

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS MICROBIANAS  
PARTIENDO DE PRODUCTOS LACTEOS COMERCIALES**

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**RODRIGO HERNANDEZ SANTIAGO**

**MARIN, N.L.**

**NOVIEMBRE DE 1993**

040.637  
FA2  
1993  
C.5

T  
OR121  
H4  
C.1

040.637  
EA2  
1993  
C.5



1080061506

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS MICROBIANAS  
PARTIENDO DE PRODUCTOS LACTEOS COMERCIALES

TESIS

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

PRESENTA

RODRIGO HERNANDEZ SANTIAGO

MARIN, N.L.

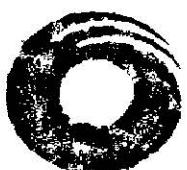
NOVIEMBRE DE 1993

0116278

QR121

H4

040.637  
FA2  
1993  
C-5



Biblioteca Central  
Magna Solidaridad

F. TESIS



UANL  
FONDO  
TESIS LICENCIATURA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

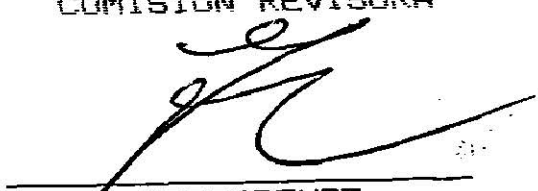
FACULTAD DE AGRONOMIA


Aislamiento y caracterización de cepas microbianas partiendo de productos lácteos comerciales.

Esta tesis se realizo en la F.A.U.A.N.L., aceptada como requisito parcial para obtener el titulo de Ingeniero en Industrias Alimentarias.

PRESENTA  
Rodrigo Hernández Santiago

COMISION REVISORA

  
PRESIDENTE  
Ph.D. RIGOBERTO GONZALEZ GZZ.

  
SECRETARIO  
ING. ROMULO FLORES DE LA PEÑA

  
VOCAL  
ING. MANUEL TREVINO C.

## AGRADECIMIENTOS

A DIOS GRACIAS POR CONCEDERME CON TU GRACIA EL HABER CULMINADO  
UNA DE MIS METAS EN ESTA VIDA, VIVO ETERNAMENTE AGRADECIDO.

A MIS PADRES Sr. BARTOLOME HERNANDEZ BALBUENA.

Sra. LUCIA SANTIAGO SANTOS.

POR DARME LA VIDA, POR DEJARME SER Y HACER LO QUE YO QUIERO  
GRACIAS POR DARME SU GRAN APOYO.

A MIS HERMANOS FLAVIO Y GUADALUPE HILDA

VICTOR MANUEL

JUAN ALBERTO

POR SER MAS QUE HERMANOS, SIN PALABRAS.

AL Ph. Dr. RIGOBERTO GONZALEZ GONZALEZ. . .A SUS COLABORADORES  
POR HABER ACEPTADO ESTAR EN ESTE TRABAJO.

PARA ADRIAN FLORES CASTELLANOS POR SER UNA PERSONA QUE TIENE MUY  
EN ALTO EL SIGNIFICADO DE LA PALABRA AMISTAD.

PARA EL PROFESOR JOSE DE LA GARZA ELIZONDO POR TODO LO QUE LE  
APRENDIDO DESDE QUE LE CONOSCO.

A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE NO MENCIONO, PERO SABEN QUE LOS  
ESTIMO MUCHO.

A TI POR DARTE LA MOLESTIA DE HOJEAR ESTE TRABAJO, OJALA Y TE  
SIRVA EN ALGO, TAL VEZ NO TE CONOSCA PERO GRACIAS.

## CONTENIDO

	Pag.
I INTRODUCCION.	1
II REVISION DE LITERATURA.	2
2.1 Introducci3n.	2
2.2 COMPOSICION QUIMICA DE LA LECHE.	3
2.2.1 Carbohidratos.	3
2.2.2 L3pidos.	6
2.2.3 Prote3nas.	7
2.2.4 Enzimas.	10
2.2.5 Vitaminas.	11
2.2.6 Minerales.	12
2.3 MICROORGANISMOS LACTICOS	13
2.3.1 Introducci3n.	13
2.3.2 Streptococcus	17
2.3.3 Leuconostoc.	18
2.3.4 Propionibacterium shermanii.	20
2.4 MODIFICACIONES DE LOS CONSTITUYENTES DE LA LECHE LLEVADA A CABO POR LOS MICROORGANISMOS.	21
2.4.1 Introducci3n.	21
2.4.2 <u>Streptococcus thermophilus.</u>	26
2.4.3 <u>Streptococcus diacetylactis.</u>	31
2.4.4 <u>Leuconostoc dextricum.</u>	32
2.4.5 <u>Propionibacterium shermanii.</u>	34
III MATERIALES Y METODOS.	35
3.1 Aislamiento.	36
3.2 Identificaci3n	39
3.2.1 Fermentaci3n de az3car.	39
3.2.2 Prueba de catalasa.	40
3.2.3 Crecimieento en NaCl.	40
3.3 Determinaci3n de condiciones 3ptimas de crecimiento.	40
IV RESULTADOS.	42
4.1 Aislamiento.	42
4.2 Identificaci3n.	43
4.3 Determinaci3n de condiciones 3ptimas de crecimiento.	47



V	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	58
VI	RESUMEN.	59
VII	BIBLIOGRAFIA	60
VIII	INDICE DE CUADROS, FIGURAS Y GRAFICAS.	
CUADRO No. 1.	Familia lactoabcteriseae.	14
CUADRO No. 2.	Características principales de las bacteras lácticas.	15
CUADRO No. 3.	<u>Streptococcus thermophilus.</u>	43
CUADRO No. 4.	<u>Streptococcus diacetylactis.</u>	44
CUADRO No. 5.	<u>Leuconostoc dextricum.</u>	45
CUADRO No. 6.	<u>Propionibacterium shermanii.</u>	46
FIGURA No. 1.	Fórmula de la glucosa.	4
FIGURA No. 2.	Mecanismos para la degradación de proteínas.	23
FIGURA No. 3.	Utilización del citrato.	24
FIGURA No. 4.	Mecanismos de la degradación de lípidos.	26
FIGURA No. 5.	Formación de ácido láctico.	28
GRAFICAS de Ph vs. TIEMPO.		
1. -	<u>Streptococcus thermophilus</u>	49
2. -	<u>Streptococcus diacetylactis</u>	50
3. -	<u>Leuconostoc dextricum</u>	51
4. -	<u>Propionibacterium shermanii</u>	52
GRAFICAS de TEMPERATURA vs. TIEMPO.		
5. -	<u>Streptococcus thermophilus</u>	54
6. -	<u>Streptococcus diacetylactis</u>	55
7. -	<u>Leuconostoc dextricum</u>	56
8. -	<u>Propionibacterium shermanii</u>	57

## I. - INTRODUCCION

La leche ha representado desde tiempos inmemorables un alimento natural con cualidades nutricionales excepcionales por lo que el hombre ha enfocado su interes en el estudio de este producto.

Como la mayoría de las que atraen la atención al hombre las propiedades de la leche se descubrieron en forma casual, inicialmente seleccionando los animales con mayores capacidades productivas y despues de los fenómenos de cuajado de la leche, que permitian la utilización del producto en periodos mayores.

En condiciones naturales los mamíferos producen únicamente leche suficiente para sus crías, sin embargo, el historia encontró que la leche era buena para él, lo que resulto en la domesticación de animales productores de leche y comenzó a utilizarlos y seleccionarlos para aumentar la producción para su consumo.

El hacer pruebas para la plena identificación de bacterias es necesario por que se requiere tener un cepario con plena identificación de las bacterias por que dan características muy especiales en los productos.

Los microorganismos estan involucrados en la fermentación de varios alimentos tales como los vegetales, carnes, proteína vegetal, cereales y por supuesto los productos lácteos.

Los productos fermentados han sido preparados y disfrutados pero sólo recientemente se ha descubierto que ciertos microorganismos específicos son responsables de darle características muy representativas a los productos como atributos

distintivos.

Muchos de estos microorganismos son habitantes naturales del tracto intestinal del hombre, y la proliferación de éstos en la leche ayudan a la flora intestinal natural.

Las bacterias acidolácticas pueden dividirse en dos grupos: la tribu Lactobactericeae y la tribu Streptococcaceae.

En la industria láctea, los microorganismos de la fermentación incluye la bacteria láctica de quesos, suero de leche con cultivos, crema agria, mantequilla y leche acidofila, entre otros.

Desde aquellos primitivos principios hasta hoy, la microbiología de los cultivos lácticos, es decir, la selección y preparación de las bacterias acidolácticas, comienzan a adquirir gran importancia. Kilara and Shahani 1978; Kroger M. et. al 1989; Perez 1984.

## II.- REVISION DE LITERATURA

### 2.1 INTRODUCCION

La leche es un líquido segregado de las glándulas mamarias de las hembras de los mamíferos tras el nacimiento de la cría, es un líquido de composición compleja, blanco y opaco, de sabor dulce y reacción iónica (Ph) cercana a la neutralidad.

La función natural de la leche es la de ser un alimento exclusivo de los mamíferos jóvenes durante el período crítico de su existencia, tras el nacimiento cuando el desarrollo es rápido y no puede ser sustituido por otros alimentos.

La gran complejidad de la composición de la leche responde a esta necesidad.

La leche es una emulsión de materias grasas, es un líquido que presenta analogías con el plasma sanguíneo.

Este líquido es, una suspensión de materias proteicas en un suero constituido por una solución verdadera que contiene principalmente lactosa y sales minerales.

Por lo tanto, existe en la leche cuatro tipos de componentes importantes: grasas, proteínas (caseinas y albominoideas), lactosa y sales.

Y otros componentes en cantidades minimas como son las lecitinas, vitaminas, enzimas, nucleotidos, gases disueltos, etc. Alais 1970.

## 2.2 COMPOSICION QUIMICA DE LA LECHE.

### 2.2.1 Carbohidratos.

La lactosa es el azúcar de la leche y es por mucho, el más abundante carbohidrato presente en ella.

La lactosa se sintetiza únicamente de glucosa. La lactosa es un disacarido formado por glucosa y galactosa y esta es en forma constitutiva de varios compuestos quimicos como los cerebrócidos y los ganglósidos, que son esenciales en los tejidos nerviosos del cerebro, tambien se encuentran pequeñas cantidades de sacarosa y algunos aminoazúcares derivados de las hexosaminas.

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 aquellas que han recibido un tratamiento termico.

La falta de un metabolismo propio de este azúcar puede tener problemas muy serios de salud en el humano, ya que algunos grupos etnicos no toleran este disacarido debido fundamentalmente a la ausencia de la enzima  $\beta$ -D-galactosidasa, llamada lactasa, del jugo inestinal del sistema digestivo.

La galactosa se encuentra relativamente poco en forma libre como monosacarido, pero es abundante en forma combinada, principalmente con la glucosa.

Estos azúcares se encuentran unidos por un enlace glucosídico  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), el carbon anomérico de la glucosa está libre, por lo cual hace a la lactosa un azúcar reductor.

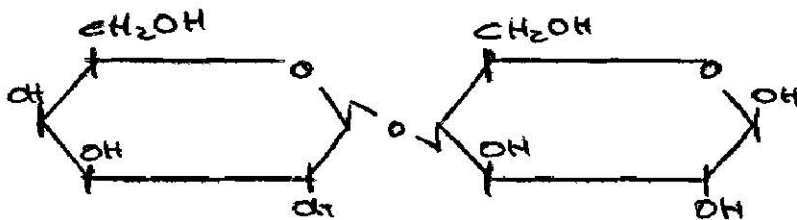


FIGURA No. 1 Formula de la glucosa

Existe en forma  $\alpha$  y  $\beta$ , por lo tanto, presenta el fenomeno de mutarrotación, esto le permite reaccionar con los grupos aminos e produciendo las correspondiente melanomidinas, de estas dos formas se pueden diferenciar las propiedades físicas.

Normalmente este azúcar no es afectado por los tratamientos

térmicos, y solo en casos extremos de calentamiento suceden cambios químicos de su estructura.

La lactosa se encuentra a razón de alrededor de 5% y tiene alrededor del 15% de dulzura de la sacarosa y constituye junto con las sales el sabor global de la leche. Alais 1970; Badui 1988.

La lactosa se puede transformar en diferentes componentes a través de los diferentes microorganismos y uno de ellos es el ácido láctico que se considera como el más importante.

El ácido formado puede ser levógiro, dextógiro o racémico, por existir un carbón asimétrico, la acidificación espontánea es el hecho más comúnmente observado en la leche a temperatura ambiente, la acidez se eleva muy lentamente al principio, luego tras algunas horas (según la temperatura) muy rápidamente en general, se frena cuando el contenido de ácido láctico llega a 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. Alais 1970.

Los oligosacáridos son otros carbohidratos que tienen un gran interés biológico a pesar de que se encuentran en cantidades muy pequeñas en la leche, se encuentran constituidas por dos a seis moléculas de carbohidrato y se clasifican en tres grupos:

- 1.- Oligosacáridos no nitrogenados que contienen glucosa, galactosa, metilpeptona, fucosa, etc.
- 2.- Oligosacáridos que contienen azúcares nitrogenados, como la N-acetilglucosamina.
- 3.- Oligosacáridos que contienen ácido neuroamínico a

lactominico que en su forma acétilada con el nitrógeno o el oxígeno, recibe el ácido del ácido sialico, por ejemplo, el N-acéteurámico. Vorob'eva et al. 1965.

### 2.2.2 Lípidos.

Estos constituyen practicamente la totalidad de la leche, casi todos los lípidos de la leche se encuentran en forma de pequeños glóbulos con un rango de tamaño aproximado que va desde .1 - 20 micras de diámetro, según la raza de vaca.

Se puede apreciar que todos los lípidos de la leche están distribuidos físicamente entre el glóbulo de grasa y su correspondiente membrana. Badui 1981.

Los lípidos de la leche se pueden clasificar en tres grupos:

- 1.- La materia grasa propiamente dicha, es decir, los triglicéridos que constituyen el 98% del total de los lípidos.
- 2.- Los fosfolípidos insaponificables o grasas fosforadas que constituyen aproximadamente del .5 - 1 %.
- 3.- Otras sustancias insaponificables diferentes de los precedentes desde el punto de vista químico, pero insoluble esta se encuentra alrededor del 1%.

Las sustancias de los últimos grupos a pesar de que están en pequeñas cantidades, tienen una gran importancia en lo que respecta a las propiedades físicas (fosfolípidos) y biológicas (sustancias insaponificables) de las grasas de la leche.

Los glóbulos son muy inestables y es fácil extraerlos sin

modificar los demas componentes de la leche.

Una de la parte de la materia grasa se sintetiza en la glándula mamaria a partir de los ácidos volatiles, sobre todo en los ruminantes, el resto se forma a partir de los ácidos grasos que se encuentran en la sangre dentro de la categoria de lípidos tambien incluidos en los fosfolipidos, los esteroides, los pigmentos, las vitaminas liposoluble A, D, E y K. y otras sustancias en concentraciones muy bajas. Alais 1970, Badui Dergal S. 1981, Perez Jorge y Pablo 1984, Santos M. Armando 1990.

### 2.2.3 Proteínas.

Las sustancias nitrogenadas (proteínas y sustancias nitrogenadas no proteicas) constituyen la parte más compleja de la leche, las sustancias nitrogenadas no proteicas se encuentran en pequeñas cantidades (1.6 g/l). Estas se caracterizan por un elevado peso molecula, comprendido entre 15000 y 20000, y muchos de estos compuestos tienen pesos inferiores a 500 que son dializables y permanecen en solución cuando las proteínas floculan entre ellas se encuentran aminoácidos libres, urea, creatina, nucleotidos y vitaminas, las anteriores no atraviezan las membranas dializables y se precipitan facilmente en solución por diversos reactivos, especificamente los ácidos tricloroaceticos y fosfofúngistico asi como las sales minerales a concentraciones elevadas.

En la leche, las proteínas corresponden al 95% del total de las sustancias nitrogenadas.



El contenido de proteínas en la leche depende de muchos factores fisiológicos y bioquímicos; varía entre 3.32 y 3.39 % según la raza.

Desde el punto de vista nutricional, las proteínas de la leche pueden compararse con otras fuentes, como son la fracción 75 de soya y la ovomucina del huevo.

Las sustancias proteicas de la leche pueden clasificarse así:

1.- Caseína entera: Es un complejo de proteínas fosforadas y constituye la parte más característica de la leche. Esta se precipita solo cuando la leche se acidifica hasta un 4.6 a 20°C cuando se encuentra bajo la acción de una enzima específica; El cuajo. por ello se le ha llamado "proteína insoluble".

Son polipeptidos sintetizados en la glándula mamaria. La estabilidad de la caseína se altera fácilmente a valores de Ph bajo y por la presencia de cationes divalentes.

Las proteínas fosfóricas constituyen aproximadamente 85-90% del total de la caseína entera, existen tres clases a las que pueden añadirse un grupo de compuestos menores no muy difundidos.

- |                          |   |                      |
|--------------------------|---|----------------------|
| 1. - Caseína $\alpha$    | } | sensibles al calcio  |
| 2. - Caseína $\beta$     |   |                      |
| 3. - Caseína $\kappa$    |   | insensible al calcio |
| 4. - Componentes menores |   |                      |

2.- Las proteínas del lactosuero o proteínas solubles: Se

trata de una mezcla de holoproteínas (que no contienen más que aminoácidos) y de glucoproteínas (que contienen también glúcocidos). Son compactas y globulares con un peso molecular que varía desde 14000 a 1000000 daltones; son solubles en un intervalo de Ph muy amplio y es estado nativo no se asocia con la proteínas.

Estas se insolubilizan por el calor antes de 100°C. Estas son un conjunto de sustancias nitrogenadas que no floculan cuando el Ph de la leche se lleva a 4.6, por eso se le llama proteína soluble.

Con la exepción de las proteasas-peptonas, no contienen fosforo, se sintetizan en la mama y las que provienen del torrente sanguineo estan en muy pequeñas cantidades (.6-.8 g/l en la leche de vaca).

Estas proteías se encuentran en el lactosuero que se separa del coágulo que se obtiene al añadir la quimosina es segregada cuando el animal se alimenta exclusivamente por la leche y se detiene al alimentarse con solidos y es reemplazada por la pepsina, y constituye el 17% del total de las proteínas de la leche de vaca.

Principales proteínas que constituyen el lactosuero:

$\beta$ -lactoglobulina

$\alpha$ -lactoalbumina

Inmunoglobulina

Seroalbumina

Proteosa-peptona

Proteinas menores

Con la excepción de la seroalbumina y de la inmunoglobulina que se sintetiza en la glanddula mamaria.

Otras proteínas y proteínas menores: En este grupo se incluyen algunas proteínas que son difíciles de clasificar, en ellas se encuentran las trasferricas o proteínas rojas, las lactolinas y las proteínas de la membrana del glóbulo de grasa, en conjunto, representan aproximadamente del 5% de las proteínas del lactosuero.

3.-Las proteosas-peptonas son sustancias que con un volumen molecular intermedio entre el de las proteínas y el de los peptidos y en la leche abunda poco. Alais 1970, Badui Dergal S. 1981, Perez Jorge y Pablo 1984, Santos M. Armando 1990.

#### 2.2.4 Enzimas.

La leche contiene varias enzimas relacionadas con el grupo de las albuminas, con las cuales generalmente precipitan. Algunas de estas enzimas se concentran en la membrana de los glóbulos de la grasa, por lo tanto son arrastradas por la crema; entre ellas estan las reductasas aldehydicas, las fosfatasas, etc.

Otras precipitan con las caseínas a Ph de 4.6, por ejemplo las proteasas, catalasas, etc.

Algunas veces es difícil determinar el origen de las enzimas, ya que las bacterias que se encuentran por lo común en la leche, producen enzimas semejantes a las que se sintetiza en las glándulas mamárias.

La actividad enzimática de la leche depende del Ph y de la temperatura, la elevación de la temperatura a más de 70°C provoca su destrucción.

Estas están unidas a las micelas de caseína, la membrana del glóbulo de grasa o en forma libre de el suero.

Las enzimas de mayor importancia comercial son las siguientes:

Fosfatasa: Que se usa como índice de pasteurización.

Lipasa: Que causa las reacciones de rancidez hidrolítica.

Catalasa: Indica el índice de mastitis.

Proteasa: Causa inestabilidad del sistema proteico en productos lácteos almacenados a largo tiempo.

Enzimas oxido-reductasa : -Lactoperoxidasa.

-Reductasa-aldehídica.

-Catalasa.

Enzimas hidrolíticas: -Lipasa.

-Fosfatasa.

-Proteasa.

-Amilasa.

-Lisozimas

Alais 1970, Badui Dergal S. 1981, Perez Jorge y Pablo 1984,

Santos M. Armando 1990.

### 2.2.5 Vitaminas.

La leche figura entre los alimentos que contienen la variedad más completa de vitaminas, sin embargo, estas se encuentran en pequeñas cantidades.

Las vitaminas liposolubles A, D y E van asociadas a la materia grasa, por esta razón se encuentran en la crema y en la mantequilla tras el desnatado y no hay en la leche descremada ni en el lactosuero.

Las vitaminas hidrosoluble se encuentran en la leche desnatada y en el lactosuero la riqueza de la leche en estas vitaminas depende poco de los factores externos y por eso su contenido varia relativamente poco. El grupo de estas vitaminas esta integrado por complejos B, vitamina PP, vitamina C. Alais 1970, Badui Dergal S. 1981, Perez Jorge y Pablo 1984, Santos M. Armando 1990.

#### 2.2.6 Mimerales.

Las materias minerales se encuentran en todas las leches en una proporción que varia desde 3 a 10 g por litro, por lo tanto, de una fracción pequeña en relación a las tres precedentes: lípidos, glucócidos y protidos.

El contenido de minerales varia poco según la raza y la alimentación del animal durante la lactación (.68-.74%).

Otros componentes no proteícos que tienen importancia capital de los fenómenos de estabilización y coagulación es el calcio y como los citratos, cloruros y fosfatos.

En la leche de vaca, casi el  $\frac{2}{3}$  partes del total del calcio es coloidal, en su mayoría formando complejos de calcio y fosfatos con las caseínas.

La relación de concentraciones de las sales desempeñan un papel de estabilidad térmica de los productos lácticos de tal forma que los iones de calcio y magnesio tienden a inestabilizar

el sistema proteico, mientras que los citratos y el fósforo lo estabilizan.

Para que exista esta union hay una competencia del calcio y el magnesio por los sitios de union con las caseinas, para un Ph de 7.4 se encuentra de 3 a 4 moles de calcio y 2 moles de magnesio unidas por un mol de caseina a concentraciones de calcio y magnesio tipicas de la leche.

Otros elementos que se encuentran en la leche son el aluminio, boro, cobre, yodo, flúor, hierro, manganeso, zinc y trazas de arsenico, cobalto y plomo. Alais 1970, Badui Dergal S. 1981, Perez, Jorge y Pablo 1984, Santos M. Armando 1990.

## 2.3 MICROORGANISMOS LACTICOS

### 2.3.1 INTRODUCCION

Las bacterias son de gran importancia para la fabricación de col agría, encurtidos y en la industria láctea son indispensables en la fabricación de leches fermentadas, quesos y mantequillas.

Estas bacterias están distribuidas, se ha 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. Demeter 1969.

La familia lactobacteriseae está formada por 5 generos, las bacterias esféricas incluidas en los géneros Streptococcus ( por ejemplo piogenicos, viridians o termophilo, lactis). Enterococos y Leuconostoc y las bacilares incluidas en Lactobacillus ( por

ejemplo thermobacterium, steptobacterium, betabacterium, bifidobacterium ), Microbacterium y Propionibacterium. Alais 1970, Foster et. al. 1965, Frazier W. C. 1957.

CUADRO No. 1.

FAMILIA LACTOBACTERISEAE:

COCOS : Streptococos: Grupo pyogenes: Str. pyogenes  
Str. agalacticea  
 Grupo Viridians: Str. termophilus  
Str. bovis  
 Grupo lactis: Str. lactis  
Str. cremoris  
Str. diacetylactis  
 Grupo entereococos: Str. fecalis  
Str. liquefaciens  
Str. zymogenes  
Str. durans

Leuconostoc: L. mesenteroides  
L. dextranicum  
L. citovororum

BASILOS: Lactobacilos: Grupo Thermobacterium:

L. bulgaricus  
L. iughurtii  
L. helveticus  
L. lactis  
L. acidophilus  
L. delbrekii

Grupo Streptobacterium:

L. casei  
L. plantarum

Grupo Betabacterium:

L. brevis  
L. fermenti

Grupo Bifidobacterium:

L. bifidus

Microbacterium: M. lacticum

Propionibacterias: P. shermanii

Alais 1970, Demeter 1969, Foster et. al. 1957, Frazier 1965, Rogosa y Sharpe 1960, Kroger 1989.

Las bacterias de interes lactologico más importante se agrupa en la familia Lactobacteriseae, la importancia práctica de las bacterias pertenecientes a esta familia es considerable por varias razones: la producción de ácido y el descenso de Ph, lo que da por resultado a la inhibición de las bacterias de la putrefacción en medio ácido, un establecimiento de las condiciones fisico-químicas favorables a diversas trasformaciones en la industria láctea.

CUADRO No. 2. CARACTERISTICAS PRINCIPALES DE LAS BACTERIAS ACIDOLACTICAS. ( Alais 1970)

FAMILIA.	Lactobactericeae.
MORFOLOGIA.	Bacilos. Cocos grandes o pequeños.
MOVILIDAD.	Negativo.
CRECIMIENTO EN PRECENCIA DE O <sub>2</sub> LIBRE.	-Microaerofilicos.
REACCION DE GRAM.	Positiva.
PRUEVA DE CATALASA.	Negativa.
NECESIDADES NUTRICIONALES.	Vitaminas. Aminoácidos o péptidos. Carbohidratos fermentables.
TIPO DE FERMENTACIONES.	Homofermentativas. ácido láctico heterofermentativas. ácido láctico mas otros productos.
GRUPO DE ESPECIES RELACIONADAS	Leuconostoc. Lactobacilus. Streptococcus. Microbacterium. Propionibacterium.

Las bacterias lácticas utilizadas son mesófilas o térmofilas, terminos que indican sus temperaturas óptimas de crecimiento, las cuales oscilan entre los 22°- y los 40°C, respectivamente.



Ademas estas bacterias pueden presentar otros efectos útiles o perjudiciales como son la producción de una enzima que interviene en la degradación de las proteínas, en especial la caseína en el curso de la maduración de los quesos, así como una valoración microbiológica de las vitaminas y aminoácidos aprovechando las exigencias nutritivas de las bacterias lácticas. Alais 1970.

Las bacterias lácticas son anaerobias facultativas o microaerofilicas, dan poco crecimiento en la superficie de los medios.

Las necesidades de nutrición de este grupo son complejas, el medio debe de aportar una mezcla compleja de aminoácidos y factores de crecimiento, especialmente de vitamina B, los disacaridos (lactosa, sacarosa, maltosa) son mejores alimentos que las hexosas (glucosa, fructuosa, galactosa) los azúcares se transforman en ácido láctico en una concentración igual o mayor al 90%, por lo que la acción de las bacterias lácticas "homofermentativas" (solo producen ácido láctico) y al 50% para las determinadas "heterofermentativas" forman ademas CO<sub>2</sub>, 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. Demeter 1969.

Los fermentos no deben considerarse simplemente como un medio de aporte de ácido láctico, sino que constituyen una fuente de bacterias activas, capaces de multiplicarse en el seno de la

leche, de la cuajada o de la crema, y de producir, en el momento favorable de acidez y de aroma deseado. Alais 1970

La fermentación es uno de los métodos de prevención de alimentos, a través de los años este método ha sido envuelto dentro de un sofisticado arte, la leche puede ser fermentada por bacterias, levaduras y hongos, para producir una gran variedad de productos como el yoghurt, queso, leche agria, crema agria, mantequilla, etc.

Los cambios fisicoquímicos son manifestados con propiedades tales como sabor, textura y valor nutritivo. Kilara A. 1978.

2.3.2 Streptococcus : Esta especie contribuye habitualmente la flora dominante de la leche, al crema y de los quesos frescos. Podemos decir que no existe leche cruda sin estreptococos. Es necesario resaltar que en el mantenimiento de la leche a baja temperatura destaca la proporción de los estreptococos frente a la microflora gram negativa de la contaminación, Alais 1970.

Algunos estreptococos en medio gelosado, las células adoptan una forma ligeramente alargada, que pudiera presentar confusión.

Con respecto a los lactobacilos, los estreptococos se distinguen por una acidificación más moderada de la leche (del .5 - 1 % de ácido láctico para especie homofermentativa).

Pertenecen al grupo D biológicamente estreptococci , es inhibido por un Ph de 9.6. El óptimo de temperatura es de 50°C., es usado como un iniciador del queso suizo, es usado en el laboratorio para la detección de penicilina en la leche. grupo

serologico no agrupada, grupo fisiologico viridians. Collins 1967.

Son Cocos gram positivos, no crece a 10°C pero si a 45°C, no tolera las concentraciones de NaCl < 6.5%, no produce esporas, es termodurico, su actividad de agua es de .92 - .98. Banwart. G. 1989, Kosikowski 1970; Streit K. 1980.

Las bacterias de genero tienen varias características y funciones, estos organismos pueden estar divididas dentro de varios grupos, el de importancia en los alimentos son los estreptococos lacticos y enterococos.

Estos son celulas esféricas usualmente pequeñas de 1-2 mm de diametro, en pares o cadenas, estas son inmóviles, hay algunos anaerobios facultativos con metabolismo fermentativo y fermentando glucosa, primeramente por la via Hexosa difosfato por lo tanto son llamados homofermentativos, la actividad del agua .92- .98. Collins 1967, Banwart G. 1989.

2.3.3 leuconostoc : Betacocos o heterofermentativos de Orla-Jensen , semejantes a los estreptococos se diferencian netamente de los anteriores en el aspecto bioquimico, y merecen contruir un genero aparte, se caracterizan por unas dos especies pero no se conocen sus reacciones sereológicas.

L. citrovorum o L. cremoris , no coagula la leche, crece a temperaturas medias de 20 - 30°C y no es termoresistente. Alais 1970.

Este genero fue conocido anteriormente con el nombre de

Betacocos y su actual nombre generico se deriva del griego, en el que Leucus significa incoloro y nostoc se refiere a un genero de algas azulverdes encapsuladas.

Leuconostoc dextricum y Leuconostoc citrovorum son similares morfológicamente al alga azulverde Nostoc, pero carecen de los pigmentos fotosintetizadores propios de esta última.

Los leuconostoc son células esféricas que se encuentran en pares y cadenas, y se les puede considerar como estreptococos heterofermentantes.

No son particularmente activos en la leche y rara vez la coagulan, algunas no fermentan la lactosa.

Estas células son del mismo tamaño que los Streptococos Lactis, o con muy poca frecuencia, mas pequeñas.

Los leuconostoc son ejemplos de microorganismos que sirven para un fin útil en la industria lechera.

Las diferencias entre el Leuc. cremoris y Leuc. citrovorum son mínimas.

Los dos organismos son cocos gram positivos de  $.8 - 1.0 \mu$  son células esféricas o lenticulares aparecen en pares o cadenas para su óptimo crecimiento frecuentemente tiene complejos requerimiento de nutrientes tales como vitaminas, aminoácidos y carbohidratos fermentables, estas especies proliferan mejor entre  $25 - 30^{\circ}\text{C}$  y mas lentamente a  $8^{\circ}\text{C}$ , pero no a  $45^{\circ}\text{C}$  y por lo general no sobreviven a la pasteurización. La temperatura óptima varia mucho en cuanto a los autores y llega a oscilar entre  $12^{\circ}\text{C}$  y los  $45^{\circ}\text{C}$ . Park, et. al. 1967.

Los leuconostoc se encuentran en las hortalizas verdes, en raíces y también en la mantequilla, la crema agria y la leche. Leuconostoc dextricum se encuentran en los dos últimos productos mencionados, en los que raras veces se encuentra Leuconostoc citrovorum que se recupera más corrientemente en cultivos comerciales. Foster et. al. 1957.

Estos organismos son importantes en la fermentación en alimentos, no son patógenos.

Investigaciones ha sugerido tanto al L. cremoris; L. dextricum y L. mesenteroides corresponden a un solo ácido desoxiribonucleico (DNA) grupos homologos pueden ser considerados subespecies de leuc. mesenteroides. Actividad del agua .96 - .98. Banwart G. 1989, Hunncker and Person 1964; Kosikowski 1970; Streit K. 1980.

2.3.4 Propionibacterium : Estos organismos son esenciales para la fabricación del queso suizo, son organismos cocobacilares gram positivos, sin movilidad, no formadores de esporas, que fermentan el ácido láctico del queso, convirtiendolo en ácido propiónico.

Estos organismos esencialmente anaerobicos, para su óptima proliferación exigen complementos de extractos de levadura y compuestos fermentables del carbono, su temperatura óptima se de 30°C con una escala que va desde 15°- 45°C. El Hagakway et. al. 1957.

El propionibacterium shermanii es inhibido en presencia de .1 unidad de penicilina o de 5µg de estreptomycin por ml de leche.

En condiciones, las colonias son más grandes y forma de lente, estas se identifican por su producción de catalasa y su capacidad para fermentar azúcares, por lo general, la leche de tornasol se acidifica y a menudo se coagula. Foster et. al. 1957.

En 1966 se reporto una bacteria llamada Mycobact luteum y se hizo una comparación con el Propionibacterium shermanii y resulto ser muy parecida morfológicamente.

Esta muy estrecha la comparación de la composición de los nucleotidos de el DNA de las bacterias, conteniendo altos niveles de guanina y citosina. Vorob'eva et. al. 1966.

El efecto de las concentraciones de NaCl es de 10% a 6°- 8°C por 100 hrs. destruye por completo a la bacteria.

Se aislan del queso suizo o Emmenthaler, justificando la foramción de ojos en este queso. Inn H. L; Frederickson and tsuchinga. 1974.

## 2.4 MODIFICACIONES DE LA LECHE LLEVADA A CABO POR LOS MICROORGANISMOS

### 2.4.1 INTRODUCCION.

Los tres mayores constituyentes de la leche -proteínas, lactosa y lípidos - son modificados en varios grados dependiendo del producto, y los resultados son manifestados en las alteraciones del sabor, textura, apariencia y valor nutritivo.

Tan temprano como en 1914, hubo una hipótesis en la que los estreptococos causan proteolisis en el queso.

Esta hipótesis fue verificada después por la inoculación aséptica en la cuajada con cepas sencillas de estreptococcus y se observó en los resultados, incrementos en nitrógeno no proteico.

En un tiempo después fue observado que en general, las bacterias pueden ser proteolíticas.

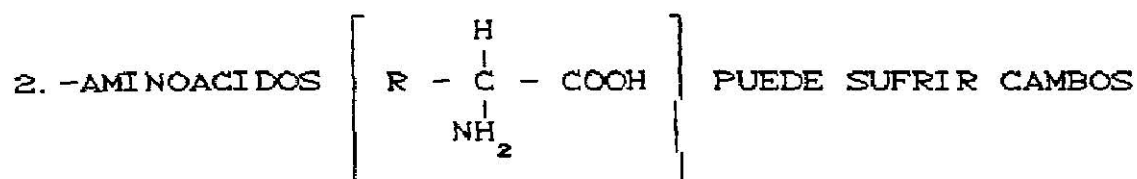
Por ejemplo los lactobacilos fueron más proteolíticos que los estreptococos, la variación en la actividad proteolítica fue observada entre las diferentes cepas de las siguientes especies, y esta puede engrandecerse.

Las enzimas intracelulares se ponen en libertad solo cuando las células de las bacterias se autolizan.

Los cultivos iniciadores son necesarios para dar sabor apropiado en el desarrollo del queso.

Las proteínas son degradadas por proteasas microbiológicas para producir péptidos y aminoácidos. Estos aminoácidos experimentan una variedad de cambios, tales como alteraciones en la cadena, descarboxilación, trasaminación y desaminación en la cadena a  $\alpha$ -cetoácido.

1. - PROTEINAS PROTEASAS → PEPTIDOS + AMINOACIDOS



A. -ALTERACION EN LUGARES DE LA CADENA

TRIPTOFANO → INDOL

B. - DESACRBOXILACION

LISINA → CADAVERINA

C. - TRASAMINACION A  $\alpha$ -CETOACIDOS

ASPARATO → OXALACETATO

D. - DESAMINACION OXIDATIVA A  $\alpha$ -CETOÁCIDOS

GLUTAMATO →  $\alpha$ -CETOGLUTAMATO

3. - AMINACIDOS Rx. NO ENZIMATICAS → COMPONENTES DE SABOR

FIGURA No 2. MECANISMOS PARA LA DEGRADACION DE PROTEINAS. (Kilara A. 1978)

Adicionalmente los aminoácidos podran estar dentro de las reacciones de obscurecimiento no enzimatico con azúcar y producción de componentes de sabor.

En un producto aceptable, una porción de la lactosa en la leche es metabolizada por los microorganismos para producir acidificación pero la mayor parte de la lactosa es perdida por estar en el suero.

En otros productos con cultivos como el yoghurt, crema agria y suero de leche, la degradación de la lactosa tiende a eleverse



para una gran variedad de componentes de sabor tales como el diacetilo y acetaldehído.

Una significativa cantidad de lactosa permanece intacta en los productos, es degradativa para los citratos y lactosa a través de el intermediario común, el piruvato.

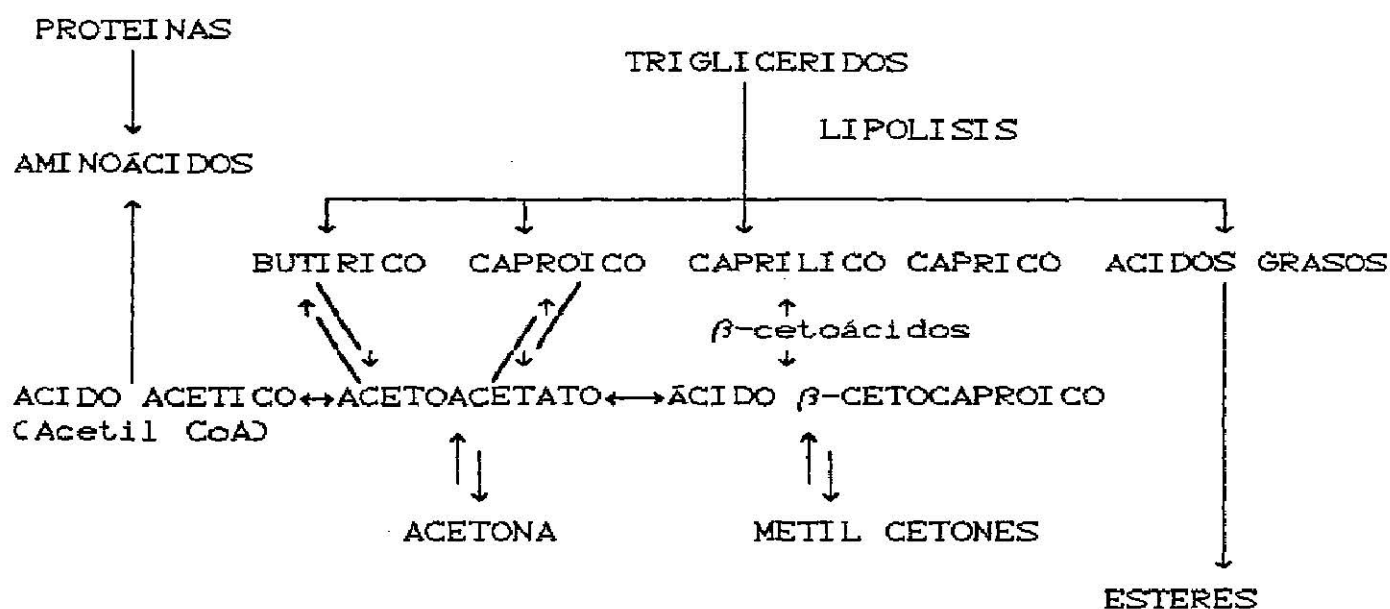


FIGURA No. 3. MECANISMOS DE LA DEGRADACION DE LIPIOS. (Skilara A. 1978)

Los organismos homofermentativos producen 1.8 moles de ácido láctico por mol de glucosa, más de la glucosa utilizada es convertida a ácido láctico.

La producción homofermentativa produce productos tales como etanol, acetato, glicerol, manitol y dióxido de carbono.

El acetaldehído, el sabor es comunmente importante en el yoghurt, resulta de descomponerse el piruvato por las bacterias.

La conversión de la tiamina a acetaldehído es una vía de una reacción secuencial involucrando la enzima timidina fosforilasa,

deoxyriboldasa y deoxiribomutasa.

La producción de diacetilo, es de importancia en el sabor de la mantequilla, crema agria, y el suero de leche.

El exceso de piruvato es toxico para la bacterias, así como las bacterias convierten ese exceso de piruvato en componentes no toxicos tales como el diacetilo y la acetoína.

Esta desintoxicación en proceso ocurre en una via de dos propuestos metodos.

En el primer metodo, el organismo convierte  $\alpha$ -acetolacto a valina y ácido pantoteonico, el ácido pantoteonico es convertido a CoA con la participación en la formación de diacetilo.

En este grupo de organismos, la valina y el pantoteanato son sintetizados para producir acetil CoA.

Recapturando la lactosa es usada para producir piruvato y lactato ambos de los cuales pueden ser usados para producir acetaldehído y acetoína.

La producción de ácido láctico no solamente contribuye al sabor tambien causa en la leche la coagulación y cambios en su estructura; la conversión de la leche líquida a leche solida como la cuajada y el liquido en suero. La lipólisis es importante en algunos productos lácteos, la lipólisis extensiva de la leche sigue despues de la salida del sabor y es no desable, por lo tanto, por la lipólisis parcial de grasa de mantequilla bajo cuidadoso control de condiciones, las concentraciones de sabor de la mantequilla puede ser producida con el aumento del sabor de los alimentos.

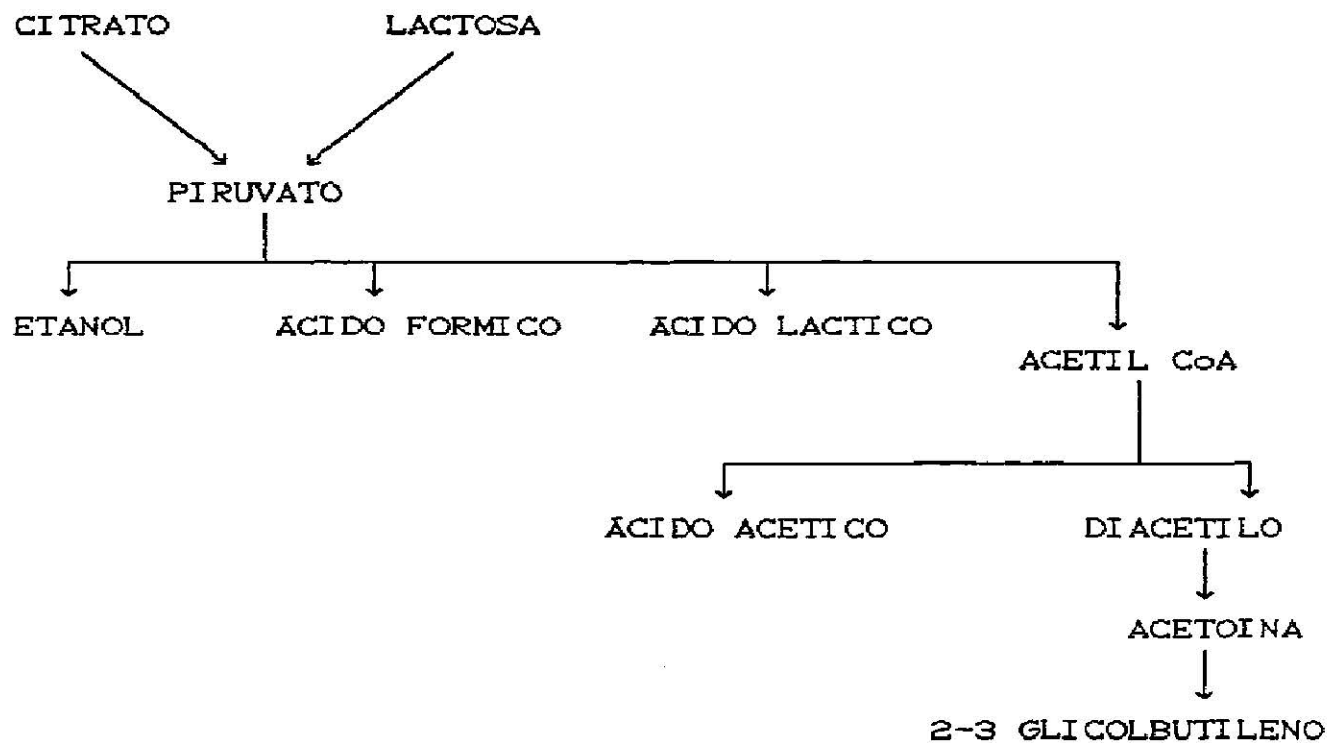
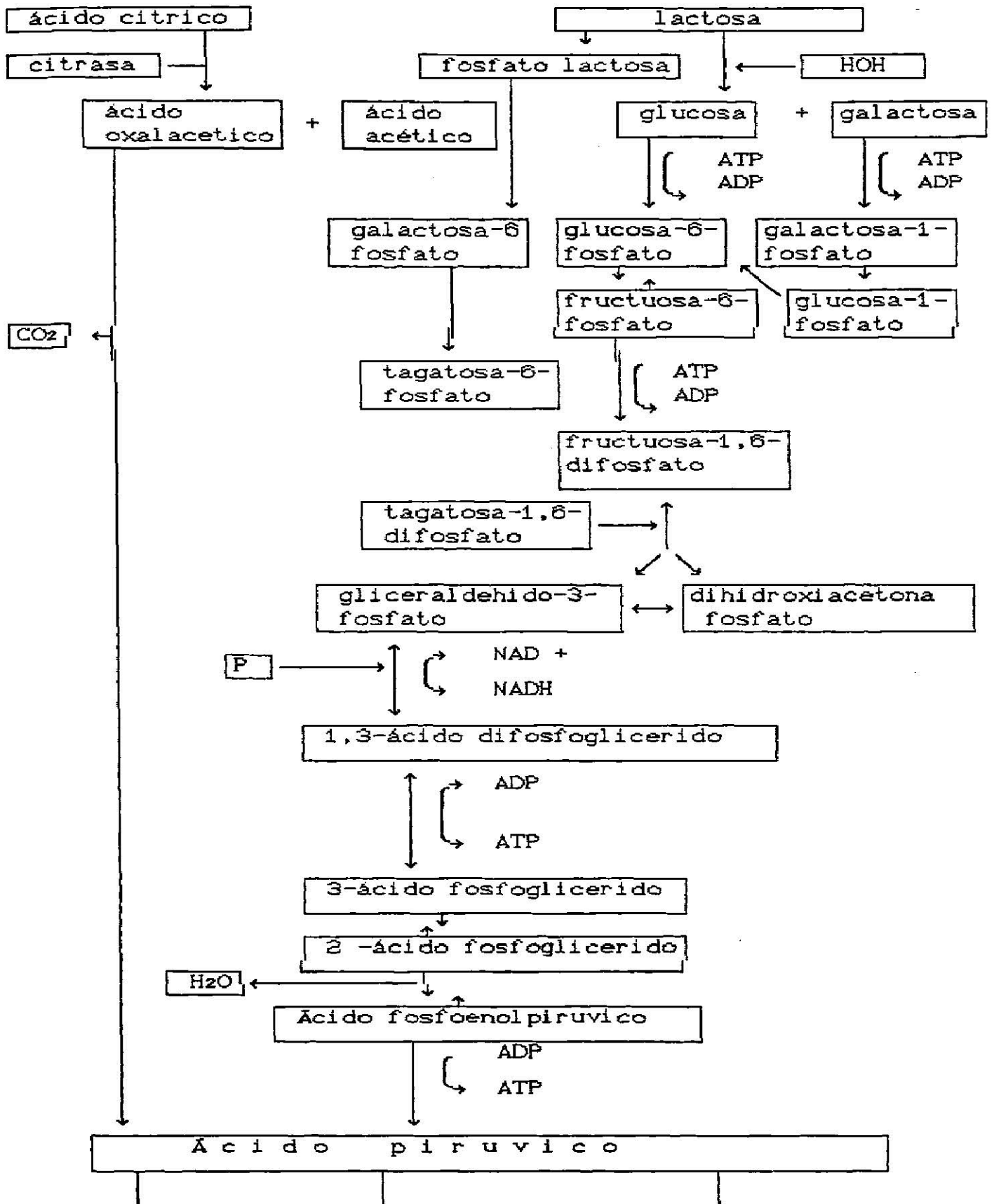


FIGURA No. 4. UTILIZACION DEL CITRATO Y LACTOSA POR STREPTOCOCCUS LACTICOS PARA PRODUCIR IMPACTOS SOBRE LOS COMPONENTES DE SABOR. (Kilara A. 1978)

Entonces, las proteínas, lactosa y grasas pueden ser modificadas por las enzimas microbianas a inducir cambios en sabor, textura, y apariencia de los productos lácteos.

Si los microorganismos lácteos aquí no se usaron en tales productos, la textura y apariencia podrían ser modificadas por otras maneras, pero el sabor de la producción de productos no será la adecuada. Kilara A. y Shahani 1978.

2.4.2 Streptococcus thermophilus: La fermentación de carbohidratos a ácidos lácticos es deseable en queso, cultivos de leche y col agria pero es indeseable en leches frescas, pueden utilizar azúcar en la fermentación de alcohol, otras pueden utilizar el ácido cítrico y tomar acetoina y diacetilo.



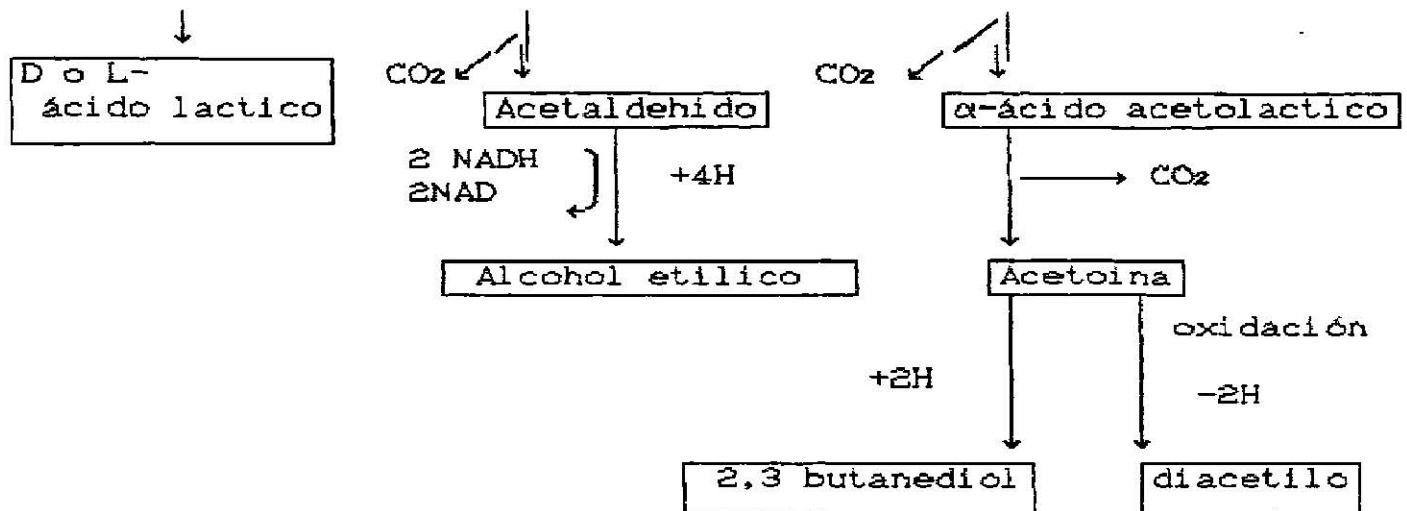


FIGURA No. 5. FORMACION DE ACIDO LACTICO Y OTROS METABOLISMOS EN LECHE POR CULTIVOS LACTICOS. Banwart B. 1989.

En los enterococos y las bacterias lácticas la identificación se hace mediante la fermentación de carbohidratos.

La no habilidad para fermentar maltosa es una característica para distinguir a los *Streptococcus cremoris* de otro del grupo de estreptococos N, otros azúcares para la fermentación que se usan para el diagnóstico como valores son el manitol, arabinosa, malobiosa, melezitosa, trehalosa y sucrosa. Collins, 1967.

Esta bacteria pertenece a la familia lacterobactericeae donde hay unas que fermentan la lactosa dando una proporción elevada de ácido láctico en los productos de degradación y que solo son débilmente proteolíticas.

Estas se distinguen por una acidificación más moderada de la leche (del 0.5 al 1% de ácido láctico para las homofermentativas) aunque la producción de ácido láctico se inicia a mayor velocidad. Alais 1970.

Se han puesto a prueba el uso de la galactosa para ver el

crecimiento de Streptococcus thermophilus, se pusieron 11% de leche seca reconstruida con nada de grasa para poder agregarle 5% de galactosa. El resultado fue que presentaron una gran fase logaritmica de aproximadamente 1-2 horas, incrementando así los tiempos de generación 7 -10 minutos, estos fueron para comprobar un incremento al adicionar la galactosa.

La acumulación de azúcar después puede provocar que no sea así cuando se adiciona galactosa a el sistema.

Estos resultados sugirieron que la galactosa extracelular puede ser inhibidora para Streptococcus thermophilus por interferir con el transporte de la lactosa dentro de la célula. Hutkins. R. Morris y McKay 1980.

La fermentación de la galactosa ( galactosa positiva) por cepas de Streptococcus thermophilus solas y combinadas con la galactosa negativa y cepas de Lactobacilos bulgaricus, fueron utilizados como cultivos en la manufacturación del queso suizo, mozzarella.

El Streptococcus thermophilus solo contenia un gran número de galactosa (26-28  $\mu\text{mol/g}$  de cuajada), 28 horas después se comparó con el control del queso suizo ( <2  $\mu\text{mol/g}$ ) hecho de la fermentación de no galactosa con cepas de Streptococcus thermophilus y la galactosa positiva de Lactobacilos bulgaricus.

Los resultados indican que la fermentación de galactosa por Streptococcus thermophilus puede tener un poder limitado como una cepa de cultivo en el queso suizo, y que puede ser usada con la

combinación de la galactosa-positiva. Hutkins R, Halambeck y Morris 1986.

Determinar el mecanismo por el cual influye el crecimiento del Streptococcus thermophilus con la galactosa el crecimiento en la lactosa, se hace para conservar energía en los requerimientos del proceso .

Con la galactosa negativa y las células en un medio selectivo que contiene glucosa como una sola fuente de energía ayuda al crecimiento molar, que son alrededor de 19 g de peso seco de células por mol de azúcar consumido.

En contraste, el crecimiento en lactosa dieron valores de 45, los cuales son solamente 50% de el carbono lactosa que han sido utilizados, indicando que la galactosa puede ser electrogenerico, los resultados muestran que la hipótesis de la galactosa negativa fluye para el Streptococcus termophilus es electrogenerico y puede juntar la generación de la fuerza motivada por las proteínas. Ponne C. y Hutkins R. 1980.

En detención de enzimas se hizo una caracterización para la  $\beta$ -galactosidasa en un gel característico para promover el uso de clones y vectoriales y la construcción de cepas para la sobreproducción de la enzima para la aplicación relacionada con los alimentos. Shroeder y Mckay 1988.

Para producir ácido por Streptococcus termophilus, e incrementar este se investigó poniendo a prueba exógenos  $\beta$ -galactosidasa, se pudo trabajar con cepas aisladas de diferentes

quesos Cheddar, una cosa que se comprueba es que el calor no afecta la producción de ácido pero si inactiva la  $\beta$ -galactosidasa. Woodard J. R.; Gilliland y Speck 1970.

2.4.3 Streptococcus diacetylactis : Se caracteriza por la producción de acetoina a partir de los citratos (y no de los azúcares). Alais 1970.

El Streptococcus diacetylactis convierte la acetina via piruvato, la eficiente conversión de citrato a acetoina por el Strep. diacetylactis. sugiere que este organismo podrá ser utilizado para detectar los residuos de citratos en el medio bacteriologico despues del crecimiento de estas bacterias ácido lácticas. Garvie, Bellen I. 1967.

Es requerimiento específico el citrato como prepulsor de acetoina y acetona por microorganismos productores de diacetil y acetoina, tambien de cantidades de toxinas formando piruvato por las celulas con una fuente de energia tal como la lactosa.

Bajo condiciones en las cuales los organismos crecen en presencia de las fuentes normales de carbohidratos, el piruvato puede ser convertido en ácido láctico regenerando dinucleotidos adenina nicotimidina (DNA), por reducción del DNA, los cuales son formados durante el rompimiento de azúcar por el piruvato, por lo tanto, producir diacetilo por los microorganismos muestra el exceso de piruvato.

La primera enzima inducida es la citrasa, en el metabolismo del citrato es primero envuelta y llevada al citrato dentro de la célula.



Una vez dentro de la célula, el citrato es desdoblado oportunamente por oxalacetato y acetato por la enzima citrasa.

El óptimo Ph para la actividad de la citrasa es de 7.4-7.6, en la adición de la citrasa, el extracto de célula libres de Strp. diacetylactis conteniendo oxalacetato descarboxilasa, los cuales son los responsables de la conversión de oxalacetato a piruvato. Kempler y Mackay 1981.

Además hay cuatro enzimas de metabolismo del citrato que son citrato liasa, acetoacetato sintetasa, diacetilreductasa y acetoin reductasa.

Estas enzimas son importantes en la utilización de los componentes para dar características a través del metabolismo del citrato específicamente diacetilo, acetato y CO<sub>2</sub> que son los que determina el sabor de las muchas fermentaciones por los productos lácteos.

Esta bacteria no podría utilizar el citrato como una fuente de energía. Cogan T. 1981.

Se ha trabajado sobre cual azúcar es más energizante para la producción de acetona y diacetilo, para la determinación de la velocidad de formación situándose lo siguiente, primeramente, y en forma decendiente maltosa, galactosa, arabinosa, xilosa y lactosa. Speckman y Collins 1970.

2.4.4 Leuconostoc dextricum: Presenta el ácido láctico levógiro, fermenta las pentosas y descomponen pectinas, puede presentar una fermentación viscosa con la sacarosa y producción de

musilago. Alais 1970.

El leuconostoc produce, etanol, bioxido de carbono y ácido láctico DL, L(+) y D(-), partiendo de carbohidratos fermentables.

Con la glucosa, produce ácido, pero no con la xilosa, el manitol, ni con el sorbitol y tampoco convierte la arginina en amoníaco, habiendo algunas cepas que no fermentanr la lactosa en algun grado apreciable.

El ácido cítrico se fermenta produciendo acetoina, diacetilo, 2-3 butilenoglicol, ácido acético y bioxido de carbono.

El Leuconostoc dextranicum, produce ácido en la leche de tornasol, la más importante de las sustancias aromáticas es el diacetilo, se obtiene abundante producción de sustancias aromaticas cuando el Ph es bajo (4.4 - 3.7) y las circunstancias son aerobicas. Foster et. al. 1957.

El leuconsostoc para los productos lacteos es el Leuconostoc dextranicum para su clasificación de este género depende grandemente en la producción de dextrano, aroma, y la formación de ácido a partir de aravinosa y xilosa. Shin C. y Sato Y. 1980.

Con la incorporación del citrato como sodio, tiende a ser más rápida la producción de diacetilo con la acidificación de la leche, a un Ph de 4.5 con ácido cítrico.

La producción de diacetilo fue más rápida cuando la leche se acidificó por las células creciendo en el medio manteniendose a un Ph de 5.5 y en el cual crecé a 6.0 y 6.5. Gilliland S. E. et. al. 1970.

Se han hecho estudios sobre la lactosa utilizada

genéticamente por el Leuconostoc y se examinó proteólisis, aldosa,  $\beta$ -galactosidasa, fosfo- $\beta$ -galactosidasa, ácido y diacetilo como productos de la leche. Mahmud y Sandine 1988.

Todas las especies tienen en común; descomponer alrededor de 25% de los carbohidratos fermentables en CO<sub>2</sub>, además del ácido láctico levógiro, generan también notables cantidades de ácido acético y algo de alcohol, el tipo de fermentación es heterofermentativa, la formación de aroma se produce al pasar de la acetoina a diacetilo. Demeter 1969.

A un Ph de 6.7 - 7.0 produce de 5 - 10 % de CO<sub>2</sub> agregando dextrosa o sucrosa al medio. Collins 1967.

La producción de diacetilo, fermentación de carbohidratos y la producción de dextrano en el medio de 5% con sucrosa, son pruebas para diferenciar cepas y otras especies. Gibbs, B. M. 1966.

2.4.5 Propionibacterium shermanii : La formación de los "ojos" en algunos de los quesos de pasta cocida (Emmentaler, Gruyere); es el resultado de la fermentación propiónica a expensas de los lactatos con formación de CO<sub>2</sub>, de 10°-12°C se pasa a una temperatura mayor.

El contenido de CO<sub>2</sub> de la atmósfera de la cava tiene mucha influencia. Alais 1970, Foster et. al. 1965.

Durante la fermentación, las propionibacterias producen ácido propiónico, ácido acético, CO<sub>2</sub> con pequeñas cantidades de otros ácidos orgánicos, que da características de sabor y "ojos" al queso.

La especie de las interes para la microbiología lactea es Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii, esta es usada para la manufactura del queso suizo.

Esta bacteria sintetiza grandes cantidades de vitamina B<sub>12</sub> y la producción de ácido propiónico y puede usarse comercialmente para la producción de estos componentes. Banwart G. 1989.

El crecimiento en diferentes medios producen dimetilsulfito (MezS) para esta producción no pueden fermentar D- O L- metionina, D- o L- cisteina, cistionina o  $\beta$ -dimetilpropioletin cloro o el medio lactato de sodio, en esto elementos si crecen los microorganismos, pero no aumentan la producción de MezS. Dystra, et. al. 1970.

Cantidades importantes de prolina son las que contiene el queso suizo , más que en cualquier otro queso, y algunas veces el sabor dulce del queso suizo es esta relacionado con el contenido de prolina.

La prolina puede ser producida a traves de tres vias por las propionibacterias : proteolisis general, hidrolisis de la prolina conteniendo peptidos por peptidasas y biosíntesis de la prolina. Langsrud T et. al. 1977.

### III MATERIALES Y METODOS

Este trabajó se realizó en las instalaciones de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autonoma de Nuevo León (F.A.U.A.N.L.) La cual esta ubicada en la carretera a Marin kilometro 17 y el trabajo fue realizado específicamente en el

laboratorio de pudrición texana ahora laboratorio de microbiología provisionalmente perteneciente al departamento de Industrias Alimentarias, y tuvo una duración aproximada de 9 meses.

Se utilizó material de vidrio, el cual consiste en vasos de precipitado de 250 ml, matraces Erlenmeyer de 250 ml, tubos de ensayo de 18x150, matraces modificados (matraces Erlenmeyer de 50 ml. ensamblado con un tubo de ensayo de 13x100), tubos de Durham, tubos de ensayo con rosca, matraces de 50 ml modificados, cajas de petri, portaobjetos y pipetas.

Material instrumental como termómetro, potenciómetro, espectrofotómetro speckman, dos incubadoras, autoclave, estufa, gradilla, balanza granatía y analítica, mechero de alcohol, azas de platino. cronómetro, microscopio, filtros desechables, jeringas desechables, algodón y gasas.

Reactivos indicador rojo de metilo, cristal violeta, alcohol al 95%, lugol, safranina, aceite de inmersión, buffer de fosfatos, buffer de ácido cítrico, agua oxigenada ( $H_2O_2$ ), solución de ácido clorhídrico al 0.1 M, solución de hidróxido de sodio al 0.1M,

Los azúcares como adonitol, arabinosa, celobiosa, galactosa, glucosa, inulina, lactosa, maltosa, manitol, manosa, melobiosa, trehalosa, rafinosa, ramnosa, sacarosa, sucrosa y xilosa.

### 3.1 AISLAMIENTO

Dentro de lo que respecta a los materiales se utilizaron diferentes medio de cultivo selectivo para las bacterias para su proliferación y la composición de cada uno de ellos se pondrá en seguida.

Composición del medio selectivo Agar Lactato segun Kurmann y modificado por Boyer y Dorner. Para propionibacterias.

Solución de lactato sódico al 60%	20cc.
Péptona Merck	30gr.
Extracto de levadura	10gr.
Agar nutritivo	10gr.
Agua destilada	1000cc.
Ph fijado en	7.3

Demeter 1969, Foster et. al 1965

Composición de Agar lactico para Streptococcus diacetylactis.

Triptona	2.00%
Extracto de levadura	0.50%
Gelatina	0.25%
Glucosa	0.50%
Lactosa	0.50%
Sacarosa	0.50%
NaCl	0.40%
Acetato sódico	0.15%
Ácido ascórbico	0.05%
Agar nutritivo	1.50%
Agua destilada	1000cc.
Ph fijado en	6.8

Demeter 1969

Composición del medio Hunter para Streptococcus thermophilus.

Extracto de levadura	200cc.
Fosfato disodico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	6gr.
Lactosa	20gr.
Péptona	10gr.
Extracto de carne	10gr.
Agua destilada	800cc.
Agar nutritivo	20gr.
Ph fijado en	6.3 - 6.8

Demeter 1969

Composición del medio Agar Calcio Citrato para Leuconostoc.

Tripton (Difco)	2.5gr.
Glucosa	5.0gr.
Lactosa	5.0gr.
NaCl	4.0gr.
Citrato trisódico 2H <sub>2</sub> O	2.0gr.
Lactato de Calcio 5H <sub>2</sub> O	8.0gr.
Agar nutritivo	15.0gr.
Agua destilada	1000cc.

Demeter 1969, Nickels 1966.

Se tomo muestra para cada bacteria para poder extraerla del material comercial para su formación en un medio artificial y se pusieron en varios para tomar la muestra primeramente se tomo una muestra de material y se coloco en agar nutritivo líquido y se comprobo si habia crecimiento, esto mismo se realizó con otra muestra pero con medio sólido también de agar nutritivo de ahí se toman muestras para verificar si eran las bacteras necesarias.

Otras maneras en que se probo esto fue hacerlo pero con agar selectivo líquido y sólido también comprobando crecimiento de bacterias.

Se ha comprobado que los streptococos pueden perder la capacidad de fermentar la lactosa tras varias resiembras porque las enzimas no forman parte probablemente del "stock" de enzimas constituyentes.

Se puede observar variaciones en la forma de las celulas que no son de importancia, y en algunas pueden presentar poliformismo.

Alais 1970.

Una vez realizado este trabajo se prosiguió a verificar en el microscopio por medio de la prueba de Gram basándose en la bibliografía.

Después se volvió a resembrar para poder aislar las bacterias lo más posible, una vez seleccionadas las colonias por su morfología (principalmente) se efectuaron más resiembras hasta obtener un cultivo lo más puro posible, y estos fueron guardados dentro del refrigerador a una temperatura menor de 10°C para su uso posterior.

### 3.2 IDENTIFICACION

Esta se realizo mediante pruebas bioquimicas previamente seleccionadas para cada una de las bacterias.

#### 3.2.1 Fermentación de azúcares.

Se necesito poner a los microorganismos de prueba en caldo nutritivo selectivo liquido lo cual se logra al quitar todos los agentes cuagulante para que los microorganismos crecieran libremente, se tomaron como muestra 10 ml de medio y agregando 0.5% del azúcar de prueba, se esterilizo el medio se le agrego el azúcar después de haber inoculado los tubos conteniendo en su interior un tubo de Durham para comprobar si habia producción de gas, por que estos azucares fueron esterilizados mediante filtros de membrana.

Posteriormente estos se pusieron en la incubadora por espacio de tres días con temperatura controlada tomando lectura cada día.



ademas de que al final del tercer día se le agregó a cada muestra cinco gotas de rojo de metilo como indicador para la verificación en la producción de ácido para lo cual, si presentaba color rojo era positivo y si presentaba color amarillo era negativo.y asi para cada uno de los tubos.

### 3.2.2 Prueba de la catalasa.

En un porta oobjetos con una azada con las bacterias que ya han sido utilizadas se les agrega unas gotas de agua oxigenada ( $H_2O_2$ ) una de las características de estas especies de bacterias son la producción de efervescencia lo cual indica positivo y si carece de esta será negativo.

### 3.2.3 Crecimiento en cloruro de sodio ( $NaCl$ ).

Se utilizan los mismos materiales solamente que aqui se le va agregando diferentes cantidades en concentración de sal que seran de 2%, 4%, 6% y 10%. después se incubaron a temperatura controlada por espacio de tres dias, se tomarona como signo de crecimiento si hay turbidez al trascurrir este tiempo.

## 3.3 DETERMINACION DE CONDICIONES OPTIMAS DE CRECIMIENTO.

Para este tipo de pruebas se requirio que las cepas estuvieran plenamente identificadas, se determinaran sus óptimos en cuanto a Ph y temperatura para posteriormente determinar los tiempos de generación.

Se inicio poniendo 8 ml de el medio líquido en matraces

modificados para poder leerse directamente sobre el espectrofotometro a este se le agrega 2ml de muestra.

Los medios con cultivos se preparan unos dias antes y de ahi se tomada la muestra.

El primer aspecto que se trato fue el de Ph utilizando un rango que va desde un valor de 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0. y para ello se utilizó un buffer de fosfatos a 0.01 M, (Luna Rangel 1982) que su Ph se encuentra al rededor de 7.0 ademas ajustando el Ph requerido con hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N, para elevar el Ph o agragarle Ácido Clorhídrico 0.1N, para bajar el Ph, esta se realiza tomando lectura antes y al finalizar de esterilizar el material esta por que se puede afectar su valor.

Despues de esto se pusieron en la incubadora a una temperatura de 37°C y una de 45°C dependiendo el caso, hasta alcanzar estabilidad en valores.

El otro aspecto que se reviso fue el de su temperatura la cual se tomaron valores con rangos que van desde 10°, 15°, 20°, 30°, 35°, 37°, 40°, 45°, y 60°C.

Aqui se tomaron las muestras con sus respectivos Ph ya ajustados y se tomó lecturas en el espectrofotometro, este estuvo ajustado a 660 nm de longitud de honda las horas son variables. Para la mayoria de las bacteras las lecturas se toman en el rango de 600-690. Clark Joan E. 1986, Cogan T. 1981, Cooper 1978, Hoferr, et. al. 1983.

Se hicieron tomas de lecturas cada media hora.

Ademas se utilizó la siguiente fórmula para determinar los tiempos de generación de cada prueba con cada bacteria:

$$K = \frac{1}{tg} = \frac{\text{Log}_{10} Af - \text{Log}_{10} Ao}{(tf-to) (0.301)}$$

Donde:

- tg Es la constante de la velocidad de crecimiento instantanea (tiempo de generación o duplicación).
- k Es la constante de crecimiento (numero de duplicaciones por minuto).
- Af Es la lectura de adsorvancia final del intervalo.
- Ao Es la lectura de adsorvancia inicial del intervalo.
- (tf-to) Es la diferencia de tiempo entre las dos lecturas.

Smith y Brock 1989.

#### IV RESULTADOS.

##### 4.1 AISLAMIENTO.

Los medios de cultivo resultaron ser eficientes en una medida en la cual se esperaba que crecieran notorias las colonias pero se esperaba ver colonias grandes pero resultaron ser medianas, ademas de que la bacteria con que más se batallo fue la de el Streptococcus thermophilus y que ciertamente la bibliografía lo marcaba con mucho tiempo de creciemnto en los medios artificiales.

## 4.2 IDENTIFICACION

En la fermentación de azúcares arrojó resultados positivos de los cuales las bacteras que supuestamente tenían que fermentar fue positiva en su mayoría y se comprobó que si eran fermentados, aclarando de que algunos de los azúcares y muchos de ellos no venían en la bibliografía consultada, presentaba un poco de turbidez como fue el caso de la celobiosa, en la prueba de acidez no se contaba con datos bibliográficos solo datos sacados por los efectos en productos lácteos.

CUADRO No. 3. Resultados del crecimiento en azúcares por Streptococcus termophilus.

AZUCAR	CRECIMIENTO			FERMENTACION			ACIDEZ		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
MALTOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANITOL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SUCROSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SACAROSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LACTOSA	+	+	+	-	-	-	+	-	-
XILOSA	-	-	+	-	-	+	-	-	-
TREHALOSA	±	±	-	-	+	-	-	-	-
MANOSA	±	±	±	-	-	-	-	-	-
GALACTOSA	±	±	±	-	-	-	-	-	-
GLUCOSA	+	+	+	-	+	-	-	-	-
RAMNOSA	±	±	±	-	-	-	-	-	-
ARAVINOSA	+	+	+	±	±	+	-	-	-
RAFINOSA	±	±	±	+	-	-	-	-	-
CELOBIOSA	±	±	±	-	-	-	-	-	-
MELOBIOSA	±	±	±	-	-	-	-	-	-
INULINA	±	±	±	-	±	-	-	-	-
ADONITOL	+	+	+	+	+	+	-	-	-

		CRECIMIENTO
CONCENTRACIONES DE NaCl a	2%	+
	4%	+
	6%	-
	10%	-
CATALASA	NEGATIVA	

CUADRO No. 4. Resultados del crecimiento en azúcares por Streptococcus diacetylactis.

AZUCAR	CRECIMIENTO			FERMENTACION			ACIDEZ		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
MALTOSA	+	+	+	+	+	+	-	-	-
MANITOL	±	±	±	-	-	-	-	-	-
SUCROSA	±	±	-	-	-	-	-	±	±
SACAROSA	-	-	±	-	-	-	-	±	-
LACTOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
XILOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TREHALOSA	±	±	±	-	-	-	+	-	-
MANOSA	+	+	+	+	+	+	+	-	+
GALACTOSA	+	+	+	-	+	-	+	-	-
GLUCOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAMNOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARAVINOSA	±	±	±	-	-	-	-	-	-
RAFINOSA	±	±	±	-	-	-	-	-	-
CELOBIOSA	±	±	±	-	-	-	-	-	-
MELOBIOSA	±	±	±	-	-	-	-	-	-
INULINA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADONITOL	+	+	+	+	+	+	-	-	-

	CRECIMIENTO
CONCENTRACIONES DE NaCl a 2%	+
4%	+
6%	-
10%	-
CATALASA	NEGATIVA.

CUADRO No. 5. Resultados del crecimiento en azúcares por Leuconostoc dextricum.

AZUCAR	CRECIMIENTO			FERMENTACION			ACIDEZ		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
MALTOSA	±	-	-	±	-	-	+	-	-
MANITOL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SUCROSA	±	±	±	-	-	-	-	-	-
SACAROSA	±	±	±	-	-	-	-	-	-
LACTOSA	±	±	-	-	+	-	-	-	-
XILOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TREHALOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MANOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GALACTOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLUCOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAMNOSA	±	±	±	-	-	-	-	-	-
ARAVINOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAFINOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CELOBIOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MELOBIOSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INULINA	±	-	-	-	-	-	-	-	-
ADONITOL	+	+	+	+	+	+	+	+	+

CONCENTRACIONES DE NaCl a

	CRECIMIENTO
2%	±
4%	±
6%	-
10%	-

CATALASA NEGATIVA.

CUADRO No. 6. Resultados del crecimiento en azúcares por Propionibacterium shermanii.

AZUCAR	CRECIMIENTO			FERMENTACION			ACIDEZ		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
MALTOSA	±	±	±	-	-	-	-	-	-
MANITOL	±	±	±	-	-	-	-	-	-
SUCROSA	-	±	-	-	-	-	-	-	-
SACAROSA	±	-	±	-	-	-	-	-	-
LACTOSA	+	+	+	-	-	-	+	+	+
XILOSA	±	±	-	-	-	-	-	-	-
TREHALOSA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MANOSA	+	+	+	-	-	-	+	+	+
GALACTOSA	+	+	+	-	-	-	+	+	+
GLUCOSA	+	+	+	-	-	-	+	+	+
RAMNOSA	-	±	-	-	-	-	-	-	-
ARAVINOSA	+	+	+	-	-	-	+	+	+
RAFINOSA	±	±	±	-	-	-	-	-	-
CELOBIOSA	+	+	+	-	-	-	+	+	+
MELOBIOSA	±	±	±	-	-	-	-	-	-
INULINA	±	±	±	-	-	-	-	-	-
ADONITOL	+	+	+	+	+	+	-	-	-

	CRECIMIENTO
CONCENTRACIONES DE NaCl a 2%	+
4%	+
6%	-
10%	-
CATALASA POSITIVA.	

En la prueba de la catalasa se presento una situación de la cual solamente una de las bacterias presentaba una catalasa positiva y esta era la pròpionica y resulto ser cierta para nuestro estudio, las demas como es esperaba fueron negativas.

Para la prueba donde se ponen en distintas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl) esta dentro de lo que marca la bibliografía.

#### 4.3 DETERMINACION DE CONDICIONES OPTIMAS DE CRECIMIENTO

Dentro de lo que fue las pruebas de condiciones optimas de crecimiento solo podemos decir que resultaron favorables, en ellas se conto con tiempos que resultaron ser grandes a lo que se esperaba.

Para las pruebas en las cuales se trabajo con las Ph solamente una de las bacterias resultó ser que crecia a menores valores de los que nos ponia en buffer de fosfato y asi que se utilizó otro buffer el cual fue el de ácido cítrico y este nos daba valores de 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 y 6.0, pero dentro de los valores que aquí se mostraban el valor resulto ser el menor de la primera prueba y el máximo de la segunda comprobando que si estaba en el rango señalado por la bibliografía.

En la segunda prueba ya con la consideración de el Ph en los medios se siguió con las pruebas en las cuales solamente se pusieron las muestras a temperturas controladas que se trataron de mantener lo más posible.



Los Ph óptimo los resultados fueron los siguientes

No nos muestra que el Streptococcus termophilus tiene sus rangos de mínima de 9.2 máxima de 4.1-4.8 y una óptima de 6.4 - 7.0. Al final nos dió un resultado de 6.95.

Para el Streptococcus diacetylactis nos reporta una actividad de mínima de 9.6, una máxima de 4.5 y una óptima de 6.5 - 7. El óptimo para esta bacteria es de 6.5.

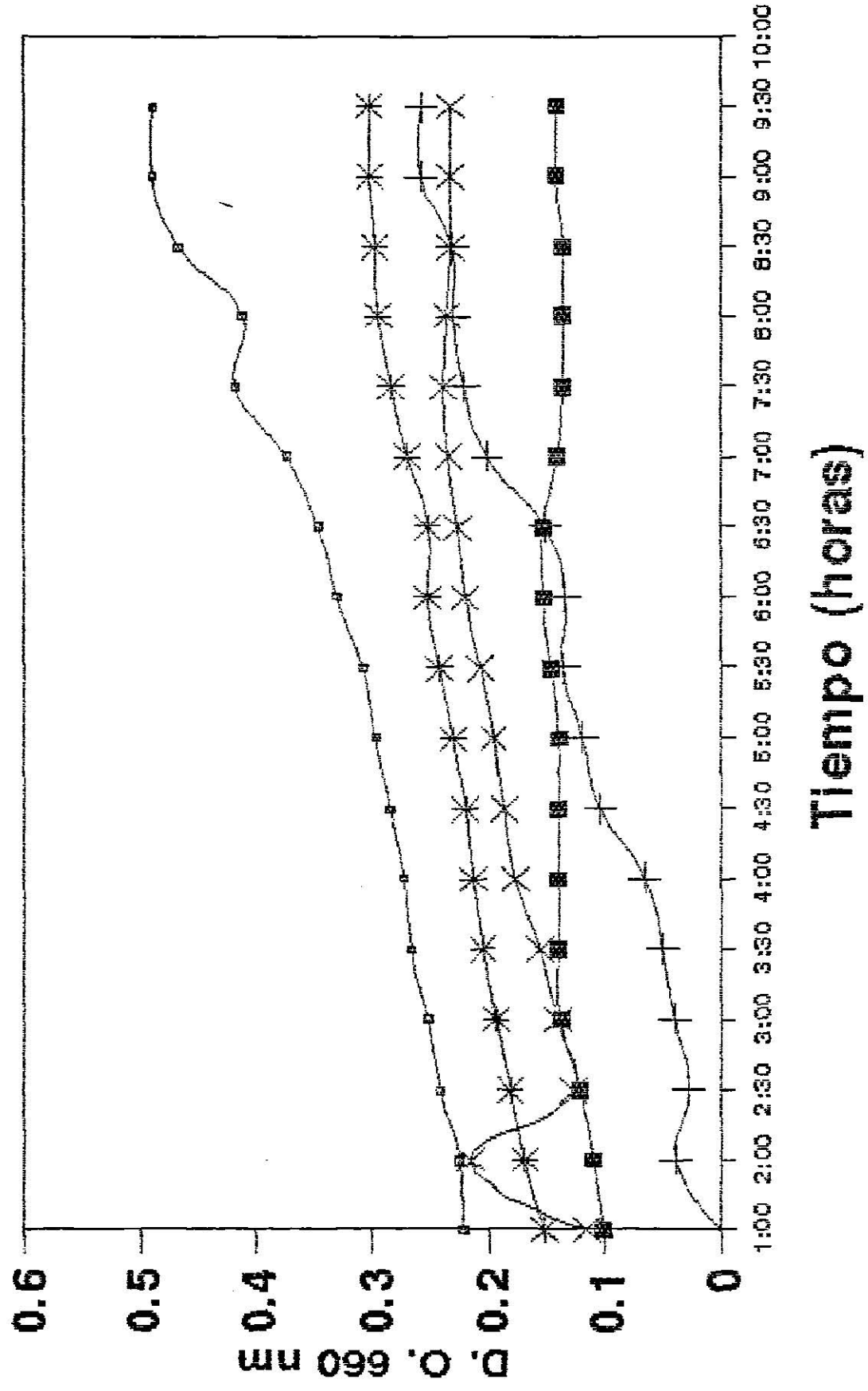
Para el Leuconostoc dextricum se reporta una mínima de 6.5, una máxima de 5 y una óptima de 5.5 - 6.0. Aquí como se probó con dos tipos diferentes de buffers podemos decir que el mejor de ellos fue el de fosfatos aunque también estuvo muy cerca del valor de ácido cítrico el valor final fue de 5.90.

Para el Propionibacterium Shermanii se reporta una mínima de 7.5, una máxima de 4.7 y una óptima de 6.2 - 7.0. Teniendo como resultado la de 7.40.

A continuación las graficas PH vs tiempo.

# CRECIMIENTO BACTERIANO

Bacteria: *Streptococcus termophilus*

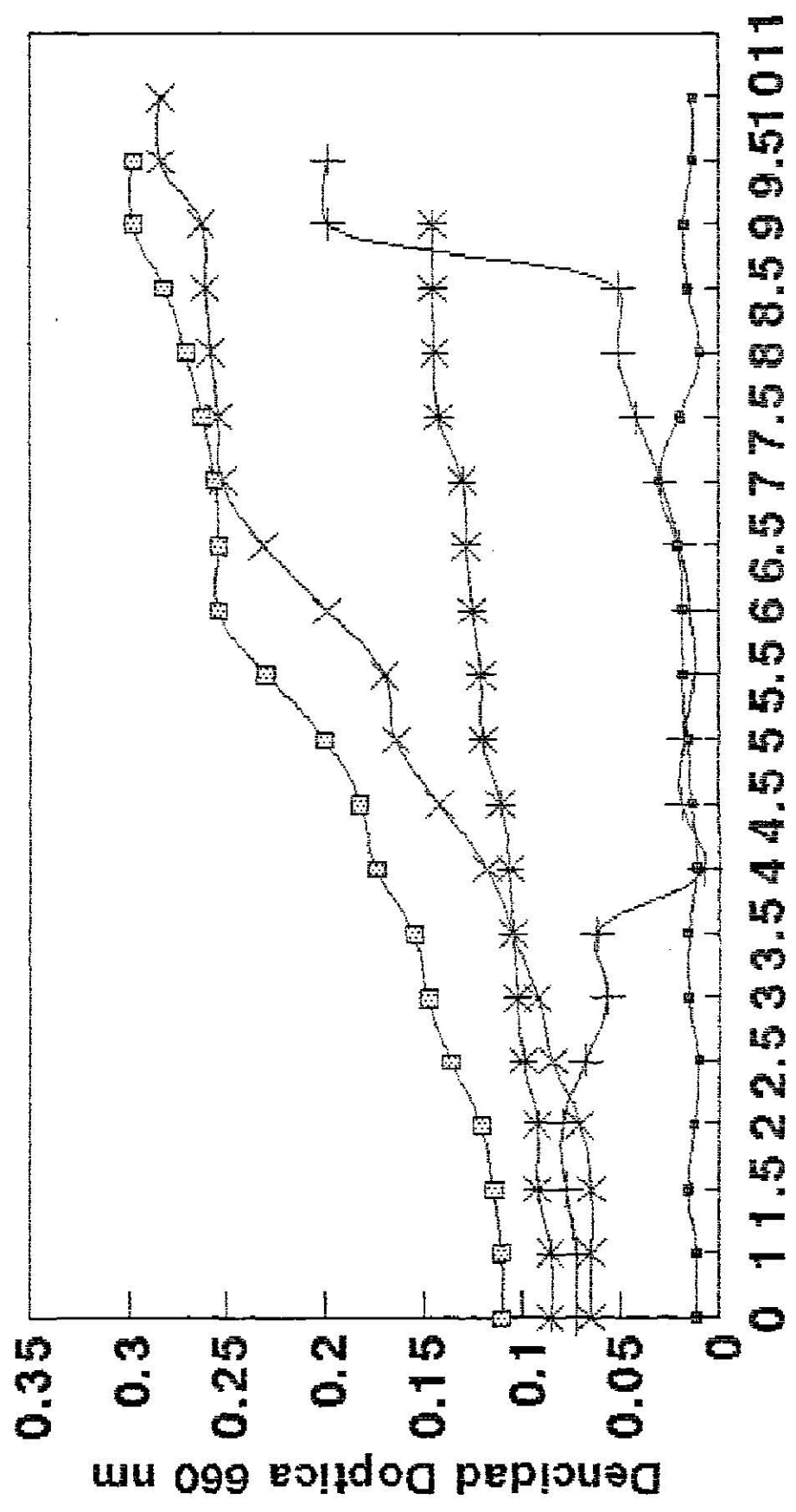


**SIMBOLOGIA**

+ Ph 7    \* Ph 6.5    ■ Ph 5.89    x Ph 6.1

CRECIMIENTO BACTERIANO

BACTERIA : *Streptococcus diacetylactis*



Tiempo (hrs)

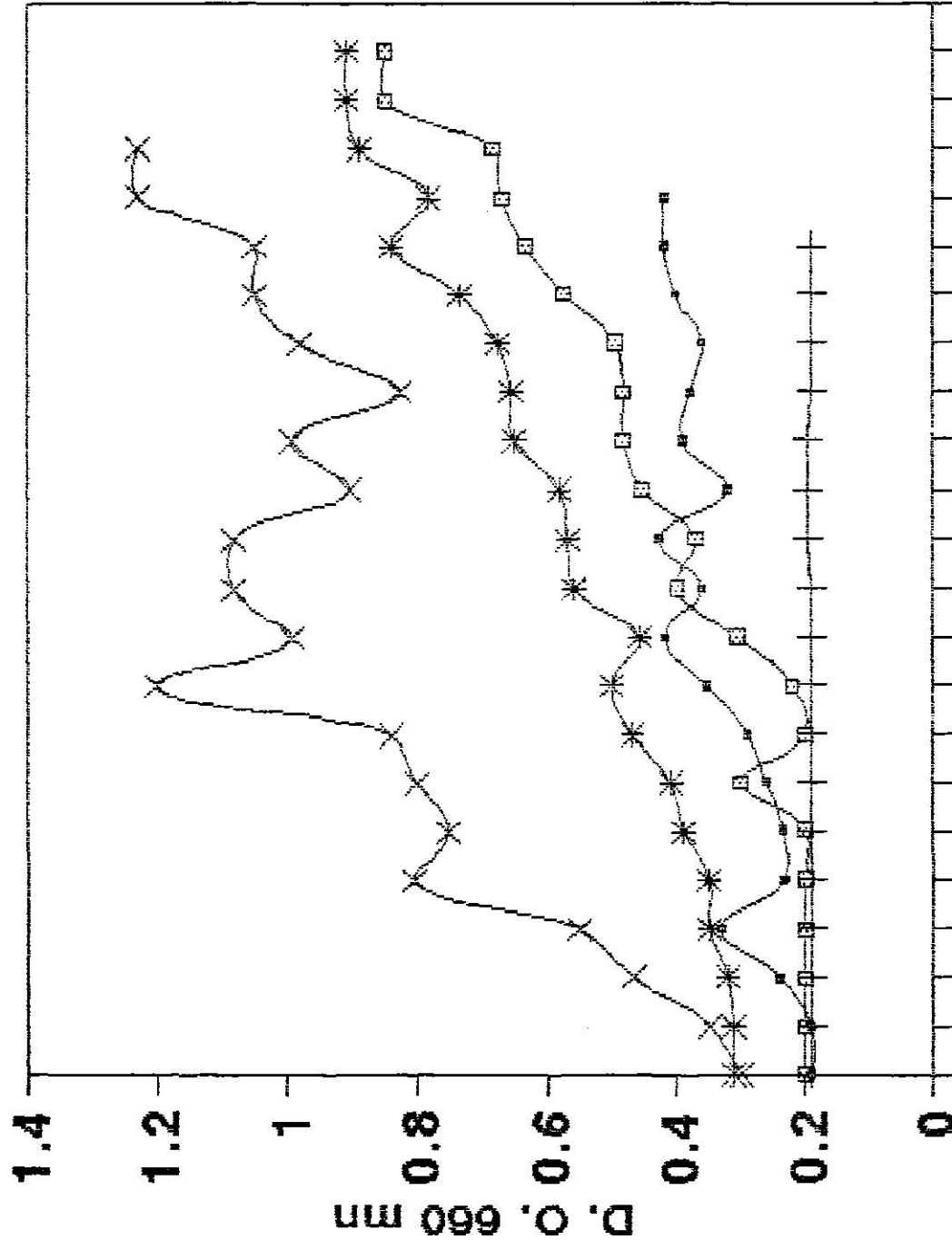
SIMBOLOGIA

+ Ph 5.89 \* Ph 6.16 □ Ph 6.40 x Ph 6.9 • Ph 7.8

Relación Ph vs Tiempo

# CRECIMIENTO BACTERIANO

BACTERIA: *Leuconostoc dextranicum*



0 1 1.5 2 2.5 3 3.5 4 4.5 5 5.5 6 6.5 7 7.5 8 8.5 9 9.5 10 11 12

Tiempo (hrs)

## SIMBOLOGIA

—□— Ph 3.98

—+— Ph 4.38

—\*— Ph 4.98

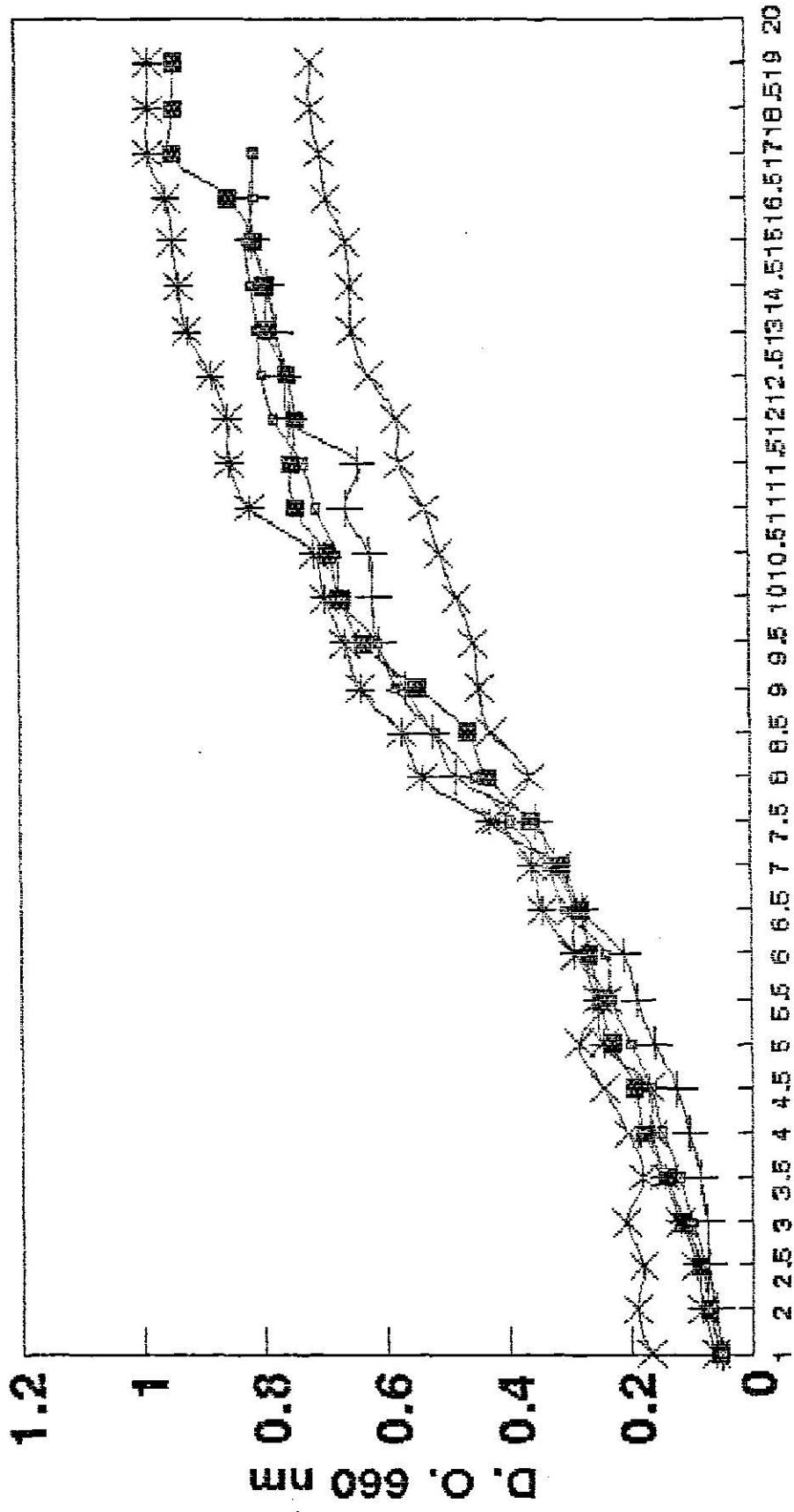
—□— Ph 5.39

—\*— Ph 6.90

Relación Ph vs Tiempo

# CRECIMIENTO BACTERIANO

BACTERIA: *Propionibacterium shermanii*



Tiempo (hrs)

SIMBOLOGIA

—○— Ph 5.92 + Ph 6.40 \* Ph 6.94 —■— Ph 7.42 \* Ph 7.85

Relación Ph vs tiempo

Las temperaturas que fueron las óptimas segun el estudio fueron las siguientes.

Para el Streptococcus thermophilus fueron las siguientes minimas de 20°C, máximas de 52°C y óptimas de 40-45°C. Teniendo como resultado mejor la de 45°.

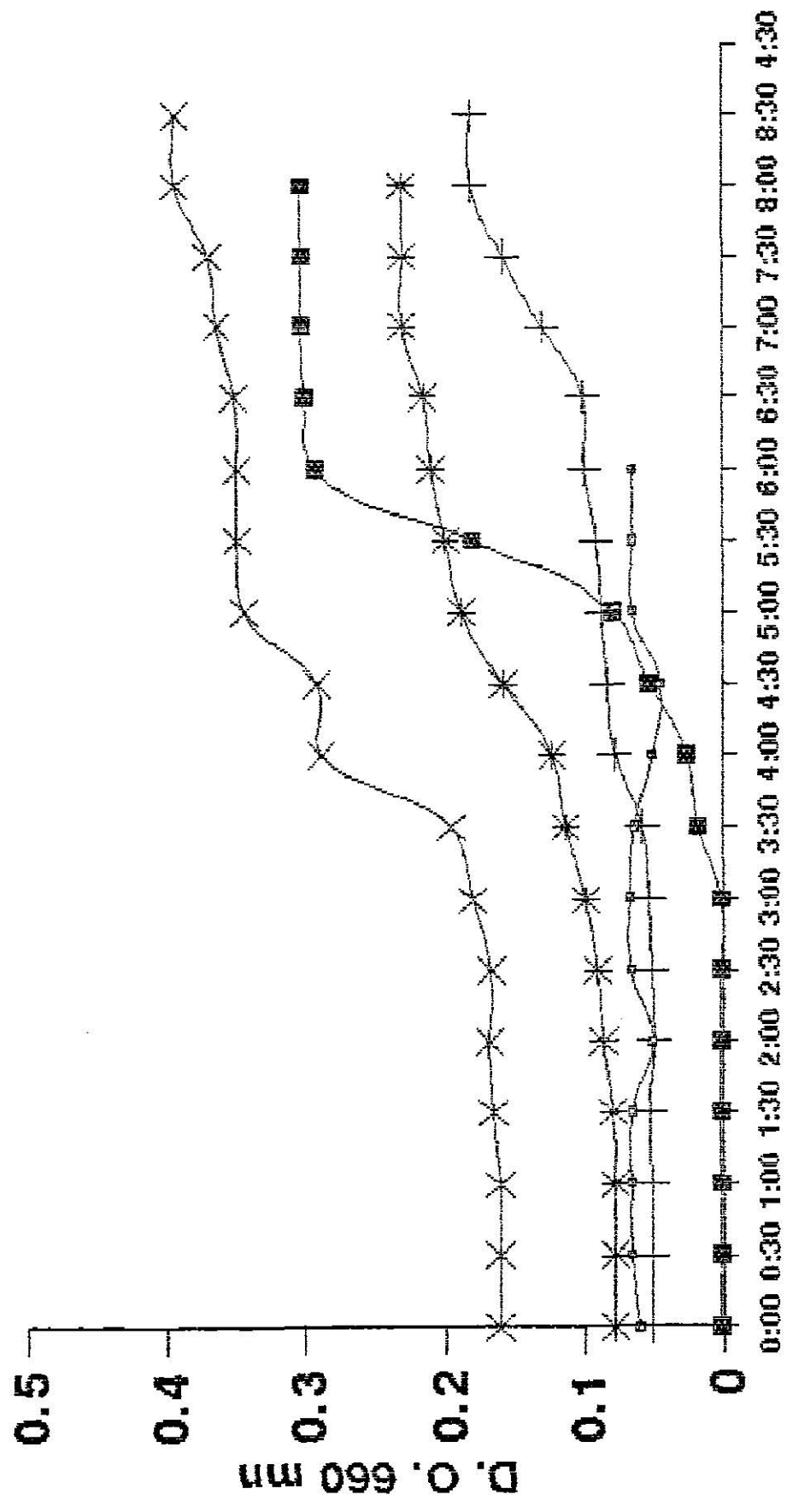
Para el Propionibacterium shermanii se reporto una minima de 2-3°C, una máxima de 45°C y una óptima de 33° - 37°C. La mejor temperatura reportada es la de 35°C.

Para el Leuconostoc dextricum se dieron a conocer que son una minima de 10°C, una máxima de 40°C y una óptima de 20-30°C. Aquí se reporta una temperatura un poco elevada pero dentro de los rangos estrablecidos por la bibliografia el resultado es de 35°C.

Para el Streptococcus diacetylactis estas estaban reportadas como minimas de 10 - 15°C, una máxima de 40°C y una óptima de 25 - 30°C. Esta bacteria tiene un optimo de 37°C.

A continuación las graficas de temperatura vs tiempo

**CRECIMIENTO BACTERIANO**  
**BACTERIA: *Streptococcus thermophilus***



Time (hrs)

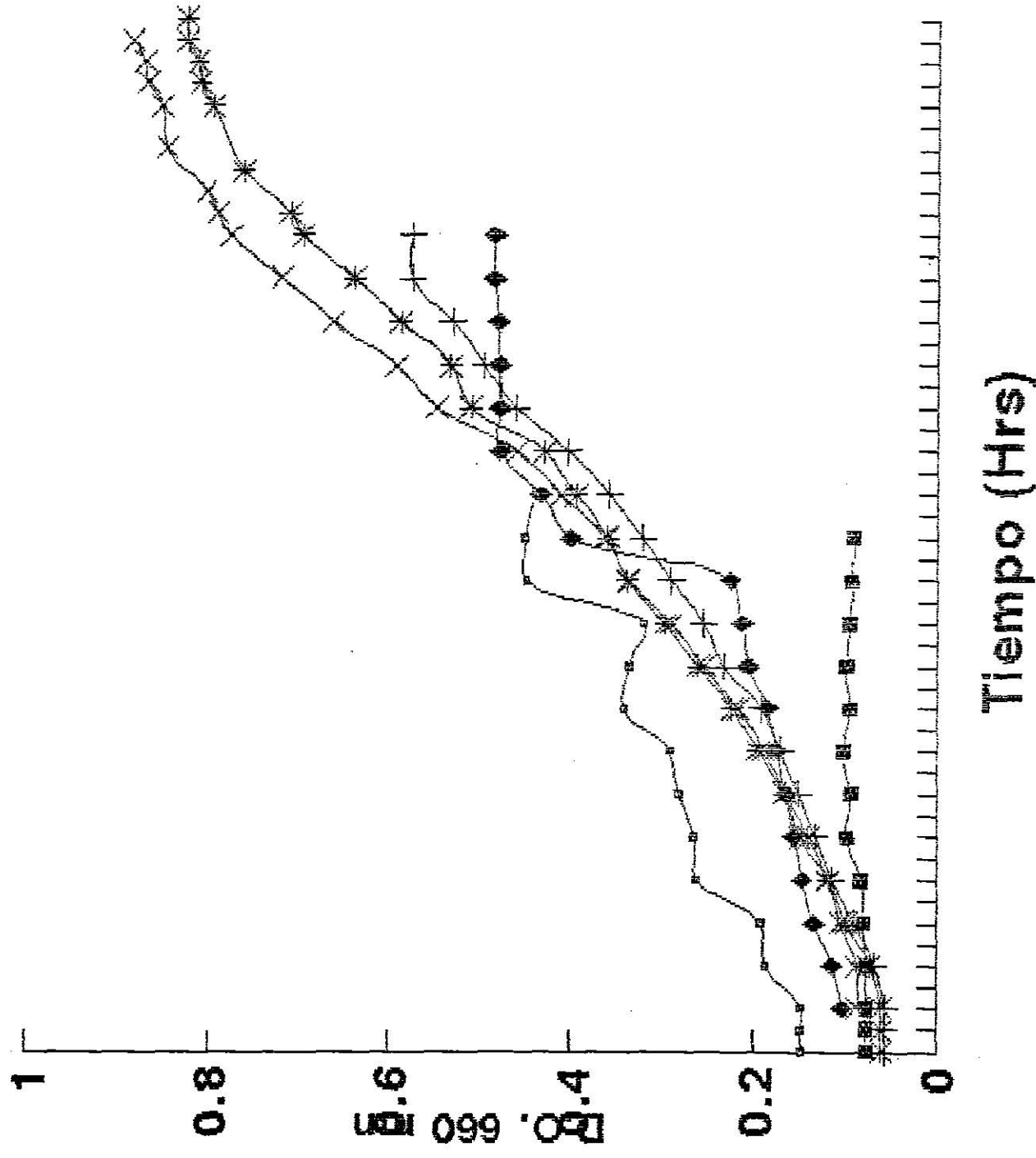
**SIMBOLOGIA**

--- Tem. 30    + Tem. 35    \* Tem. 40    x Tem. 45

Relación: Temp. vs Tiempo

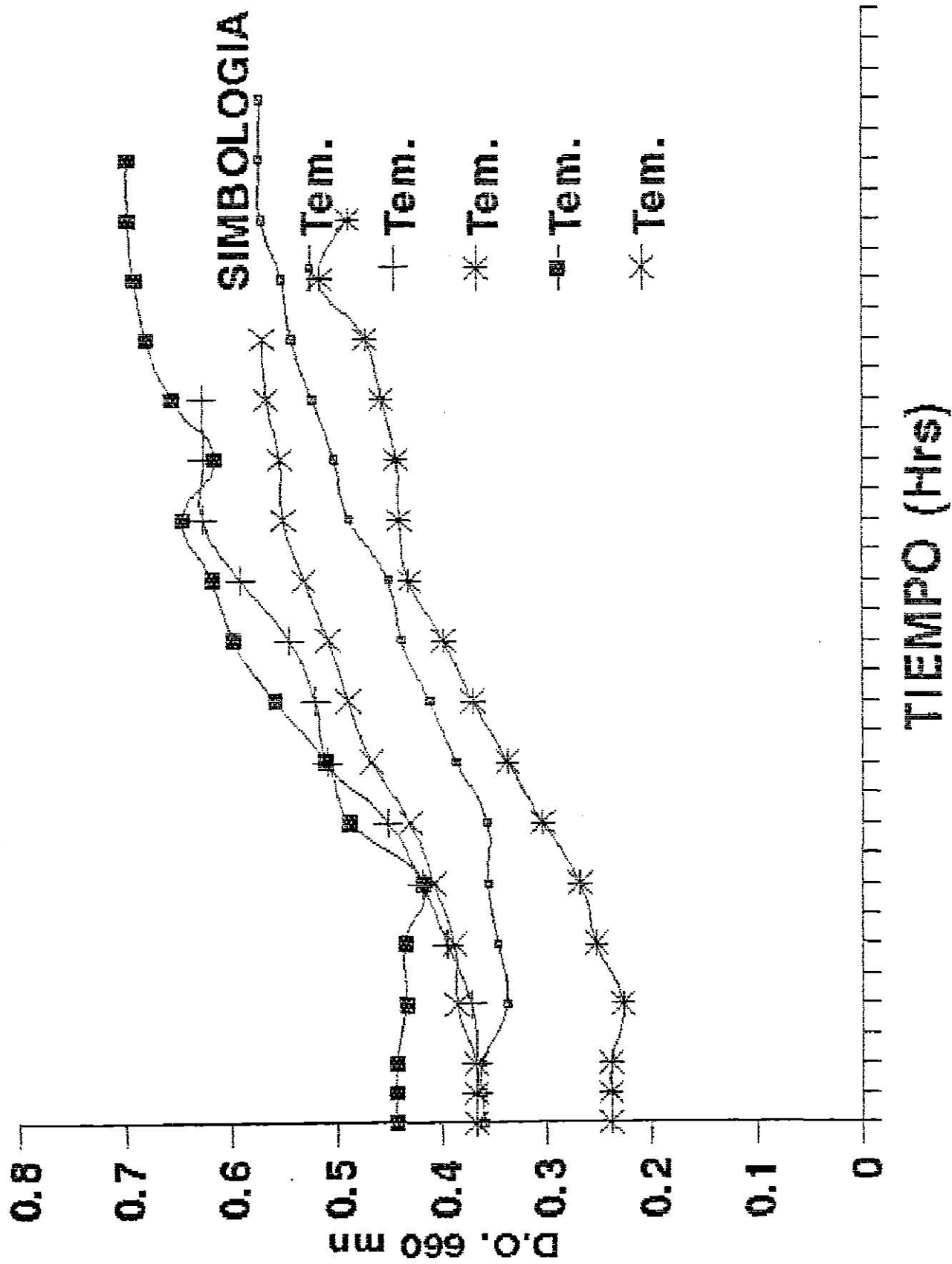
# CRECIMIENTO BACTERIANO

BACTERIA: Streptococcus diacetilactis



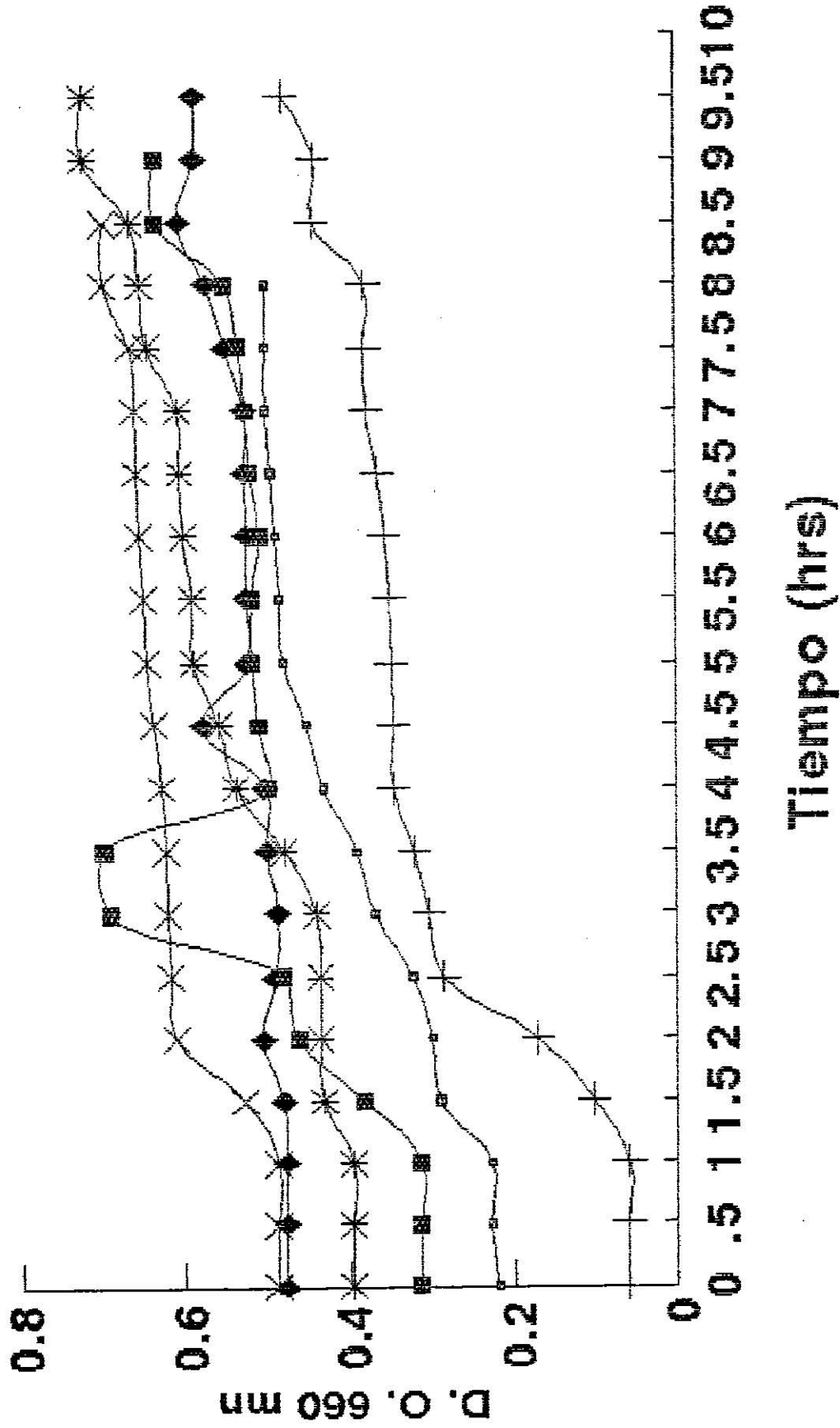


CRECIMIENTO BACTERIANO  
BACTERIA: *Leuconostoc dextricum*



# CRECIMIENTO BACTERIANO

## BACTERIA: Propionibacterium shermanii



### SIMBOLOGIA

---+--- Tem. 15    \* Tem. 20    \* Tem. 30    ■ Tem. 35    \* Tem. 37    ◆ Tem. 40

Relación Tem. vs Tiempo

## V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

Partiendo de los objetivos planteados y los resultados obtenidos concluimos lo siguiente:

Los cultivos lacticos aportan características a la leche y ayudan a la flora intestinal del hombre que la consume.

Las bacterias fueron extraídas de productos comerciales siempre y cuando tengan todos los requerimientos de crecimiento en medios artificiales.

Se midieron parametros como son Ph y temperatura, en una absorvancia de 600, ademas de pruebas bioquimicas.

Se trabajó con cultivos lo más puros posible para su mejor aprovechamiento, en cuanto a su identificación y caracterización, resultando la obtención de cuatro cepas que son Streptococcus thermophilus, Streptococcus diacetylactis, Leuconostoc dextricum y Propionibacterium shermanii.

### RECOMENDACIONES.

Seguir trabajando en la investigación de bacterias no importando de que producto alimenticio se trate, esto servira para su uso posterior ya sea para el mejoramiento del propio producto o elaboración de otros nuervos.

Se debe de tratar de trabajar con cultivos puros para mejores resultados haciendo pruebas más selectivas en cada bacteria tratada.

Se recomienda tener un metodo más apropiado a los recursos que tenemos en cuanto al almacenamiento para la conservación de bacteras activas.

Seguir trabajando sobre la microbiología de los alimentos, todavía hay muchas cepas de bacterias, hongos y levaduras nativas que se podrias utilizar.

## VI RESUMEN

El objetivo de estas pruebas fue aislar cepas de bacterias acidolacticas a partir de productos comerciales y para esto se empezo utilizando queso comercial como son el Cheddar, Mozzarella y el suizo, asi como yogurth.

Primero se aislaron en diferentes medios para seleccionar los adecuados.

Los cultivos puros se verificaron por su morfologia y despues por las pruebas bioquimicas.

De estas se separaron cuatro cepas las cuales son Streptococcus thermophilus, Streptococcus diacetylactis, Leuconostoc dextricum y Propionibacterium shermanii.

Los resultados de las condiciones óptimas fueron las siguientes, para el Stp. thermophilus un Ph de 6.95, temperatura de 45°C y un tiempo de geneación de 2:06 hrs; para el Stp. diacetylactis un Ph de 6.90, temperatura de 37°C y un tiempo de generación de 5:09 hrs; para el L. dextricum un Ph de 5.90, temperatura de 35°C y un tiempo d generación de 8:00 hrs; y para el Prop. shermanii un Ph de 7.40, uan temperatura de 35°C y un tiempo de generación de 0:40 min.

## VII BIBLIOGRAFIA.

- Alais Charles. 1970. Ciencia de la leche. Editorial Continental. Mexico. p 576
- Badui Dergal, Salvador. 1988. Quimica de los alimentos. Alhambra. Mexico. p 430.
- Banwart George, J. 1989 Basic food microbiology . AVI. 2ªEdi.
- Clark Joan E; Beegen Heiga and Wood Harland G. 1988. Isolation of intact chains of poliphosphat from Propionibacterium shermanii growth of glucose or lactate. Journal of bacteriology Vol 168:1212-1219
- Collins E. B. 1967 Microbiological methods. 2ªedi. London butterworths Cap 26. pp 254-257.
- Cogan Timothy M. 1981. Constitutive nature of the enzymes of citrate metabolism in Str. lactis ssp diacetylactis. Journal of Dairy Science Vol. 48 :489-495.
- Cooper, R. K. and E. B. Collins. 1978. Influence of T° on growth of Leuconostoc cremoris. J. D. Sc. Vol 61:1085-1088.
- Demeter, K. J. 1969. Lactobacteriologia. Editorial Acribia España.
- Dystra, G. J; D. L. Drerup; A. L. Braner and T. W. Keenan. 1970. Dimethyl sulfide production by Propionibacterium shermanii. ATCC9617. Journal of Dairy Sc. Vol 53 :642.
- El Hagakway I. S; W. L. Siatter. y W. J. Harper. 1957. Efect of strains, Ph, carbon source, and intermediate fermentation products. D. Sc. Vol 40.I y II.

- Foster, E. M.; F.E. Nelson; M. L. Speck; Doestch and J. L. Olson 1957. Dairy microbiology. Prentice-hall Inc. Englewood Cliffs N. J. pag. 16-25.
- Frazier, W. C. 1965. Microbiologia de alimentos. Editorial Acribia. España.
- Garvie Ellen, I. 1960. the genus *Leuconostoc* and its nomenclature. Journal of Dairy Sc. Vol 27:383-291.
- Garvie Ellen, I. 1967. A method of detecting dissimilation of citrate by lactic acid bacteria using *Streptococcus lactis* var *diacetylactis* NCDO 1007. J. Dairy Res. Vol 34:39-45.
- Gibbs, B. M. 1966. Identification methods for microbiologists Academic press. pp 65-79.
- Gilliland, S. E; W. Y. Cobb; M. L. Speck and E. D. Anna. 1970. Diacetyl production by concentrated preparation. Journal of dairy Sc. Vol. 53:632.
- Hofherr, Leslie A.; Hammonel Earl G.; Glatz Bonita A y Ross P.F. 1983. Relation of growth temperature to Fatty acid composition of *Propionobacterium shermanii* J. D. Sc. vol 66:1622-1629.
- Huncker and Peterson. 1964. Principles of bacteriology and inmuniti. Vol 1. 5a. edición. London.
- Hutkins, R. H. A. Morris. and L. L. Mckay. 1980. Effect of galactose om growth of *Streptococcus thermophilus*. Abstract dairy foods reseach- division D2. Vol. 63:55.

- Hutkins, R; S. M. Halambeck. and H. A. Morris. 1986. Use of - galactose-fermenting Streptococcus thermophilus in the manufacture of swiss - mozzarella, and short method cheddar - cheese. Journal of Dairy Sc. Vol. 69:1-8..
- Inn Hee Lee; A. G. Fredrickson and H. M. Tsuchiga. 1974. - Diauxic growth of Propionibacterium shermanii. Applied microbiology Nov. Vol 28:830-835.
- Kempler G. M. and L. L. Mckay. 1981. Bioquemistry and genetic of citrate in Streptococcus lactis ssp diacetylactis Journal of Dairy Sc. Vol 64 :1527-1539.
- Kilara Arun and shahani Khen. 1978. Lactic fermentation of - dairy food and their biological signi ficance. Journal of Dairy Sc. Vol. 61 :1793-1800.
- Kosokowoski Frank. 1970. Cheese and fermented milk foods. Edward Brothers Inc. Michigan.
- Kroger. M; J. A. Kurmann. and A. L. Rasic. 1989. Fermented - milk. Food technology. Vol. 43:97-99.
- Langrud Thor, Resnbold Geroge W. and Hammond Earl G. 1977. Production by Propionibacterium shermanii P59 Journal of Dairy Sc. Vol 60:16-23.
- Luna Rangel. 1982. Fundamentos de quimica analitica 2<sup>a</sup> Edi. - Edit. Limusa. pp 222.
- Mahmund H. M. A; and W. E. Sandine. 1988. Lactose use by - genetically manipulated leuconostoc. Abst ract Dairy foods reseach division Vol. 71:63.

- Nickels, C. Leesment H. 1966. Metodo para la diferenciación y determinación cuantitativa de la bacteria iniciadora. J. Sc. Abstract Vol 49.
- Park, H. S; G. W. Reinbol; E. G. Hammond. Y W. S. CLarck. Jr. 1967. Growth of Propionibacterium shermanii at low temperature J. D. Sc. vol 50:589-591.
- Perez Gavilan E. Jorge y José Pablo. 1984. Bioquímica y micro biología de la leche. Noriega Limusa. p 195.
- Ponne Carina and Hutkins Roberth. 1980. Coupled trasport of- lactose and galactose in Streptococcus- thermophilus. Abstract Dairy foods rese- arch division. D6. Vol 63:71.
- Rogosa, M. and M. E. Sharpe. 1960. An approach to the calssificcition of lactobacilli. Journal Appl. Bacteriology 22:326.
- Santos Moreno, Armando. 1990, Leche y sus derivados. Edito- rial Trillas. Mexico. p 217.
- Shin, C. y Y. Sato. 1980. Isolation and characterization of the generus Leuconostoc from Dairy products Dairy Science Abstract Vol. 42 :250.
- Shroeder, C. J. and L. L. Mckay. 1988. Deletion analysis of - the  $\beta$ -galactosidase gene from Strepto- coccus termophilus. Abstrac dairy foods reseach division Vol. 71:84.
- Smith, D. W. and T. D. Brock. 1989. Biology of Microorganisms. Pretince Hall 4th edition USA.
- Speckman, R. A. and E. B. Collins. 1970 Influence of energy



- source on acetoin and diacetyl formation. Journal of Dairy Sc. Vol 53 :632.
- Sterit, K; M. Ruegg; B. Blanc; 1980. the influence of water activity on the growth of lactic and propionic acid bacteria and the dependence on the solute added to the culture media. D. Sc. Abstract. Vol 42:534
- Topley and Wilson's. 1965 Principles of bacteriology and immunity. Vol 10. 5<sup>a</sup> edición, London. pp 728- 739.
- Vorob'eva, L. I; B. F. Vanyushin; N. A. Kokurina. and N. K. Presventova. 1966. Comparación morfológica y estudio bioquímico de Mycobact luteum vs Propionibacterium shermanii. Journal of Dairy Sc. Vol. 49.
- Woodar J. R. Jr., Gilliland S. E. and Speck M. L. 1970. Response of lactic Streptococci to exogenous  $\beta$ -galactosidase. Journal of Dairy Science. Vol 53:631.

