensitivity and Potential Use in Cheese Manufacture. J. Dairy Sci 70:1773.
- 15.- Foster, Speck, Olson, Nelson y Doetsh. Microbiología de la Leche. Editorial Herrero. 1965. México.
- 16.- Frazier W. C. 1965. Microbiología de los Alimentos. Editorial Acribia. España.
- 17.- Gilliland S. E. 1977. Preparation and Storage of Concentrated Cultures of Lactic Streptococci. J. Dairy Sci. 60:805.
- 18.- Gilliland S. E. and Kim H. S. 1984. Effect of Viable Starter Culture Bacteria in Yoghurt on Lactosa Utilization in Humans. J Dairy Sci. 59:863.

- 19.- Gilliland S. E. and Rich C. N. 1990. Stability During Frozen and Subsequent Refrigerated Storage of Lactobacillus acidophilus Grown at Different pH.
J. Dairy Sci. 73:1187.
- 20.- Holsinger V. H. and Kligerman A. E. 1991 Applications of Lactasa in Dairy Foods and Other Foods Containing Lactose. Food Tech. 45:92
- 21.- Hutkins R., Morris H. A. y McKay L. L. 1983. Effect of Galactose on Growth of S. thermophilus. J. Dairy Sci. Abstracts. Vol 66.
- 22.- Jacobs M.B. and Gerstein M. J. 1960 Handbok of Microbiology. Van Nostrand Reinhold Company. U.S.A
- 23.- Jagota S. K., Ramana R. M. and Dutta S. M. 1981 β -galactosidase of S. cremoris. J Food Sci. 46:161
- 24.- Kamaly K. M. and Marth E. H. 1989. Enzyme Activities of Lactic Streptococci and their Role in Maturation of Cheese. A Review J Dairy Sci 72:1945.
- 25.- Keating P. F. y Gaona R. H. 1986. Introducción a la Lactología. Editorial Limusa. México.
- 26.- Kim. H. S. and Gilliland S. E. 1983. Lactobacillus acidophilus as a Dietary Adjunt for Milk to Acid Lactose Digestion in Humans. J. Dairy Sci. 66:959

- 27.- Kim S. S. and Bhowmik S. R. 1990. Survival of Lactic Acid Bacteria During Spray Drying of Plain Yoghurt. J. Food Sci. 55:1008.
- 28.- Kondo J. K. 1988. Clonig and Gene Transfer in Lactic Acid Streptococci. J. Dairy Sci. Abstracts. Vol. 71.
- 29.- Kosikowski F. 1970. Cheese and Fermented Milk Foods. Published by Himself. U.S.A.
- 30.- Kosikowski F. 1977-78. Demonstration in Food Processing Fermentations. Manual.
- 31.- Kroger M., Kurmann J. A. and Rasic J. L. 1989. Fermented Milks - past, present and future Food-tech. 43:92.
- 32.- Laley L.C., Simard R. E., Lee B. H. and Holley R. A. 1990. Quality Attributes of Cheddar Cheese Containing Added Lactobacilli. J. Food Sci. 55:114.
- 33.- Larsen R. F. and Añón M. C. 1989. Effecto of Water Activity a_w of Milk on Acid Production by Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus. J. Food Sci. 54:917.
- 34.- Larsen R. F. and Añón M. C. 1989. Interaction of Antibiotics and Water Activity a_w on Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus. J. Food Sci. 54:922.
- 35.- Larsen R. F. and Añón M. C. 1990. Effect of Water Activity a_w of Milk upon Growth and Acid Production by Mixed Cultures of Streptococcus thermophilus

and Lactobacillus bulgaricus. J Food Sci 55:708.

- 36 - Lee B. H., Laleye L.C., Simard R. E., Holley R. A., Emmans D. B. and Giroux R. N. 1990 Influence of Homofermentative Lactobacilli on Physicochemical and Sensory Properties of Cheddar Cheese J Food Sci 55:386
- 37 - Lee B. H., Laleye L. C., Simard R. E., Munsch M. H. and Holley R. A. 1990 Influence of Homofermentative Lactobacilli on the Microflora and Soluble Nitrogen Components in Cheddar Cheese J Food Sci 55:391
- 38 - Litopoulou T. E., Graham D. C. and Beyatli Y. 1989 Detection of Pediococci and other Nonstarter Organisms in American Cheddar Cheese. J. Dairy Sci 72:854
- 39 - Litopoulou E. and Tzanetaki 1990. Changes in Numbers and Kinds of Lactic Acid Bacteria During Ripening of Kefalotyri Cheese J Food Sci. 55:111
- 40 - Manuales para Educación Agropecuaria. 1988. Elaboración de Productos Lácteos Editorial Trillas. S.E.P. México.
- 41 - Meyer J. and Jordi R. 1987 Purification and Characterization of X-Prolyl-Dipeptidyl-Amino-peptidase from Lactobacillus Lactis and from Streptococcus thermophilus. J. Dairy Sci 72:2239.
- 42 - Mozkowitz G. J. and Noelck S. S. 1987 Enzyme-Modified Cheese Technology. J Dairy Sci. 70:1761.

- 43.- Pelczar M. J., Reid R. D. y Chan E. C. 1982. Microbiología. Editorial McGraw Hill. México.
- 44.- Pérez G. J. y Pérez G. J. P. 1984. Bioquímica y Microbiología de la leche. Editorial LIMUSA. México.
- 45.- Potter N. W. 1978. La Ciencia de los Alimentos. EDUTEX México
- 46.- Permaratne and Cpousin M. A. 1988. Growth of Starter Culture in Heat Processed Ultrafiltered SKim Milk. J. Dairy Sci. Abstracts. Vol. 71
- 47.- Puchades R., Lemieux L. and Simard R. E. 1989. Evolution of Free Amino Acids During Ripening of Cheddar Cheese Containing Added Lactobacilli Strains.
- 48.- Radke-Mitchell and Sandine W. E. 1983. Influence of Temperature on Associative Growth of Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus. J. Dairy Sci Abstracts Vol. 71
- 49.- Rajagopal S. N. and Sandine W. E. 1990. Associative Growth and Proteolysis of Streptococcus thermophilus y Lactobacillus bulgaricus in Skim Milk J Food Sci. 73:894.
- 50.- Rash K. 1990. Compositional Elements Affecting Flavor of Cultured Dairy Foods J. Dairy Sci 73:3651
- 51.- Richmond M. L., Gray J. I. and Stine C. M. 1981. β -galactosidase: A Review of

Recent Research Related to Technological Application, Nutritional Concerns and Immobilization. *J. Dairy Sci.* 64:1759.

52.- Rogosa M. and Sharpe M. E. 1960. An Approach to the Classification of Lactobacilli. *J. Appl. Bact.* 22:329.

53.- Sandine W. E. 1977 New Technics in Handling lactic Cultures to enhance their performance. *J. Dairy Sci.* 60:822

54.-Schwartz M. E. 1973. Cheese-Making Tecnology. Noyes Data Corporation. Inglaterra.

55.- Seitz E. W. 1990. Microbial and Enzyme-Induced Flavors in Diary Foods. *J. Dairy Sci.* 73:3664.

56.- Shah N., Jelen P. y Ujvarasy. 1990 Rennet Effects and Partitioning of Bacterial Cultures During Quarg Cheese Manufacture. *J. Food Sci.* 55:398.

57.- Shah N. and Jelen P. 1990. Survival of Lactic Acid Bacteria and their Lactases under Acidic Conditions. *J. Food Sci.* 55:506.

58.- Smith D. W. and Brock T. D. 1989 *Biology of Microorganisms* Prentice Hall 4th edition USA.

59.-Speckman C. A., Sandine W. E. and Elliker P. R. 1974. Lyophilized Lactic Acid Culture Concentrates: Preparation and Use in Inoculation of Vat Milk for Cheddar and Cottage Cheese. *J. Dairy Sci.* 57:165.

- 60.- Toba T., Tomota Y. Itho T. and Adachi S. 1981. β -galactosidase of Lactic Acid Bacteria: Characterization by Oligosaccharide Formed During Hydrolysis of Lactose. J. Dairy Sci. 64:185.
- 61.- Tsai Kwang-Pin and Luedecke LI. O. 1989. Impedance Measurement of Changes in Activity of Lactic Cheese Starter Culture After Storage at 4°C J Dairy Sci. 72:854
- 62.- Wolfe T. W. and Mckay L.L. 1983 Examination of the Enzymatic and Genetic Basis for Lactose Metabolism in *S. lactis* C₂ J. Dairy Sci Abstracts Vol. 66.

