



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

“Hidrolizados caseínicos totales y fraccionados. Evaluación de su acción promotora del crecimiento y estimulante de propiedades tecnológicas de las bacterias ácido lácticas.”

Autor: Bioquímica María Carolina Rey

Director: Doctor Arturo C. Simonetta

Codirector: Doctora Georgina G. Tonarelli

Tesis presentada para optar por el grado académico de

MAGÍSTER EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS.

Realizada en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ingeniería Química y en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

Santa Fe
-2009-

AGRADECIMIENTOS

Ante todo, mi agradecimiento para Arturo Simonetta y Georgina Tonarelli, mis directores, por haberme brindado su tiempo y sus conocimientos, otorgándome una oportunidad para que esta Tesis se lleve a cabo, acompañándome y guiándome no solo durante el tiempo del desarrollo de la presente, sino también en el ámbito de todos los proyectos en los que he participado bajo su dirección.

A Mercedes, mi compañera sin igual, por haber compartido momentos de alegrías y de cansancio, dándome siempre su aliento para no abandonar cuando los tiempos eran escasos y, sobre todo, por la circunstancia de haber hecho juntas el posgrado y a través de él descubrir a una gran persona, y mejor amiga.

A los miembros del Jurado, por su tiempo e interés dedicados a la evaluación.

A mis compañeros de Ingeniería Química: Marta, Liana, Hugo, Karen y Adriana quienes en forma totalmente desinteresada me incorporaron cordialmente como una más al grupo de trabajo y me enseñaron con mucha sencillez a trabajar en un área distinta a la habitual.

A los miembros de Química Orgánica de la Fac. de Bioquímica, especialmente a Juan Carlos Perín por su generosidad al permitirme continuar con una parte de su trabajo; a Micky, Marcelo, Elsa, Jorge, Javier, Diana, Paula, Daniel, y a todos los integrantes del Departamento que siempre estuvieron interesados en mi labor.

A Luis, Richard y Álvaro por su interminable paciencia para asistirme en la parte informática.

A mis hermanos que me brindaron su tiempo desde sus lugares para hacerme sentir que era importante mi tarea, dándome fuerza para que no abandone.

A mi mamá y a Roberto que siempre estuvieron.

Por último a mi familia, que es el motor impulsor de todos los actos de mi vida.

Felipe, Arturo y Daniel. Gracias.

*“La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones
y la fuente de vida de todo progreso.”*

Louis Pasteur (1822-1895)

ÍNDICE

RESUMEN	1
----------------	---

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN	8
---------------------	---

1.1.- Composición química de la leche.	8
--	---

1.2.- Caseína .	10
-----------------	----

1.3.- Bacterias lácticas de interés alimentario.	30
--	----

1.4.- Propiedades tecnológicas de las bacterias ácido lácticas.	41
---	----

1.5.- Cultivos starter.	51
-------------------------	----

1.6. -Tecnología de producción de los cultivos iniciadores utilizados en la industria láctea.	61
--	----

OBJETIVOS	69
------------------	----

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS	71
-----------------------------	----

1.- Fraccionamiento de un hidrolizado enzimático de caseínas.	71
---	----

2.- Cepas de bacterias del ácido láctico utilizadas.	73
--	----

3.- Conservación de las cepas.	74
--------------------------------	----

4.- Activación de las cepas.	75
------------------------------	----

5.- Estandarización de los cultivos bacterianos.	75
--	----

6.- Determinación de las curvas de evolución de las poblaciones Bacterianas.	76
---	----

7.- Propiedades tecnológicas.	80
7.1.-Actividad acidificante.	80
7.2.- Actividad lipolítica.	81
7.3.- Actividad proteolítica.	82
7.4.- Determinación de la capacidad de producción de bacteriocinas.	84
8.- Capacidad de crecimiento en leche.	85

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	89
1.-Fraccionamiento del hidrolizado caseínico.	89
2.- Determinación de la cinética de crecimiento de las cepas de bacterias ácido lácticas	94
2.1.- Curvas de desarrollo microbiano para <i>Enterococcus faecalis</i> (E 24)	94.
2.2.- Curvas de desarrollo microbiano para <i>Enterococcus faecalis</i> (E 30).	99
2.3.- Curvas de desarrollo microbiano para <i>Enterococcus faecium</i> (E 23).	105
2.4.- Curvas de desarrollo microbiano para <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> (Sf 1-1).	111
2.5.-Curvas de desarrollo microbiano para <i>Streptococcus thermophilus</i> (Ch 3-4).	117

2.6.-Curvas de desarrollo microbiano para <i>Lactobacillus plantarum</i> (Lp 31).	124
2.7.- Curvas de desarrollo microbiano para <i>Lactobacillus delbruckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> (Lb 92).	129
3.-Propiedades tecnológicas de las cepas de bacterias ácido lácticas.	142
3.1.-Actividad acidificante.	143
3.2.-Actividad lipolítica.	152
3.3.-Actividad proteolítica.	158
3.4.- Producción de sustancias antimicrobianas tipo bacteriocinas.	166
3.5.- Capacidad de crecimiento en leche.	171

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES	177
---------------------	-----

APÉNDICE

Medios de cultivo	187
-------------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	190
---------------------	-----

RESUMEN

Las caseínas constituyen una familia de proteínas para las que se han definido múltiples actividades biológicas. Muchas de éstas han sido localizadas en fracciones polipeptídicas específicas obtenidas por tratamiento lítico de la molécula con enzimas específicas. Algunos de estos péptidos mostraron actividad modificadora de la proliferación de células, la cual es dependiente de la concentración inicial del hidrolizado en el medio de cultivo y se manifiesta por la promoción o inhibición de la proliferación celular. Así por ejemplo, la suplementación con dichos péptidos permite reemplazar entre el 25 y el 50 % del contenido de suero fetal necesario para sostener la velocidad de proliferación normal para una determinada línea celular en desarrollo.

Hasta el momento el estudio de la acción del hidrolizado y sus fracciones solamente se había realizado sobre líneas celulares específicas, razón por la cual en el presente trabajo se procedió a investigar la acción de éstos en el crecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL) y sobre las propiedades tecnológicas de las mismas.

Para dar cumplimiento a los objetivos planteados en la presente investigación, se realizaron los siguientes estudios experimentales:

Se fraccionó el hidrolizado caseínico comercial utilizando Cromatografía de Filtración por geles. Se separaron cuatro fracciones, pero teniendo en cuenta los resultados obtenidos en estudios previos, se trabajó únicamente con una de ellas, la denominada fracción A.

Se ensayó la evolución poblacional de las cepas de bacterias ácido lácticas de colección propia, usando los siguientes medios de cultivo:

- Suero de quesería en polvo (comercial) rehidratado y adicionado con un 2% (p/v) de hidrolizado total de caseína (Sigma).

- Suero de quesería en polvo (comercial) rehidratado y adicionado con un 2% (p/v) de hidrolizado de caseína fraccionado (fracción A).
- Suero de quesería en polvo (comercial) rehidratado y adicionado con un 4% (p/v) de hidrolizado de caseína fraccionado (fracción A).
- Suero de quesería en polvo (comercial) rehidratado y adicionado con un 2% (p/v) de peptona de carne (medio para comparación).
- Caldos MRS o M17 (Merck), utilizados como medios de referencia.

Se estudió el crecimiento de cepas de BAL pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*, de colección propia, obtenidas de alimentos fermentados, fermentos comerciales y artesanales y materias primas alimentarias de la región:

Enterococcus faecalis E24 (cepa aislada a partir de leche cruda)

Enterococcus faecalis E30 (cepa aislada a partir de leche cruda)

Enterococcus faecium E23 (cepa aislada a partir de leche cruda)

Streptococcus thermophilus Ch3-4 (cepa aislada a partir de starter láctico comercial)

Lactococcus lactis subsp. *lactis* Sf 1-1 (cepa aislada a partir de suero fermento artesanal)

Lactobacillus plantarum Lp31 (cepa aislada a partir de embutido cárnico)

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* Lb 92 (cepa aislada a partir queso de producción industrial)

Se estudiaron propiedades tecnológicas de las mismas cepas de BAL, tales como:

- * Actividad acidificante. * Actividad lipolítica.
- * Actividad proteolítica. * Capacidad de producción de bacteriocinas.
- * Capacidad de crecimiento en leche.

Los resultados obtenidos en las diferentes experiencias realizadas permiten expresar las siguientes apreciaciones:

- ❖ Comparando las cinéticas de crecimiento determinadas para todas las cepas de bacterias del ácido láctico en estudio, sean éstas cocos o bacilos, puede afirmarse que el medio más adecuado para seis de las siete cepas ensayadas ha resultado ser el lactosuero con la adición de hidrolizado caseínico total. La excepción la constituye la cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* Sf 1-1, para la que se ha comprobado que la máxima concentración celular se consigue en lactosuero adicionado con la fracción A al 4% (p/v); sin embargo, para esta cepa también se ha determinado que el lactosuero con agregado de hidrolizado caseínico total permite alcanzar una población cuantitativamente semejante y en menor tiempo de cultivo. También se aprecia que, para la cepa de *E. faecium* E23, la de *S. thermophilus* Ch 3-4 y las dos de *Lactobacillus*, el medio que ocupa el segundo lugar en cuanto a conveniencia es el lactosuero con adición de la fracción A al 4% (p/v).
- ❖ La actividad acidificante resultó variable de cepa a cepa, aún dentro de un mismo género bacteriano, y su tendencia a aumentar o disminuir, según el medio utilizado para la propagación, también ha sido variable para cada cepa y en función del tiempo al que se determinó dicha actividad.

Sin embargo, en todos los casos se observó un mayor aumento de la acidez en función del tiempo cuando el medio de desarrollo era suero de quesería con fracción caseínica A al 4 % (p/v), detectándose en este caso los valores más altos de acidez total luego de 48 h y/o 5 días de incubación.

- ❖ Un mayor grado de actividad lipolítica se observó cuando las cepas fueron previamente propagadas en el medio formulado en base a suero de quesería con la adición de la fracción A al 4% (p/v). También pudo apreciarse que en todos los casos el uso en la propagación previa de lactosuero con el agregado del hidrolizado caseínico total al 2% (p/v), se tradujo en un grado de actividad mayor de los respectivos sistemas lipolíticos que el determinado cuando la propagación de las cepas se efectuó en el medio de referencia (Caldos M17 o MRS, Merck).
- ❖ Para todas las cepas ensayadas, la mayor actividad proteolítica se obtuvo cuando fueron previamente propagadas en los medios de referencia (Caldos MRS o M17, Merck).

Resulta absolutamente claro de los estudios realizados que, como quizás era lógico esperar, el desarrollo de bacterias ácido lácticas en lactosuero con agregado de hidrolizados caseínicos no produce ningún estímulo favorable sobre sus sistemas enzimáticos proteolíticos..

- ❖ En lo que respecta al análisis de la capacidad bacteriocinogénica, se estudiaron sólo 4 de las 7 cepas en ensayo en el presente trabajo, las que fueron seleccionadas en función de los resultados arrojados por estudios previos relativos a su capacidad inhibitoria del crecimiento de otras especies bacterianas.

Para las cepas de *E. faecium* E 23 y *E. faecalis* E 24 se obtuvieron resultados comparables utilizando Caldo M17 (Merck) o lactosuero

adicionado con el 2% (p/v) de hidrolizado caseínico total, En cambio, al utilizar lactosuero con el agregado del 4% (p/v) de la fracción A para el cultivo de estas dos cepas, los sobrenadantes libres de células obtenidos mostraron una actividad inhibitoria de las cepas blanco marcadamente disminuida, excepto en el caso del sobrenadante de cultivo de la cepa E 24 frente a *E. coli* y a *Pseudomonas* sp.

Para las otras dos cepas estudiadas (*E. faecalis* E 30 y *L. plantarum* Lp 31) los resultados fueron diferentes, dado que en ambos casos la capacidad antibacteriana frente a todas las cepas blanco fue superior cuando los sobrenadantes libres de células de ambas cepas bacteriocinogénicas se obtuvieron a partir de cultivos en Caldos M17 o MRS (Merck).

- ❖ Con respecto a la capacidad de desarrollo en leche, para las tres cepas de enterococos se evidenció un buen crecimiento cuando las mismas fueron previamente propagadas en lactosuero con el agregado de hidrolizados caseínicos,

Para las dos cepas de lactococos se observó coincidencia en cuanto a que las mayores concentraciones celulares en leche se obtuvieron cuando la propagación previa se realizó en el medio sintético de referencia.

Para las dos cepas de lactobacilos estudiadas se observaron diferencias entre ellas, evidenciando una de ellas mejores resultados en lactosuero con el agregado de hidrolizados caseínicos y la otra con el uso de los medios comerciales.

En función de estos resultados generales previamente expuestos en forma resumida, es posible formular las siguientes conclusiones:

- ❖ Se ha demostrado el efecto promotor del crecimiento que poseen los hidrolizados caseínicos sobre las BAL. Se ha determinado la mayor conveniencia, prácticamente en todos los casos, del agregado del hidrolizado caseínico total, quedando en segundo lugar el uso de la denominada fracción A.
- ❖ Se ha podido comprobar el efecto estimulante que poseen los hidrolizados caseínicos incorporados al lactosuero sobre algunas de las propiedades de interés tecnológico-alimentario que poseen las BAL. En particular se pueden destacar los efectos estimulantes verificados sobre las actividades acidificante y lipolítica, y sobre la capacidad bacteriocinogénica y la de crecimiento en leche de algunas de las cepas ensayadas.

Por último y a modo de conclusión general, es posible afirmar que el empleo de lactosuero con el agregado de estos hidrolizados como medios de cultivo para la propagación industrial de BAL, plantea un uso novedoso de los mismos y una alternativa para reemplazar a medios de cultivo importados de alto costo. Conviene aquí destacar la necesidad de obtener grandes volúmenes de cultivos de estos microorganismos por parte de la industria láctea, así como el interés en tener alternativas para la utilización de medios de cultivo que en su mayoría son importados y costosos.

El diseño de medios de cultivo de bajo costo a partir de subproductos de la industria láctea es una alternativa tecnológica para satisfacer en parte las necesidades tanto de industrias que producen cultivos starters de BAL como de aquellas que en el proceso de elaboración requieren una propagación *in situ* de estas bacterias.

No debe olvidarse que el lactosuero es un producto de desecho de la industria láctea, cuya eliminación presenta inconvenientes ambientales por su alta DQO y DBO. Por lo

tanto, el uso de lactosuero enriquecido con hidrolizados caseínicos como medio para la propagación industrial de cepas de BAL, plantea un uso novedoso de este subproducto y ofrece al sector lácteo una alternativa más económica al empleo de medios de alto costo, logrando al mismo tiempo minimizar los impactos negativos en el ambiente.

INTRODUCCIÓN

1.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA LECHE

La leche es un alimento complejo de origen animal. Su composición aproximada es la siguiente: 5% de lactosa, 3-4 % de proteínas, 4 % de lípidos, 0,7 % de sales minerales, correspondiendo el porcentaje restante al agua. De estos constituyentes depende el valor nutricional de la leche y de los productos alimentarios que de ella se obtienen (Desmazeaud, M., 2000).

Las proteínas de la leche son las proteínas animales que desde hace más tiempo y en mayor cantidad consume el hombre. La leche de vaca es la mejor conocida; su producción es la más importante, porque se la utiliza para reemplazar a la leche materna y como alimento proteico esencial para adultos (Cheftel J.C. et al, 1989).

La función natural de las proteínas de la leche es de suministrar a los mamíferos jóvenes los aminoácidos esenciales requeridos para el desarrollo muscular y de otros tejidos que contengan proteínas (Fox P. et al, 1998).

En la leche normal el contenido medio de proteínas es de 30-35 gramos por litro, lo que representa el 95 % del nitrógeno total de la leche. Alrededor del 80 % de las proteínas se encuentran bajo la forma de complejos macromoleculares, que contienen una parte mineral (especialmente fosfato de calcio) y que son conocidas como micelas (Cheftel J.C. et al, 1989).

Tabla N° 1:

En la siguiente tabla se observan las concentraciones de las proteínas más importantes de la leche vacuna y humana (Cheftel J.C. et al, 1989):

Proteínas	Concentración (g/L)	
	<i>Bovina</i>	<i>Humana</i>
Total caseínas	26,0	3,6
α_{s1} -caseína	10,0	--
α_{s2} -caseína	2,6	--
β -caseína	9,3	--
κ -caseína	3,3	--
γ -caseína	0,8	--
Total proteínas solubles	6,3	67,3
β -Lactoglobulina	3,2	--
α -Lactoalbúmina	1,2	1,9
Inmunoglobulinas	0,7	1,3
Seroalbúmina	0,4	0,4
Lactoferrina	0,1	1,5
Lactoperoxidasa	0,03	--
Lisozima	0,0004	0,1
Proteosa-peptona	1,2	--
Glicomacropéptidos	1,2	--
Otras	0,8	1,1

1.2. CASEÍNA

La caseína es el componente proteico mayoritario de la leche, constituyendo un 80 % de la fracción proteica total. Se encuentra bajo la forma micelar y posee hasta un 8 % de constituyentes minerales, representando de esta manera el 27 % del calcio total de la leche, con una concentración de 1,2 g/L (30 mM) (Rivadeau-Dumas B., 1981).

La caseína bovina está compuesta por cuatro componentes; α_{s1} -, α_{s2} -, β - y κ - caseína; la humana consiste principalmente en β - y κ - caseína.

Existe una variación considerable, en la proporción relativa de las caseínas según las especies (Ginger M. et al., 1999).

Las caseínas, a causa de su estructura macromolecular tan particular, son fácilmente aislables por centrifugación o precipitación isoelectrica a pH 4,6.

Inicialmente se consideraron como una sustancia homogénea, pero Lindstrom-Lang et al. (1925) demostraron que estaba compuesta por dos fracciones diferentes; una que precipitaba en presencia de calcio, las caseínas sensibles al calcio, y otras responsables de la estabilidad del precipitado, caseínas no sensibles al calcio. En 1984, el Comité sobre Nomenclatura y Clasificación de la Asociación de Ciencia de Lechería Americana (American Dairy Science Association) propuso adoptar una nomenclatura para las caseínas bovinas, llamándolas, α_{s1} , α_{s2} , β y κ - caseína, adoptando también esta nomenclatura para las proteínas de la leche de otras especies (Ginger M. et al., 1999).

Las caseínas son una familia de proteínas fosforiladas que se encuentran en la leche formando agregados conocidos como micelas, siendo éstas las responsables del transporte de una gran parte de los minerales (calcio y fósforo) requeridos para el desarrollo de las distintas especies (Horne D., 2002).

La fracción no sedimentable, llamada “proteínas solubles” o “proteínas del lactosuero”, está constituida por proteínas globulares. Dentro de éstas encontramos las proteosapeptonas (PP), que corresponden a sustancias glicoproteicas con un volumen molecular intermedio entre el de las proteínas y el de los péptidos (Alais Ch., 1985).

1.2.1. Heterogeneidad

Si las proteínas de la leche se someten a un fraccionamiento electroforético (en gel de poliacrilamida) en presencia de un agente disociante o reductor, se pueden identificar varias fracciones. En efecto, algunas proteínas suelen tener varios niveles de fosforilación (α_{s1} -caseína) o de glicosilación (κ -caseína), y además todas estas proteínas presentan polimorfismo genético.

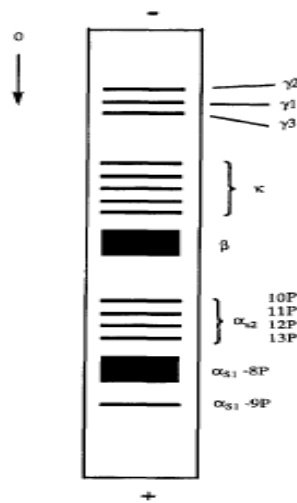


Fig N° 1: Electroferograma de caseinato de sodio en gel de poliacrilamida, realizado en buffer tris-hidroximetilamina, 5M de úrea a pH 8,9. (Fox P. et al., 1998)

En la actualidad se conocen cinco variantes para la α_{s1} -caseína (A, B, C, D y E), dentro de éstas se las subdivide en α_{s1} -CN-9P y α_{s1} -CN-8P. Donde CN es el gen productor y, 8 y 9 P son el número de residuos fosfatos.

La α_{s2} -caseína posee cuatro variantes (A, B, C y D), a su vez subdivididas en α_{s2} -CN-13P o (α_{s2}), α_{s2} -CN-12P o (α_{s3}), α_{s2} -CN-11P o (α_{s4}), α_{s2} -CN-10P o (α_{s6}).

Se observaron siete variantes para la β -caseína (A_1 , A_2 , A_3 , B, C, D, E), a su vez subdivididas en las siguientes: γ^1 -[β -CN-1P(f29-209)], γ^2 -[β -CN-1P(f106-209)], γ^3 -[β -CN-1P(f108-209)] y PP5 [β -CN-5P(f1-105)], PP5 [β -CN-5P(f1-107)],

PP8S [β -CN-1P(f29-105)], PP8S [β -CN-1P(f29-107)], PP8F [β -CN-4P(f1-28)].

Una variante se observó en la κ -caseína conocida como κ -[κ -CN-1P] (Fox P. et al, 1998).

De la misma manera, dos variantes se determinaron para la α -lactoalbúmina (A, B) y seis para la β -lactoglobulina (A, A_{DR} , B, B_{DR} , C, D) (Cheftel J.C. et al., 1989).

1.2.2. Composición de las caseínas.

Son proteínas ácidas, por ser ricas en ácido glutámico y aspártico. La β -caseína tiene un contenido de prolina notablemente alto; este aminoácido está repartido bastante regularmente a lo largo de la cadena peptídica, lo que hace improbable la presencia de estructuras ordenadas (hélice α o estructuras β) en cantidades apreciables. La α_{s1} -caseína y la β -caseína no poseen cisteína, mientras que la α_{s2} y sus derivados, así como la κ , contienen dos residuos por molécula (Cheftel J.C. et al., 1989).

Tabla N° 2: Composición química de las caseínas basada en la estructura primaria.

Acido	α_{S1}	α_{S2}	β	κ
Asp	7	4	3	4
Asn	8	14	8	5
Thr	5	15	14	9
Ser	8	6	12	11
SerP	8	11	1	5
Glu	25	24	12	19
Gln	14	16	14	20
Pro	17	10	20	35
Gly	9	2	2	5
Ala	9	8	15	5
Half Cys	0	2	2	0
Val	11	14	11	19
Met	5	4	2	6
Ile	11	11	13	10
Leu	17	13	8	22
Tyr	10	12	9	4
Phe	8	6	4	9
Trp	2	2	1	1
Lys	14	24	9	11
His	5	3	3	5
Arg	6	6	5	4
Pyr or Glu	0	0	1	0
Total residuos	199	207	169	209
Peso molecular	23.623	25.238	19.006	23.988

La composición en aminoácidos de las caseínas les confiere una hidrofobicidad media, ligeramente superior a la de la mayoría de las proteínas globulares; esta propiedad les permite asociarse muy fácilmente en complejos de elevada masa molecular.

Una de las características esenciales de las caseínas es el resultado de las modificaciones post-translacionales; en efecto, todas las caseínas se fosforilan con intensidad variable a nivel de los residuos de serina y treonina.

La κ -caseína bovina contiene una parte glucídica compuesta de galactosa, N-acetilgalactosamina y ácido N-acetilneuramínico. La κ -caseína del calostro contiene además glucosamina.

Algunas caseínas (γ^1 , γ^2 , γ^3) resultan de una proteólisis post-translacional de la β -caseína, debida probablemente a la acción de mínimas cantidades de plasmina de origen sanguíneo. Las peptonas encontradas en la fracción soluble constituyen la parte peptídica complementaria resultante de esta proteólisis limitada.

El conocimiento de las características estructurales de las proteínas de la leche permite prever ciertas propiedades físicas y químicas. Por ejemplo, la carga de la caseína a pH 6,6 (normal de la leche), calculada según su composición en aminoácidos, fósforo y glúcidos, resulta perfectamente comprobada por electroforesis o por las curvas de valoración ácido-base. Sin embargo, la carga de las caseínas en la leche puede ser modificada por la fijación de iones como el de calcio; la κ -caseína puede resultar más o menos cargada según su contenido en ácido N-acetilneuramínico. En efecto, cada trisacárido o tetrasacárido aporta una carga negativa y modifica la masa molar para la κ -caseína (Mercier J.C., 1981).

Asimismo, desde el punto de vista isoiónico, los valores experimentales de las caseínas resultan muy próximos a los que se calculan según la composición química; esto indica que todos los grupos ionizados de las caseínas son accesibles, dado que

no hay ningún valor anormal de constante de disociación. Pueden hacerse las mismas observaciones sobre los valores de volumen específico y de absorción a 280 nm (Cheftel J.C. et al., 1989).

La caseína aporta el 0,85 % del fósforo total de la leche (900mg/L).

α_{S1} , β y κ -caseína contienen 1.1, 0.6 y 0,16 % de fósforo (en base molar) respectivamente.

α_{S1} , α_{S2} , β y κ -caseína contienen 8, 10-13, 5 y 1 mol de fósforo por mol.

El fósforo es muy importante:

- nutricionalmente, por sí mismo y porque puede ligar grandes cantidades de

Ca^{2+} , Zn^{2+} y otros metales polivalentes.

- aumenta la solubilidad de la caseína.

- contribuye a la estabilidad de la caseína a altas temperaturas.

- actúa en la coagulación (Fox P. et al, 1998).

α_{S1} , α_{S2} y β -caseína precipitan en presencia de niveles milimolares de calcio iónico, la κ caseína no lo hace y en mezclas con otras caseínas inhibe la reacción de precipitación formando, en su lugar, entidades coloidales estables (Horne D, 2002).

Las caseínas son, en consecuencia, susceptibles a la proteólisis, además de ser desnaturalizadas por acción de los ácidos o el calor siendo ésta una característica importante en la nutrición neonatal (Fox P. et al., 1998).

1.2.3. Estructuras primarias, conformación y propiedades fisicoquímicas de los caseínas.

El conocimiento de la secuencia de los aminoácidos de las diferentes proteínas de la leche suministró una gran información sobre las propiedades fisicoquímicas, y permitió calcular y/o prever las estructuras tridimensionales de los distintos componentes proteicos. Se admite que las caseínas presentan una estructura poco ordenada, lo que facilita la entrada de proteasas en la molécula.

1.2.4. Caseínas. Clasificación. Características estructurales.

α_{s1} -caseína

De las caseínas sensibles al calcio, las α -caseínas se caracterizan por tener una gran solubilidad en presencia de calcio.

La α_{s1} -caseína es la fracción proteica mayoritaria en la leche bovina. Es una proteína altamente fosforilada. La secuencia de aminoácidos ha sido determinada directamente o inferida a través del secuenciamiento del DNA. Contiene múltiples sitios de fosforilación, el sitio principal está entre los residuos 100-110 (Ginger M. et al., 1999).

Figura N° 2: Secuencia de la α_{s1} -caseína bovina

```
MKLLILTCLV AVALARPKHP IKHQGLPQEV LNENLLRFFV
APFPEVFGKE KVNELSKDIG SESTEDQAME DIKQMEAESI
SSSEEIVPNS VEQKHIQKED VPSERYLGYL EQLLRLKKYK

VPQLEIVPNS AEERLHSMKE GIHAQQKEPM IGVNQELAYF
YPELFRQFYQ LDAYPSGAWY YVPLGTQYTD APSFSDIPNP
IGSENSEKTT MPLW
```

Péptido señal: 1-15

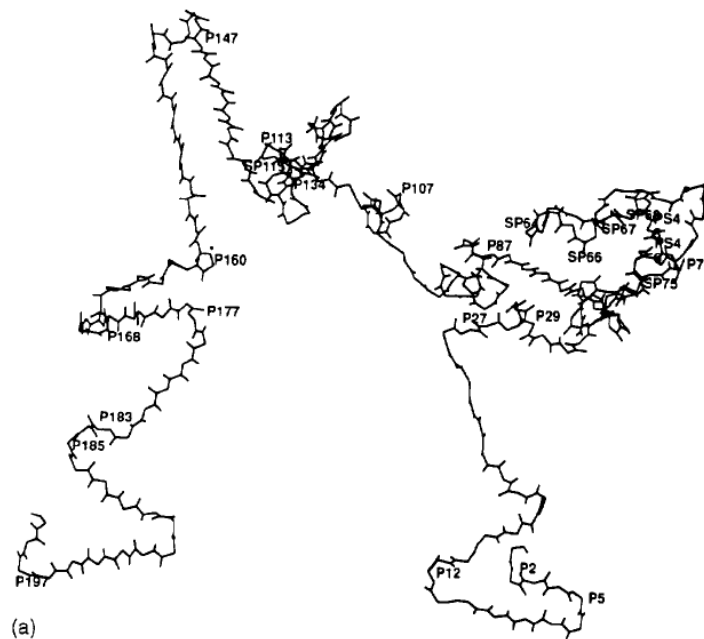
Cadena Polipeptídica: 16-214

<http://www.uniprot.org/uniprot/P02666>

La localización de las cargas y de las cadenas laterales hidrofóbicas es muy irregular. Esto le confiere a la molécula un comportamiento bipolar, con un polo globular mucho más hidrofóbico y otro polo cargado.

Cierto número de determinaciones físicas en presencia o no de agentes desnaturalizantes o disociantes indican que la α_{S1} -caseína no se comporta como una proteína globular; ésto se debe a la importancia de los grupos carboxilos fuertemente solvatados que confieren a la molécula su comportamiento de proteína “naturalmente desnaturalizada” (Mercier J.C. et al, 1971).

Figura N° 3: Modelo molecular de la estructura terciaria de la α_{S1} -caseína bovina (Kumonsinski et al, 1993).



Ref: en la fig. se observan las localizaciones de los residuos de prolina (P) y fosfofosforina (SP) en α_{S1} -caseína bovina.

En relación a la estructura secundaria de la α_{s1} -caseína, su estudio por Espectroscopía Raman (Byler et al, 1988) evidenció la presencia de un 10 % de α -hélice, 20 % de lámina β , 20-35 % de giros β y 33-40 % de no ordenada.

α_{s2} -caseína

Es la más hidrofílica de todas las caseínas; esto es debido a que es la más fosforilada (10-13 residuos de fosfoserina/mol) y la más rica en residuos aminoacídicos catiónicos. Los residuos de fosfoserina están agrupados en tres regiones (residuos 8-16, 56-61 y 129-133), mientras que las partes hidrofóbicas se limitan a las regiones 160-207 (zona C-terminal) y 90-120 (zona central). Esta estructura sugiere que las interacciones electrostáticas son muy importantes y dependen del pH. Resulta así una gran sensibilidad a los iones Ca^{2+} (Brignon G. et al, 1977).

Figura N° 4: Secuencia de la α_{s2} -caseína bovina.

```
MKFFIFTCLL AVALAKNTME HVSSSEESII SQETYKQEKN  
MAINPSKENL CSTFCKEVVR NANEEYSIG SSSEESAEVA  
TEEVKITVDD KHYQKALNEI NQFYQKFPQY LQYLYQGPIV  
LNPWDQVKRN AVPITPTLNR EQLSTSEENS KKTVDMESTE  
VFTKKTCLTE EEKNRLNFLK KISQRYQKFA LPQYLKTVYQ  
HQKAMKPWIQ PTKVIPYVR YL
```

Péptido señal: 1-15

Cadena Polipeptídica: 16-222

<http://www.uniprot.org/uniprot/P02663>

En relación a la estructura secundaria de α_{s2} caseína, Hoagland et al (2001), en estudios realizados por Dicroísmo Circular (DC) y Espectroscopia IR por Transformada de Fourier (FT-IR) señalan la presencia de un 24 % de α -hélice por DC, y 32 % por FT-IR(región amida I); en lo referente a estructuras lámina β , 30 y 27 % fueron determinados por DC y FTIR respectivamente, mientras que 24 y 31 % corresponden a giros β , según DC y FT-IR.

β -caseína

La β -caseína está formada por una única cadena y su secuencia se muestra en la Figura 5. Tiene una carga neta de -12 a pH 6,6. Posee cinco residuos de fosfoserina; la hidrofobicidad y carga neta de varios segmentos de la β -caseína han sido analizados, encontrándose que el extremo N- terminal (residuos 1-40) contiene los residuos de fosfoserina y la mayor parte de los residuos cargados de la proteína. La región C- terminal de la proteína (residuos 136-209) contiene muchos residuos no polares (lo que resulta en una alta hidrofobicidad) y solamente dos cortas zonas de potencial estructura beta, la que fue propuesta mediante el empleo de algoritmos para predicción de estructura secundaria (Creamer et al, 1981). Sobre esta base se ha propuesto una estructura anfipática para β -caseína.

Figura N° 5: Secuencia de la β -caseína bovina

```
MKVLILACLV  ALALARELEE  LNVPGEIVES  LSSSEESITR
INKKIEKFQS  EEQQQTEDEL  QDKIHPFAQT  QSLVYPPFGP
IPNSLPQNIP  PLTQTPVVVP  PFLQPEVMGV  SKVKEAMAPK
HKEMPFPKYP  VEPFTESQSL  TLTDVENLHL  PLPLLQSWMH
QPHQPLPPTV  MFPPQSVLSL  SQSKVLPVPQ  KAVPYPQRDM
PIQAFLLYQE  PVLGPVRGPF  PIIIV
```

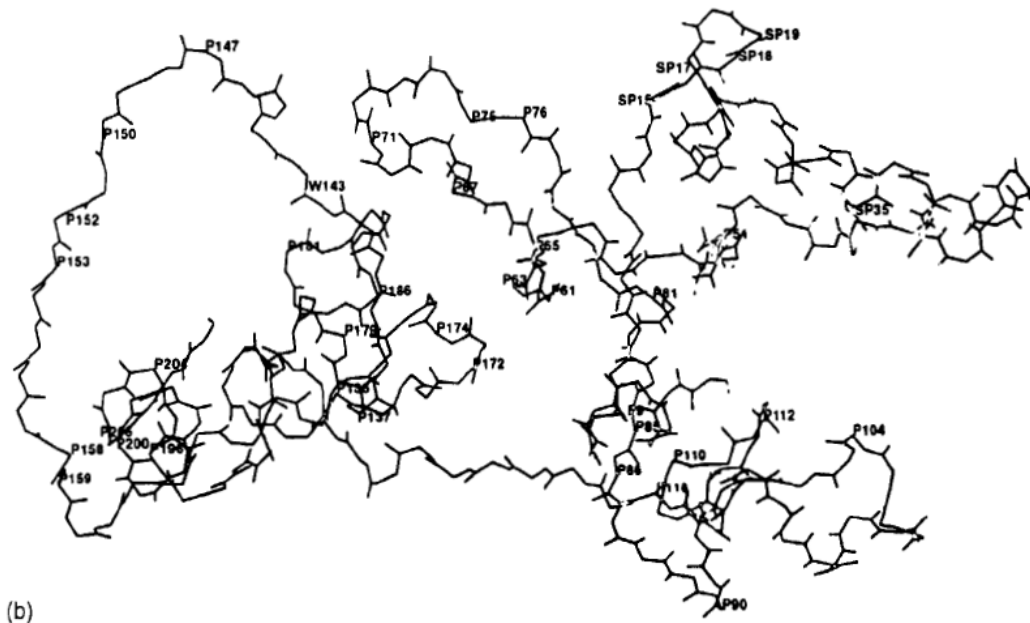
Péptido señal: 1-15

Cadena Polipeptídica: 16-214

<http://www.uniprot.org/uniprot/P02666>

Uno de los trabajos más recientes sobre estructura secundaria de β -caseína empleando Dicroísmo Circular y Espectroscopía FT-IR, evidenciaron un contenido de α -hélice del 20 % por DC y 29 % por FT-IR; 32 y 34 % de lámina β , 28 y 32 % de giros β , 22 y 4 % de estructura no ordenada por DC y FT-IR, respectivamente (Farell et al., 2001).

Figura N° 6: Modelo molecular de la estructura terciaria de la β -caseína bovina (Kumonsinski et al, 1993).



Ref: en la fig. se observan las localizaciones de los residuos de prolina (P) y fosfoserina (SP) en la β -caseína bovina.

La molécula presenta un carácter anfipolar muy marcado: la parte N-terminal muy polar (1/3 de la molécula) y la parte C-terminal hidrofóbica, conteniendo los 2/3 restantes de la molécula. El alto contenido en residuos de prolina regularmente repartidos presupone una estructura poco ordenada.

El comportamiento de la β -caseína frente a las proteasas difiere según que la molécula se encuentre bajo la forma de monómero o en la micela. En la micela, la α_{s1} -caseína es más susceptible que la β -caseína a la hidrólisis por proteasas tales como pepsina, tripsina o plasmina.

A baja temperatura (4°C), la β -caseína puede perder la estructura micelar y llegar a ser más sensible a la acción de las proteasas (Ali A. et al, 1980). Así las caseínas y provienen de la parte C- terminal de la β -caseína, mientras que el complemento (parte N-terminal) está constituido por varias proteosa-peptonas (PP) (Andrews A.T. et al, 1979; Groves M. L. et al, 1973).

κ -caseína

No conteniendo nada más que un residuo fosforilado (Ser 149), fija sólo algunos iones Ca^{++} , y su solubilidad no resulta afectada por su presencia. Posee carácter anfipolar; su parte N- terminal es hidrofóbica y su parte C-terminal contiene una zona glucídica muy hidrofílica (carga -10 ó -11 a pH 6,6); las extremidades con tri o tetrasacáridos (conteniendo el ácido N-acetilneuramínico), contienen por sí solas una carga negativa global de -16 a -17 .

Esta anfipolaridad se manifiesta sobre todo durante la coagulación enzimática de la leche por la quimosina, proteasa presente en el cuajo. La acción específica de esta enzima durante la reacción primaria de coagulación se traduce en la hidrólisis de un sólo enlace entre los residuos 105-106. El caseíno-glicopéptido liberado (106-169) contiene en su secuencia los residuos fosforilados y glicosilados, es muy polar y soluble. Por el contrario, la parte N-terminal, también llamada κ -para-caseína, cargada positivamente a pH 6,6, es muy hidrofóbica y poco soluble; es la que contiene los dos residuos cisteína.

La observación detallada de la secuencia de la caseína κ es muy útil para comprender tanto la protección que le confiere a la micela frente a los iones Ca^{++} como el fenómeno de coagulación por el cuajo.

Figura N° 7: Secuencia de la κ -caseína bovina.

MMKSFFLVVT ILALTLPLFLG AQEQNQEQPI RCEKDERFFS
DKIAKYIPIQ YVLSRYPSYG LNYEQQKPVA LINNQFLPYP
YYAKPAAVRS PAQILQWQVL SNTVPAKSCQ AQPTTMARHP
HPHLSFMAIP PKNQDKTEI PTINTIASGE PTSTPTTEAV
ESTVATLEDS PEVIESPPEI NTVQVTSTAV

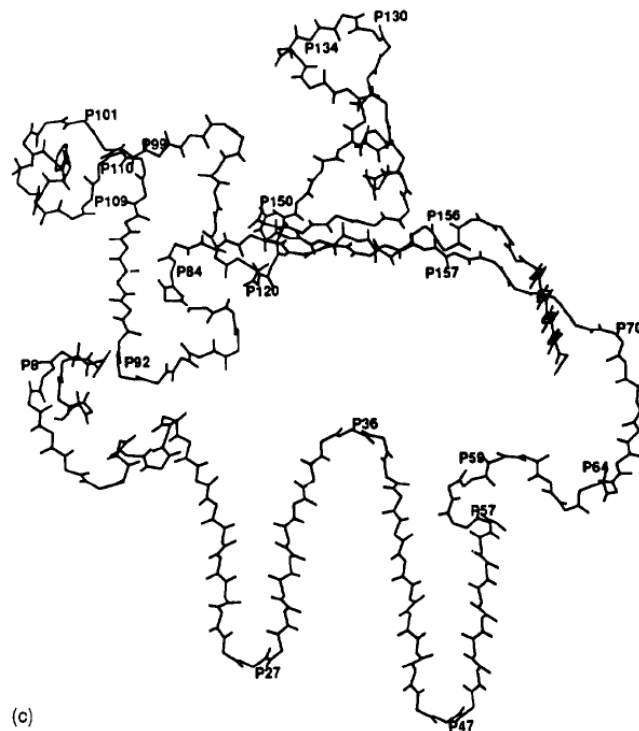
Péptido señal: 1-21

Cadena Polipeptídica: 22-190

<http://www.uniprot.org/uniprot/P02668>

En relación a la estructura secundaria de la κ -caseína, estudios realizados por Dicroísmo Circular y Espectroscopía IR, indicaron la presencia de 9 y 17 % de α -hélice respectivamente; de igual modo, 40 y 35% de lámina β , 26 y 25 % de giros β , y 24 y 23 % de estructura no ordenada fueron determinados por ambos métodos (Farrell et al., 1996 – 2002).

Figura N°8: Modelo molecular de la estructura terciaria de la k-caseína bovina (Kumonsinski et al, 1993).



Ref: en la fig. se observan las localizaciones de los residuos de prolina (P) y fosfoserina (SP) en la k-caseína bovina.

La κ -para-caseína es muy hidrofóbica y muy ordenada, particularmente en las zonas de pliegues β , 22-32 y 40-56, las que están, probablemente, asociadas en estructuras antiparalelas; las zonas de giros β (56-61, 69-72, 85-88), regiones no ordenadas, tienen probablemente un papel importante en el momento de la coagulación, provocando interacciones hidrofóbicas intermoleculares (Loucheux-Lefevre M.H.,

1978). Se debe resaltar también que la zona sensible a la quimosina (102-109), aunque muy ordenada, es muy accesible a la enzima, porque está rodeada de zonas muy expuestas, que corresponden a giros β ; de este modo la enzima puede situarse fácilmente en la superficie de la molécula.

El hecho de que la k-caseína sea menos susceptible que las otras caseínas a una proteólisis general por distintas proteasas, indica que su estructura es mucho más ordenada.

El grado de organización resulta todavía más acentuado por el hecho de que en la leche se forma una unión disulfuro entre los residuos de cisteína, bajo la acción de la sulfidriloxidasas. Esta actividad enzimática resulta favorecida por la localización de residuos de cisteína en regiones no ordenadas o en giros β .

Contrariamente a la k-para-caseína (producto de la acción de la quimosina sobre la k-caseína) muy hidrofóbica, ordenada y estable, la caseína-glicopéptido (zona C-terminal 106-169) tiene una estructura desordenada, inestable, muy dependiente de las condiciones del medio. Es fuertemente hidrofílica y se estabiliza mediante interacciones con el agua. Se explica así que en el momento de la coagulación se produzcan variaciones importantes de hidrofobicidad en la superficie de la micela (Jolles P., 1983) (Cheftel J. C., 1989).

1.2.5. Las caseínas como factores de crecimiento

Las caseínas constituyen una familia de proteínas para las que se han definido múltiples actividades biológicas. Muchas de ellas han sido localizadas en fracciones polipeptídicas específicas obtenidas por tratamiento proteolítico de la molécula (Nau, F. et al., 1995). Algunos de estos péptidos mostraron actividad modificadora de la proliferación de células de mamíferos (Coste, M. et al., 1992; Sutas, Y. et al., 1996).

Recientemente hemos demostrado que un hidrolizado enzimático comercial de caseína posee una significativa actividad en cultivos de la línea celular IPLB-Sf-21 (*Spodoptera frugiperda*) (Comini, M. et al., 1999). Esta actividad, que es dependiente de la concentración inicial del hidrolizado en el medio de cultivo y se manifiesta por la promoción o inhibición de la proliferación, no se encuentra en hidrolizados ácidos totales de la misma proteína. Cuantitativamente, trabajando con una concentración de hidrolizado que exprese el máximo de actividad estimuladora, la suplementación con el mismo permite reemplazar entre el 25 y el 50 % del contenido de suero fetal necesario para sostener la velocidad de proliferación normal para esta línea celular.

La hidrólisis de proteínas con diferentes proteasas inmovilizadas permite desarrollar procesos controlados para la obtención de péptidos con porcentajes variables de distintos residuos de aminoácidos (Vijayalaksmi M.A., 1989). Los métodos para inmovilización de enzimas tales como proteasas, lactasas y lipasas, entre otras, han sido ampliamente reportados en la literatura (Whitaker, J.R., 1972). La naturaleza química de los soportes, así como los métodos que pueden utilizarse para la inmovilización del biocatalizador, son también muy variados. Soportes de naturaleza inorgánica, como el vidrio de porosidad controlada (CPG), han sido ampliamente aplicados con resultados muy satisfactorios, pero presentan el inconveniente de tener un elevado costo, lo que limita su aplicación a escala industrial (Monsan, P., 1978; Weetal, H.H., 1993).

Otros soportes de cerámica y vidrio sinterizado derivatizados por xilanización o por recubrimiento de quitosanos han sido utilizados para la inmovilización de tripsina, presentando la ventaja de su bajo costo (Salvetti J. L. et al., 1999)

1.2.6. Efectos de los derivados bioactivos de la leche

Los beneficios de la leche en la prevención de infecciones han sido reconocidos a través del tiempo. Muchas de sus actividades han sido atribuidas a los anticuerpos,

pero actualmente es valorado el rol de algunas proteínas como la lactoferrina y la lactoperoxidasa, así como el de los complejos de los azúcares en la leche como agentes bioactivos.

La leche es un alimento completo para los mamíferos recién nacidos. Ésta contiene altos niveles de inmunoglobulinas y otros componentes activos fisiológicamente para prevenir infecciones en el recién nacido.

De forma similar, el calostro es importante en los mamíferos recién nacidos para actuar de manera preventiva.

1.2.7. Rol fisiológico de las sustancias bioactivas del tipo caseína

Aunque ni la caseína ni sus fracciones tienen roles fisiológicos establecidos, péptidos derivados de éstas han mostrado tener varias propiedades biológicas.

Los péptidos bioactivos son producidos por proteólisis enzimática tanto *in vivo* como *in vitro*, a partir de caseína bovina o humana (Maubois J. L. and Leonil J., 1989; Yamauchi K., 1992; Schlimme E. and Meisel H., 1993; Tirelli A. et al., 1997; Jelen P. and Lutz S., 1998).

Ciertos péptidos opioides son farmacológicamente similares al opium (morfina); éstos derivan de la caseína, y tal es el caso de la casomorfina (Shah N., 2000).

El péptido opioide más importante derivado de la leche bovina corresponde a fragmentos de la β -caseína (Meisel H. and Schlimme E., 1990). Los fragmentos peptídicos opioides de la β -caseína son llamados β -casomorfina, debido a su comportamiento similar a la morfina. Los fragmentos de la κ -caseína conocidos como casoxinas se comportan como antagonistas opioides. Todos los péptidos bioactivos derivados de la α -caseína bovina se comportan como antagonistas opioides. Se han detectado varios péptidos inmunomoduladores provenientes de la α_s -caseína y β -

caseína. Los fosfopéptidos de la caseína (CPPs) pueden ser producidos *in vitro* e *in vivo* con la tripsina gastrointestinal a partir de α_{s1} -, α_{s2} - o β -caseína (Naito H. et al., 1972; Kitts D.D. and Yuan Y. V., 1992; Tirelli A. et al., 1997).

Otros péptidos muestran actividad antihipertensiva. Éstos están en relación con la casokinina (Maruyama S. and Suzuki H., 1982; Maruyama S. et al, 1985; Gobbetti M et al, 2000; Minervini F. et al, 2003).

Fragmentos de la κ -caseína llamados casopiasrin, obtenidos a partir de hidrolizados trípticos, mostraron actividad antitrombótica por inhibición del fibrinógeno ligado a las plaquetas (Fiat A. M. et al., 1993).

Péptidos opioides relacionados con la caseína durante la digestión mostraron acción sobre la motilidad gastrointestinal (Daniel H. et al., 1990), afectando el tiempo de tránsito gastrointestinal. La casomorfinina ha provocado un aumento del tiempo del tránsito gastrointestinal, ejerciendo acción antidiarreica.

Cuando los péptidos opioides se han inyectado en el torrente sanguíneo se indujo un efecto dual, analgésico y sedativo, sobre el sistema nervioso. La α -lactorfina ha mostrado efectos contráctiles sobre el músculo liso (Antila P. et al., 1991). Diversos estudios sugieren que agonistas y antagonistas opioides se forman en el intestino como resultado *in vivo* de la hidrólisis de la caseína de la leche. β -casomorphins han sido detectadas en el plasma de mujeres embarazadas o lactantes (Bicknell R. S., 1985; Yen S.S.C. et al., 1985). Similarmente, las casomorfina han sido detectadas en quimo duodenal de pequeños cerdos y en intestino de humanos, como resultado de la digestión *in vivo* (Svedberg J. et al., 1985).

La actividad *in vitro* de péptidos inmunomoduladores resultantes de la hidrólisis tríptica y quimotríptica de la α_{s1} y β -caseína ha mostrado acción estimulante de la actividad macrofágica sobre los glóbulos rojos. Inmunopéptidos derivados de la caseína han sido estimulantes de la actividad fagocítica de los macrófagos humanos y

actúan como protectores frente a infecciones de *Klebsiella pneumoniae* en ratones. Estos péptidos pueden estimular la proliferación y maduración de células T y células natural killer, que actúan en los mecanismos de defensa de recién nacidos frente a un gran número de microorganismos, y particularmente frente a bacterias entéricas. La isracidina, fragmento 1-23 de la α_{s1} -caseína, obtenida por acción de la quimosina, posee actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. La inyección de isracidina en mama de oveja y vaca brindó protección contra la mastitis (Parker F., 1984).

En la fisiología humana, los péptidos son absorbidos en el intestino en forma activa. Di y tripéptidos pueden ser absorbidos fácilmente en el intestino delgado. Se ha reportado la absorción de péptidos con acción antihipertensiva, Val-Pro-Pro y Ile-Pro-Pro, provenientes de leche ácida (Yamamoto N., 1992).

La caseína estabiliza el calcio y los iones fosfato y hace de esta manera que sean útiles para el recién nacido. La digestión trípica de la caseína genera fosfopéptidos que en su región N-terminal contienen residuos de fosfoserina. Estas agrupaciones de residuos son las responsables de la interacción entre la caseína y el fosfato de calcio, llevando de esta manera a la formación de micelas de caseínas. Los fosfopéptidos de la caseína (CPP) estabilizan el calcio y los iones fosfato para la formación de complejos. El fosfato de calcio en estos complejos es biológicamente útil, tanto para la absorción intestinal como para la remineralización de lesiones superficiales en el esmalte dental (Cross K. et al., 2005).

1.3. BACTERIAS LÁCTICAS DE INTERÉS ALIMENTARIO

Numerosos productos alimentarios incluyen una fermentación láctica previa a su consumo, lo que les asegura características particulares de aroma y textura, y también seguridad alimentaria gracias a los ácidos orgánicos y a otros compuestos antimicrobianos producidos. Las bacterias responsables de este proceso se agrupan bajo la denominación de “bacterias lácticas” o “bacterias del ácido láctico”, aún cuando este término encierra microorganismos muy diferentes.

1.3.1. Características y taxonomía generales de las bacterias ácido lácticas

Las bacterias lácticas utilizadas en la industria alimentaria son microorganismos Gram positivos, catalasa negativos, no móviles. Ellas pueden ser cocos o bacilos, generalmente regulares. Los cocos tienen una forma esférica más o menos alargada, de diámetro variable entre 0,5 y 2 μm . Los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus* poseen células ovoides dispuestas en pares o cadenas, el género *Leuconostoc* está constituido por células lenticulares dispuestas en pares o cadenas y el género *Pediococcus* por células esféricas dispuestas en tetradas.

Los bacilos regulares pueden tener un diámetro variable de 0,5 a 2 μm y una longitud de 1 hasta más de 10 μm . Pueden presentarse solos, en pares o en cadenas muy largas. Se ha considerado conveniente subdividir al género *Lactobacillus* en tres grupos, acorde a sus diferentes capacidades fermentativas: los lactobacilos homofermentativos estrictos, formados por células largas; los heterofermentativos facultativos, de células cortas, a veces redondeadas o curvadas, y los heterofermentativos estrictos, formados generalmente por células muy cortas, rectas y aisladas.

Además de su morfología, la primera característica utilizada para diferenciarlos es su capacidad para producir ácido láctico a partir de los azúcares, en el caso de bacterias lácticas homofermentativas, o una mezcla de CO₂, ácido láctico y ácido acético-etanol, en el caso de bacterias heterofermentativas. Finalmente, se consideran también como características diferenciales útiles su temperatura de desarrollo y su tolerancia al oxígeno y a diferentes concentraciones de cloruro de sodio.

El género *Streptococcus* contiene numerosas especies, pero *S. thermophilus* es la única de interés industrial y nutricional. Sus células, de forma ovoide, se agrupan en cadenas largas. Es homofermentativo y produce ácido láctico L (+). Su temperatura óptima de desarrollo es 42-43 °C.

El género *Lactococcus* incluye bacterias lácticas cocoides dispuestas en cadenas de longitud variable. Tienen un metabolismo homofermentativo y producen exclusivamente ácido láctico L (+). Se distinguen por su temperatura de crecimiento mínima de 10°C y óptima cercana a 30°C, por su termosensibilidad y la capacidad de algunas especies para crecer en presencia de 4% (p/v) de NaCl. Estos microorganismos son principalmente aislados de vegetales y de piel de animales.

Las bacterias del género *Enterococcus* presentan un metabolismo homofermentativo y producen ácido láctico L (+). Se distinguen de otras bacterias por la presencia de antígenos del grupo D. Pueden crecer a 10°C y a 45°C, en presencia de 6,5% (p/v) y hasta 9% (p/v) de NaCl o de 40% (p/v) de sales biliares. Los enterococos son huéspedes normales del tracto intestinal de los animales de sangre caliente, pero también están presentes en nichos ecológicos extraentéricos como las plantas, los

forrajes ensilados y los insectos. Su dispersión es muy grande, y su presencia en concentraciones excesivamente elevadas en los productos lácteos es frecuentemente un índice de falta de higiene y de buenas prácticas de manufactura. Sin embargo y debido a algunas de sus propiedades, son a veces indispensables en ciertas elaboraciones queseras, específicamente las realizadas a partir de leche cruda salada.

El género *Lactobacillus* agrupa a numerosas especies distribuidas entre los tres grupos definidos a partir de su capacidad fermentativa, exigencias nutricionales y metabólicas y habitat:

- Los lactobacilos homofermentativos estrictos, caracterizados por su capacidad para fermentar las hexosas y no las pentosas, se adaptan bien a la leche, donde desarrollan fácilmente. Es el caso de *Lactobacillus delbrueckii* y de sus subespecies *lactis* y *bulgaricus*, o de *Lactobacillus helveticus*. Por otro lado, el tracto digestivo, los órganos genitales, y también las aguas residuales, contienen *Lactobacillus acidophilus*, utilizado en ciertas leches fermentadas.

- Los lactobacilos heterofermentativos facultativos se caracterizan por su capacidad de fermentar las pentosas por vía heterofermentativa y por su mesofilia. Las especies más corrientes en los quesos madurados son: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus rhamnosus*.

- Los lactobacilos heterofermentativos estrictos se caracterizan por su capacidad para fermentar las pentosas y las hexosas, siempre por vía heterofermentativa, por producir sustancias aromáticas, así como por su débil poder acidificante. Pueden intervenir en la formación de aromas en los quesos madurados o en ciertas leches fermentadas (Desmazeaud M., 2000).

1.3.2. Principales propiedades metabólicas y requerimientos nutricionales de las bacterias ácido lácticas.

- Utilización de azúcares:

El metabolismo de los azúcares conduce a la producción de ácido láctico y a un marcado descenso del pH, fenómeno necesario para la fabricación de ciertos productos lácteos.

Para las bacterias lácticas mismas, este proceso es indispensable ya que les provee energía.

Durante su desarrollo, estos microorganismos mantienen la fuerza motriz protónica elevada y un potencial fosfato rico en energía. Cuando el suministro de energía se detiene, los intermediarios energéticos se agotan rápidamente y luego, en el curso de la fase inicial del estado de privación nutricional resultante, el pool interno de fosfoenolpiruvato (PEP) aumenta rápidamente. De esta manera, el microorganismo se vuelve capaz de acumular una fuente de energía, durante un cierto período de tiempo, utilizando un sistema dependiente del PEP.

Dos procesos intervienen esencialmente para generar la energía metabólica: por un lado aquel ligado a la fosforilación del sustrato, y por otro lado, el resultante de fenómenos quimiostáticos. En el proceso ligado a la fosforilación, la energía liberada en las reacciones de deshidrogenación, o por la actividad de liasas, es utilizada para la síntesis de ATP. El segundo tipo de mecanismo generador de energía reside en los sistemas denominados “bombas protónicas”, que transportan protones hacia el medio extracelular, a través de la membrana citoplasmática. La posibilidad de la transferencia resulta de la generación de un potencial eléctrico de la membrana (negativo en el interior de la célula) y de un gradiente de pH (alcalino en el interior de la célula). La

suma de estas dos fuerzas es la fuerza motriz protónica. La energía del gradiente electroquímico puede convertirse en una energía química de tipo síntesis de ATP, o en gradientes iónicos. Finalmente el complejo ATPasa, ligado a la membrana y estimulado por los iones Ca^{++} y Mg^{++} , participa también en la transferencia de protones.

Como la creación y el mantenimiento de una fuerza motriz protónica por hidrólisis del ATP consume mucha energía, las bacterias lácticas han desarrollado, para limitar estas pérdidas de energía, sistemas reguladores del flujo electrogénico del lactato, por ejemplo en un sistema "symport" con dos protones. Debido a que el flujo de lactato saliente es continuo, una fuerza motriz protónica es creada continuamente. Así cuando el pH del medio disminuye, el organismo en desarrollo mantiene el pH interno constante a un valor próximo a la neutralidad, lo que implica la formación de un gradiente de pH. Al final de la fase exponencial de desarrollo, el pH interno ya no puede mantenerse constante, aparentemente por una falta de ATP. El pH cae bruscamente, el gradiente de pH desaparece y las actividades enzimáticas también lo hacen. La fuerte acidez del medio de cultivo influye sobre la actividad de las enzimas proteolíticas. Ciertas bacterias lácticas (lactococos) tienen la facultad de metabolizar la arginina y dar ornitina, amoníaco y gas carbónico, por intermedio del sistema arginina-desaminasa-ornitina-carbanil-transferasa y carbamato-quinasa, lo que les provee un mol de ATP suplementario por mol de arginina metabolizada. Las bacterias ponen en juego un sistema arginina/ornitina, lo que explica la presencia de ornitina en la mayoría de los quesos, aún cuando el compuesto no es un aminoácido de la caseína.

Las bacterias lácticas homofermentativas convierten casi cuantitativamente la glucosa en exceso en ácido láctico (90%). La glucosa (o la lactosa en el caso de la leche) es transportada por un sistema activo, y según la especie, puede ser fosforilada mientras es transportada a través de la membrana celular. En este caso por ejemplo, los lactococos ponen en juego un sistema de fosfotransferasas (PTS) que fosforila el

azúcar a expensas del fosfoenolpiruvato (PEP). Diferentes enzimas y proteínas específicas interactúan en el transporte activo. Como el PEP es a la vez un producto y un reactivo de la fermentación de los azúcares, este dador fosforilado de alta energía juega un rol clave en las etapas de transporte y metabolismo de los azúcares. Es parte de una cadena fundamental que conduce ya sea al transporte de azúcares o a la síntesis de ATP por la piruvato-quinasa. Esto es realizado por un control fino de la actividad piruvato-quinasa.

Así en los lactococos y en ciertos lactobacilos, la lactosa de la leche aparece en la célula bajo la forma de glucosil- β -D-(1,4)-galactosil-6-P (o lactosa-P). Este compuesto puede ser luego hidrolizado por una β -D-fosfogalactosidasa. Por lo contrario, los estreptococos termófilos y otros lactobacilos transportan la lactosa bajo la forma libre, por intermedio de un sistema permeasa, ya que la presencia sistemática de una β -galactosidasa ha sido demostrada. En general, los estreptococos termófilos no utilizan la galactosa proveniente de la lactosa y la liberan en la leche en el curso de la fermentación, lo que participa junto al ácido láctico producido en la inhibición de su propio desarrollo, ya que la galactosa es un inhibidor competitivo de la β -galactosidasa de estas bacterias. La consecuencia práctica en los productos lácteos en los cuales se produce una fermentación láctica, es que las bacterias lácticas tienen un rol fundamental en la inhibición de la flora perjudicial para la tecnología y de la flora patógena. Dos factores principales, a veces difícilmente dissociables, deben tenerse en cuenta: el pH y los ácidos láctico y acético producidos. Entre las bacterias no lácticas, son muy pocas las que pueden crecer a valores de pH inferiores a los obtenidos con los organismos lácticos. Así, una buena acidificación láctica implica una buena inhibición del desarrollo de *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Clostridium* o *Listeria monocytogenes*. En general, el factor tóxico para las bacterias es la forma molecular (no dissociada) del ácido láctico (pKa ácido láctico: 3,80).

Por comparación, el ácido acético es mucho más inhibidor que el ácido láctico. En medio débilmente tamponado, los dos ácidos actúan en forma sinérgica: el ácido láctico contribuye a disminuir el pH de la leche, aumentando así la actividad inhibidora del ácido acético (pka ácido acético: 4,74).

Evidentemente, la sensibilidad de las bacterias a los ácidos depende de otros parámetros del medio: tenor de sales, actividad de agua, potencial de oxido-reducción, secreción de una bacteriocina o de peróxido de hidrógeno, y estimulación del sistema lactato-peroxidasa-tiocianato de la leche por parte de las mismas bacterias lácticas (Desmazeaud M., 2000).

- Utilización de fuentes nitrogenadas:

Las bacterias lácticas exigen el suministro exógeno de aminoácidos para su crecimiento, ya que ellas son en general, incapaces de efectuar su síntesis a partir de una fuente nitrogenada mineral simple. Por ejemplo, los lactobacilos son auxótrofos para el ácido aspártico, ácido glutámico, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina, lisina e histidina. Los lactococos son auxótrofos al menos para cuatro aminoácidos: histidina, isoleucina, leucina y valina. En los estreptococos termófilos, las exigencias se dirigen esencialmente al ácido glutámico, histidina, cistina, metionina, valina, leucina, triptofano y tirosina. Las necesidades en ácido glutámico e histidina son las más limitantes, en cualquier condición de cultivo, pero no sucede lo mismo para los demás aminoácidos. Así, en la leche las bacterias lácticas sólo satisfacen parcialmente sus necesidades de aminoácidos libres. Ellas utilizan también muy rápidamente los péptidos cortos, ya que se demostró que en la leche, y para el caso de lactococos, los aminoácidos libres presentes permitirían obtener una densidad celular de solamente $3 \cdot 10^7$ UFC/mL, es decir, 50 veces menor que la normal obtenida. Para los estreptococos termófilos, esta fracción peptídica es también limitante, porque

para la mayoría de las cepas la adición de péptidos a la leche estimula su producción de ácido. Ciertos péptidos pueden servir de fuente principal de histidina, ácido glutámico o metionina. Otros sirven de fuente general de aminoácidos.

El inconveniente que encuentran luego las cepas es el transporte de aminoácidos y péptidos a través de las envolturas celulares bacterianas. Este transporte es un sistema dependiente de la energía y de la temperatura, pudiendo saturarse fácilmente. También se ha demostrado una dependencia con el pH y con la concentración de sales. Se pueden distinguir tres mecanismos de transporte:

- 1) Entre los sistemas de transporte ligados a la fuerza motriz protónica, el de la leucina está bien caracterizado. Éste cataliza el transporte de la L-leucina, L-isoleucina y de la L-valina, en "symport" con un H^+ . Los lípidos de la membrana intervienen en este transporte. La serina y la treonina poseen un mismo sistema de transporte activo, diferente de aquel común a la alanina y la glicina. Otros aminoácidos de forma L (histidina, prolina, metionina, cisteína, tirosina, fenilalanina, lisina) tienen también un sistema de transporte ligado a la fuerza motriz protónica.
- 2) En otros casos (glutamato, glutamina, asparagina), la energía necesaria para el transporte está dada por las uniones fosfato ricas en energía. En este caso, el transporte es irreversible, contrariamente al de los transportadores ligados a la fuerza motriz protónica.
- 3) En el caso de los lactococos, la arginina es transportada por un sistema "antiport". Este sistema arginina-ornitina cataliza el intercambio estequiométrico a través de la membrana, de la arginina al medio exterior y de la ornitina intracelular. La fuerza motriz es aportada por los gradientes de concentración en arginina y ornitina y es regulada por la concentración de arginina.

Para los péptidos, al menos tres sistemas de transporte han sido puestos en evidencia y caracterizados. El sistema Opp transporta exclusivamente oligopéptidos conteniendo

al menos 4 aminoácidos; el sistema DtpT transporta exclusivamente di y tripéptidos; finalmente, un sistema llamado DtpP, transporta preferencialmente di- o tripéptidos hidrofóbicos. En general, se considera que el tamaño límite de un péptido transportable a través de la membrana celular varía entre 6 y 12 residuos, según las especies.

Como las concentraciones en aminoácidos y péptidos cortos de la leche son bajas, las bacterias lácticas, para asegurarse un buen desarrollo, ponen en marcha enzimas proteolíticas para procurarse péptidos que les provean de nutrientes complementarios. En la leche, las caseínas son degradadas, y el 90% del crecimiento de los lactococos es el hecho responsable de estos procesos degradativos. En diferentes géneros de bacterias lácticas, una proteasa ligada a las envolturas celulares por medio de iones calcio realiza la primera etapa del proceso de degradación de proteínas. Es a este nivel que ciertas cepas pueden tener problemas de desarrollo en la leche.

En efecto, estas cepas producen con una frecuencia elevada, variantes lentas que desarrollan con una velocidad de crecimiento muy inferior a la de la cepa madre. El crecimiento de estas variantes se detiene cuando se agotan rápidamente las pequeñas cantidades de aminoácidos libres y de péptidos cortos presentes en la leche. Estas variedades designadas *prt⁻* resultan de la pérdida de su proteasa de pared, lo que las hace incapaces de utilizar bien las caseínas y de beneficiarse de nutrientes peptídicos suplementarios. En general esto resulta de la pérdida de un plásmido codificante para la síntesis de una proteasa de pared.

Los péptidos resultantes de esta proteólisis, luego de su transporte a la célula, son hidrolizados hasta el estado de aminoácidos, por diferentes peptidasas plasmáticas. Las bacterias lácticas poseen endopeptidasas intracelulares capaces de atacar a los péptidos en medio de la cadena. Ellas poseen también diferentes aminopeptidasas de

gran especificidad en la hidrólisis de uniones peptídicas conteniendo un residuo de ácido aspártico o glutámico en posición NH₂ terminal.

Finalmente, numerosas peptidasas específicas de residuos de prolina han sido también descritas. Teniendo en cuenta que péptidos que contienen prolina pueden generar sabor amargo, entonces todos los sistemas enzimáticos capaces de hidrolizar uniones donde esté presente este aminoácido pueden, potencialmente, mejorar el gusto de los productos lácteos; especialmente en quesos (Desmazeaud M., 2000).

1.4. PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

En lo que respecta a la obtención de elevadas poblaciones de bacterias del ácido láctico destinadas a una posterior utilización como cultivos starters en distintas industrias alimentarias, no sólo es importante la densidad de población máxima alcanzada en un medio de cultivo dado, sino también lograr la mayor velocidad de multiplicación celular posible; es igualmente de interés el estado fisiológico en que se encuentren esas células, dado que del mismo dependerán las propiedades tecnológicas, que son de fundamental importancia para su desempeño como cultivos iniciadores en la obtención de diversos alimentos fermentados. Entre estas propiedades se pueden mencionar como relevantes a las actividades acidificante, lipolítica y proteolítica, y a la producción de sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas.

Actividad acidificante:

La metabolización de los azúcares, fundamentalmente de la lactosa de la leche, dando ácido láctico como producto final, es de fundamental importancia, dado que provoca un marcado descenso del pH, fenómeno esencial para el proceso de coagulación o cuajado y también para la reducción o prevención del crecimiento de una microflora indeseable en el proceso fermentativo. Para las bacterias lácticas mismas, este proceso es indispensable, ya que constituye su principal fuente de provisión de energía, como ya ha sido detallado.

La habilidad de producir fácilmente ácido láctico a partir de la lactosa de la leche no es solamente una característica particular de la especie o de la cepa, sino que también depende de las condiciones fisiológicas de las células (Carrasco et al., 1992).

La actividad acidificante presenta importantes variaciones entre las distintas especies. En cultivos mixtos, la actividad acidificante es mayor que la correspondiente a un cultivo puro (Carrasco M. et al., 2005).

Actividad lipolítica:

Si bien la mayoría de los géneros y especies de bacterias del ácido láctico son escasamente lipolíticos, existen cepas de algunas especies donde esa acción enzimática es considerablemente más marcada. La capacidad de estas bacterias para liberar ácidos grasos a partir de las grasas presentes en las materias primas alimentarias, es también de trascendental importancia para conseguir caracteres sensoriales adecuados en los productos finales que se obtengan.

Una propiedad fundamental para los enterococos, por ejemplo, es su habilidad para hidrolizar los triglicéridos de la leche. Este hecho juega un rol importante en el desarrollo del flavor y el aroma de los productos fermentados, debido a la liberación de ácidos grasos volátiles y a la siguiente esterificación que estos pueden sufrir (Carrasco et al., 1992).

Algunos ácidos grasos de bajo peso molecular son suficientemente volátiles y contribuyen directamente en los cambios de flavor.

Algunos de los problemas de la descomposición de las grasas en los alimentos son de origen no microbiano, pero numerosas bacterias, levaduras y mohos producen enzimas lipolíticas que son capaces de causar hidrólisis y oxidación, deteriorando las grasas cuando están presentes en algunos alimentos. El agregado de lipasas, que

actúan sobre los triglicéridos, hace que los microorganismos puedan producir otros lípidos a partir de su hidrólisis con enzimas tales como la fosfolipasa C. Esta enzima fue aislada de *Bacillus cereus* y de *Pseudomonas fluorescens*.

La enzima fosfolipasa C extracelular producida por numerosas especies psicrótróficas Gram-negativas es estable a la pasteurización del tipo corto tiempo a alta temperatura (HTST) y a ultra alta temperatura (UHT), y la resistencia al calor de las lipasas termoestables es similar.

Los microorganismos que pueden producir enzimas glicosídicas conjuntamente con proteasas bacterianas, degradan las membranas y exponen sus lípidos a la acción de las lipasas y fosfolipasas. A estas glicosidasas puede atribuírseles indirectamente la actividad lipolítica. Las glicosidasas de *P. fluorescens*, en contraste con la fosfolipasa C y con la lipasa producida por este organismo, son completamente inactivadas por las temperaturas de pasteurización de la leche.

La oxidación microbiana de los lípidos ha sido investigada pero poco es lo conocido acerca de los cambios oxidativos o su importancia.

Comúnmente los microorganismos que producen lipasas pueden ser conocidos en relación a los cambios oxidativos que producen o a su importancia, pero en la manufactura de alimentos y en el análisis de los procesos, los microorganismos lipolíticos pueden ser un serio problema. La determinación del número de microorganismos lipolíticos presentes en una muestra de alimentos puede mostrar si un problema relacionado particularmente con los lípidos tiene origen microbiano o no microbiano (Smith J et al., 1991).

Actividad proteolítica:

Las bacterias ácido lácticas, mediante la acción combinada de proteinasas y peptidasas, se proveen de buena parte de los péptidos y aminoácidos libres que necesitan para vivir y multiplicarse. La acción de esas enzimas se ejerce sobre las proteínas o polipéptidos presentes en las materias primas alimentarias que conforman el medio de desarrollo de esas bacterias.

Algunas bacterias responsables de la descomposición de los productos refrigerados son altamente proteolíticas y pueden causar defectos en el flavor. Las enzimas proteolíticas producidas por bacterias psicrotrofas durante el crecimiento se pueden mantener activas luego de tratamientos con calor del tipo HTST y UHT, y de esta manera reducir la calidad del alimento o del producto tratado previamente con calor. La detección e identificación de bacterias proteolíticas pueden ser usadas durante la manipulación y elaboración de alimentos crudos o en el procesamiento de leche, ya que pueden constituir una causa de contaminación de productos (Marshall R.T. et al., 1992).

La actividad proteolítica sobre sustratos constituidos por moléculas proteicas grandes como la caseína, está limitada en general a bacterias lácticas y es variable según las cepas. Ello no significa que estas bacterias no produzcan o produzcan pocas proteasas y peptidasas. Se ha comenzado a estudiar sistemáticamente el equipamiento proteásico de varios estreptococos y lactobacilos, y se ha observado que las enzimas o son intracelulares (plasmáticas o de membrana) o están fuertemente ligadas a la pared microbiana. Estas enzimas no pueden ejercer una proteólisis rápida y amplia en el medio, pero sin embargo las peptidasas de las paredes son aptas para producir péptidos y aminoácidos a expensas de la caseína. Estas sustancias de bajo peso molecular pueden ser transportadas al interior de la

célula. Hay en este hecho una vía que permite el crecimiento de las bacterias lácticas en un medio deficitario en aminoácidos libres, como es la leche.

La proteólisis global no ofrece un buen medio para la identificación de las especies bacterianas; en cambio sí pueden ser útiles con esta finalidad algunas degradaciones de aminoácidos específicos como, por ejemplo, la desaminación de la arginina, que produce amoníaco y que puede ser puesta en evidencia mediante la reacción de Nessler (Alais Ch., 1983).

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos poco autónomos desde el punto de vista nutricional; no obstante, éstas son capaces de hidrolizar los péptidos de la leche a aminoácidos libres. A su vez, el catabolismo de los aminoácidos genera productos como amoníaco, aminas, aldehídos, fenoles y alcoholes, que contribuyen al flavor final en el caso de los quesos. Estas bacterias tienen tres capacidades importantes en procesos complejos: en primer lugar, lo relativo a las reacciones de decarboxilación, deaminación, transaminación, desulfuración e hidrólisis de cadenas laterales; en segundo término están involucradas en la conversión de compuestos finales (principalmente aminas y α -cetoácidos); y en tercer lugar, la reducción de aldehídos a alcoholes o la oxidación de ácidos carboxílicos (Taravia F. K. et al., 2002).

Producción de bacteriocinas y sustancias tipo bacteriocinas:

Las bacterias lácticas y los productos de su metabolismo han sido consumidos desde tiempos inmemoriales a través de alimentos fermentados. Esta circunstancia, unida al hecho de que muy raramente se las haya asociado a procesos patológicos, ha contribuido a su designación como bacterias "seguras" o GRAS ("Generally Recognized As Safe") por la Organización Mundial de la Salud (Gasser, F., 1994). En contraposición con los aditivos químicos, los consumidores perciben a las bacterias lácticas como algo natural y beneficioso para la salud, por lo que su empleo en la

conservación de los alimentos tiene gran aceptabilidad. En este sentido, se considera que si por bioconservación se entiende la extensión de la vida útil e incremento de la seguridad sanitaria de los alimentos mediante la microflora natural o sus metabolitos, entonces las bacterias lácticas son los candidatos ideales para su selección como cultivos bioprotectores (Aymerich M. T. et al., 1998). Así, no es de extrañar que se haya llegado a definir bioconservación como el empleo de bacterias lácticas, sus productos metabólicos, o ambos, para mejorar o asegurar la calidad sanitaria de los alimentos (Montville T. J. et al., 1997).

La capacidad de producir grandes cantidades de ácidos orgánicos (fundamentalmente ácido láctico) por fermentación de los carbohidratos presentes en los alimentos, y el consecuente descenso del pH, son los factores primarios en los que se basa la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas. Sin embargo, en los fenómenos de antibiosis de las bacterias lácticas también participan activamente otros metabolitos. Estos compuestos antimicrobianos adicionales han recibido una especial atención en las últimas décadas, tanto por parte de la comunidad científica como de las industrias alimentarias. Este interés se debe, por una parte, a que algunas bacteriocinas inhiben bacterias alterantes y patógenas que son resistentes a métodos de conservación tradicionales, y por otra, a que son compuestos atractivos desde el punto de vista tecnológico.

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos que se sintetizan a nivel ribosómico y que, posteriormente, pueden sufrir modificaciones post-transduccionales. Se definieron como sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica y activas frente a bacterias que guardan una estrecha relación taxonómica con la especie productora (Tagg J. R et al., 1976). Actualmente se sabe que, si bien esta definición es válida para algunas de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, existen otras con actividad bactericida o bacteriostática frente a microorganismos taxonómicamente distantes de la especie bacteriocinogénica. Por este motivo, las definiciones posteriores del término

bacteriocina han sido más generales. Se las definió como agentes antimicrobianos de naturaleza peptídica cuya síntesis no es letal para la célula productora, también como un grupo heterogéneo de compuestos antibacterianos de naturaleza peptídica que varían en su espectro de actividad, modo de acción, peso molecular, determinantes genéticos y características bioquímicas (Koninsky J., 1982; Klaenhammer T. R., 1988).

En condiciones normales, las bacteriocinas de las bacterias lácticas son activas únicamente frente a otras bacterias Gram-positivas. La amplitud del espectro de especies y cepas inhibidas depende de cada bacteriocina y oscila entre aquellas con un espectro muy reducido, limitado a ciertas cepas muy relacionadas taxonómicamente con la productora (ej. lactococcina A), y las que poseen un amplio espectro que incluye a microorganismos alterantes y patógenos, tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* o *Clostridium perfringens* (ej. nisina, pediocina PA-1). Además, las concentraciones inhibitorias mínimas para las células vegetativas y las esporas sensibles varían ostensiblemente, dependiendo de la cepa productora, del tipo de matriz alimentaria y de las condiciones del ensayo de actividad antimicrobiana (Blom et al.; 1997). Asimismo, conviene señalar que dentro de una especie generalmente sensible a una bacteriocina pueden existir cepas resistentes, e incluso se pueden seleccionar células resistentes entre la población de una cepa sensible.

La estructura y composición de las membranas externas de las bacterias Gram-negativas, mohos y levaduras impiden el acceso de las bacteriocinas más conocidas producidas por bacterias lácticas a su lugar de acción, las membranas plasmáticas.

Sin embargo, aunque estos microorganismos no resulten afectados por las bacteriocinas en condiciones fisiológicas normales, se pueden sensibilizar si se los somete a tratamientos subletales que alteren la permeabilidad de sus membranas

externas, como lo son la congelación, el calentamiento suave, la exposición a ácido láctico y a EDTA o la presión hidrostática (Kalchayanand et al.; 1992; Kalchayanand et al.; 1998; Martínez Magro M. I., et al., 2000).

Se ha encontrado que un gran número de sustancias tipo bacteriocinas, producidas por bacterias lácticas, poseen un mayor espectro de acción, ya que pueden inhibir a microorganismos Gram (+) y Gram (-), muchos de ellos implicados en enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), tales como: *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*, etc. (Klaenhammer T. R., 1988; Lauková A. et al., 1993; Okereke A. et al., 1991; Susani T. et al., 1995; Carrasco M. et al., 1999 ; Salvucci E. et al., 2007 ; Zelezetsky I. et al., 2005).

Los compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias ácido lácticas tienen un rol importante en resguardar la seguridad y extender la vida útil de los alimentos. El aumento de la demanda por parte de los consumidores alimentarios de productos “naturales” o “libres de aditivos”, ha generado un gran interés en el uso de sustancias inhibidoras naturales para la preservación de los diversos alimentos, pudiendo así reemplazar o reducir el uso de aditivos químicos (Malik R. K. et al., 1994; Vaughan F. E. et al., 1994; Carrasco M. et al., 1997, Lash B. et al., 2005; Delgado A. et a., 2005; Kang J. H. and Lee M. S., 2005; Guinane C. M., 2005; De Lima E. T. and Andreatti Filho R. L., 2005).

1.4.1. Generalidades sobre la importancia de las bacterias ácido lácticas en la actividad humana

La importancia práctica de las bacterias pertenecientes a este grupo es considerable, por varias razones:

1) Producción de ácido y descenso del pH: es quizás la principal propiedad tecnológica de estos microorganismos, y es la responsable de los siguientes efectos y procesos:

- Protección de los alimentos debida a la inhibición de las bacterias de la putrefacción o causantes de ETAs por el medio ácido generado.
- Establecimiento de las condiciones fisicoquímicas favorables a diversas transformaciones en la industria láctea: desuerado de la cuajada de quesería, elaboración de mantequilla, etc.
- Fermentación láctica “aromatizante”, que permite la obtención de productos ácidos con un sabor deseado: nata, manteca, yogur, etc
- Propiedades higiénicas resultantes de la acción antiséptica del ácido láctico en el intestino.
- Producción industrial de ácido láctico.

2) Otras actividades que pueden tener efectos útiles o perjudiciales:

- Producción de enzimas que intervienen en la degradación de las proteínas, favoreciendo por ejemplo la transformación de la caseína.
- Producción de sustancias inhibidoras, de gran interés en la bioconservación alimentaria.

- Producción de viscosidad, de gas (hinchamiento), etc, procesos requeridos o indeseables en distintas industrias alimentarias.

-Valoración microbiológica de las vitaminas o de los aminoácidos, aprovechando las exigencias nutritivas de las bacterias lácticas (Alais Ch., 1983).

1.5. CULTIVOS STARTER

1.5.1. Generalidades

La conservación de los alimentos mediante la fermentación de los mismos es uno de los métodos más viejos conocidos por el hombre. Un ejemplo típico lo constituye la fermentación láctica que se utiliza en la fabricación de productos lácteos tales como quesos, leches fermentadas, crema ácida, manteca fermentada, etc. Cuando estos procesos fermentativos son llevados a cabo de manera artesanal, las responsables de los mismos son las actividades enzimáticas de ciertos microorganismos naturalmente presentes en la leche. Pero en la industria moderna ya prácticamente no se utilizan estos riesgosos procesos fermentativos espontáneos, sino que se seleccionan cuidadosamente las cepas microbianas que van a llevar adelante las transformaciones enzimáticas, y cultivos de las mismas, denominados cultivos iniciadores o cultivos starter, son agregados *ex profeso* a la materia prima para iniciar, dirigir y controlar el proceso fermentativo.

Por lo tanto, los cultivos starter se pueden definir como cultivos de una o más cepas de una o más especies de microorganismos utilizados para la inoculación de materias primas con el fin de iniciar una fermentación controlada de las mismas (Robinson R.K., 1987).

Específicamente, los cultivos de bacterias usados en la manufactura de quesos y de distintos tipos de leches fermentadas se denominan starters lácticos (Wood, N. J., 1977).

Los mismos desempeñan un rol vital en la manufactura de estos productos. Así, su capacidad de producción de ácido láctico tiene gran influencia en las características sensoriales como el flavor y la textura, en el contenido de humedad, en la eliminación

de microorganismos patógenos y sus toxinas, y en la palatabilidad. La velocidad de producción de ácido láctico es crítica para la tecnología de manufactura de ciertos productos, como por ejemplo en las unidades mecanizadas de producción de quesos.

Además, el potencial redox negativo generado por el desarrollo de las bacterias del starter juega un importante papel en la preservación y en el desarrollo del flavor en muchos productos lácteos fermentados.

Por otra parte, la producción de compuestos volátiles (como diacetilo y acetaldehído) y la acción de enzimas proteolíticas y lipolíticas, contribuyen notablemente al sabor y aroma característicos de los productos, y la generación de sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas, aportan significativamente para asegurar la preservación de los mismos.

Muchos de los cultivos starter que se utilizan actualmente se han desarrollado a partir de las cepas de bacterias ácido lácticas originalmente presentes como parte de la microbiota natural de la leche cruda, a la cual han llegado provenientes de distintos ecosistemas, tales como la vegetación, el tracto intestinal, etc.

Los modernos cultivos iniciadores se han desarrollado a partir de la antigua práctica quesera consistente en guardar una pequeña cantidad de lactosuero de una fermentación exitosa para usarla como inóculo o fermento de las fermentaciones llevadas a cabo en los días subsiguientes (Mullan W.M.A., 2001).

Esta práctica, así como la de dejar fermentar espontáneamente la leche, son excesivamente riesgosas, dado que pueden producirse efectos colaterales no deseables y la calidad del producto final puede variar ampliamente. Sin embargo, aún hoy sigue siendo una práctica común en muchos casos.

En el curso del siglo XX y del actual, los microorganismos intervinientes en los procesos fermentativos alimentarios han sido estudiados profundamente, habiéndose

establecido su comportamiento y metabolismo. Esto ha hecho posible la selección de los microorganismos y la predicción de sus actividades bioquímicas, lo que ha tenido gran trascendencia para las fábricas dedicadas a la producción de alimentos fermentados, especialmente lácteos, permitiéndoles lograr una aceptable uniformidad en la calidad de los productos finales.

El aprovechamiento de propiedades específicas de nuevas cepas ha permitido incrementar el valor intrínseco de algunos alimentos (calidad alimentaria) y ha hecho posible lograr una alta flexibilidad con respecto a sus aplicaciones (diversificación de productos) (Leroy F. et al., 2006; Ammor M.S. and Mayo B., 2007).

Debido a que las cepas deben estar perfectamente adaptadas al microambiente alimentario en el que serán aplicadas, el estudio y utilización de aislados de alimentos naturales se muestra muy promisorio. Desde este punto de vista, los alimentos fermentados tradicionales son una rica fuente de nuevas e interesantes cepas de potencial aplicación en cultivos iniciadores (Robinson R.K., 1987; Vrije Universiteit Brussel – Research Group of Industrial Microbiology, 2007; Leroy F. et al., 2006; Ammor M.S. and Mayo B., 2007).

1.5.2. Starters lácticos

Para la fermentación de productos lácteos, los organismos más usados son *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*, etc.

Los cultivos starter formados por una o más cepas de los primeros tres de estos organismos son llamados starters lácticos mesofílicos. Cuando los starters contienen *S. thermophilus* y una o más especies de la mayoría de los integrantes del género

Lactobacillus, son llamados starters termofílicos, porque éstos tienen una temperatura óptima de crecimiento más elevada (de 37 a 45° C) (Wood, N. J., 1977).

Las funciones fisiológicas de los lactococos son varias y muy importantes en la producción y maduración de quesos:

- La fermentación de azúcares genera un descenso del pH que es importante en el fenómeno de coagulación y en la disminución o prevención de los posibles inconvenientes generados por la microbiota naturalmente presente en la leche. El impedimento del desarrollo de patógenos se pudo observar en leche cruda o entera después de la pasteurización. La producción de ácido por parte de las bacterias del starter contribuye al flavor del queso, a la desestabilización de la caseína y así a la eliminación del suero para transformar la leche en queso (Sandine W., 1979).

- La hidrólisis de las proteínas actúa sobre la textura y, particularmente, sobre el sabor de los quesos.

- La síntesis de compuestos generadores de "flavor", de gran importancia para lograr los caracteres sensoriales adecuados en el producto final.

- La síntesis de agentes texturizantes, que puede influir en la consistencia del producto.

- La producción de compuestos inhibidores tales como las bacteriocinas, de gran interés actual para la biopreservación de alimentos (Salminen S. et al., 1993).

Los starters como tales son usados como iniciadores de la fermentación láctica, proporcionando a las bacterias seleccionadas determinadas condiciones para favorecer su desarrollo y, de esta manera, su capacidad de producir ácido láctico a la mayor velocidad posible.

1.5.3. Factores que afectan la óptima performance de los cultivos starters

- Temperatura:

La óptima performance de las bacterias ácido lácticas normalmente es coincidente con la óptima temperatura de desarrollo de las especies. En algunos casos puede ser necesario considerar otros factores. En el caso de los cultivos starter para yogurt, formados por cultivos mixtos que usualmente contienen *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. termophilus*, donde las dos especies individualmente tienen temperaturas de desarrollo diferentes, una temperatura de 41-42°C es recomendable para el mantenimiento del balance de las dos especies.

- Tratamiento de la leche previo a la inoculación:

En la estandarización de la leche para la manufactura de productos fermentados, el tratamiento con calor es indispensable para la eliminación de microorganismos que pueden producir acciones adversas en el producto. El efecto del calor genera además algunas alteraciones en las proteínas de la leche, las que facilitan la utilización de las mismas por parte de las bacterias del starter.

Dado que las bacterias lácticas son naturalmente microaerófilas, el calentamiento de la leche puede jugar un rol importante en la reducción de la cantidad de oxígeno presente en el producto (Auclair J.E. et al, 1959).

Si la temperatura utilizada en el calentamiento de la leche es elevada, se induce la formación de ácido fórmico. La presencia de este componente puede resultar estimulante para el desarrollo de algunas especies de bacterias ácido lácticas.

- Requerimientos nutricionales.

En general los requerimientos nutricionales para el desarrollo de las bacterias ácido lácticas incluyen agua, un azúcar fermentable, una fuente de carbono y nitrógeno (preferentemente aminoácidos), vitaminas y otros cofactores. Todos los nutrientes esenciales para el crecimiento de estas bacterias están presentes en la leche. El problema es que éstos se presentan de manera que puede resultar dificultosa su utilización. Por ejemplo este es el caso de los aminoácidos esenciales localizados dentro de estructuras proteicas, las que deben ser hidrolizadas para lograr el aprovechamiento de aquellos (Thompson M. P. et al., 1974).

El nitrógeno no proteico de la leche puede ser inadecuado para cubrir las necesidades de crecimiento de las bacterias ácido lácticas (Thomas T. D. et al., 1981).

El desarrollo de *L. casei* es lento cuando la caseína es la fuente de nitrógeno, situación que se revierte cuando se utiliza peptona como suplemento en el medio de cultivo. Durante el crecimiento en leche *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aparentemente muestra preferencia por la utilización de β -caseína como fuente de nitrógeno, frente a otras proteínas. Esto demuestra que este tipo de proteínas tiene una importancia relevante en el desarrollo de estos cultivos (El Soda et al., 1978).

- Factores estimulantes.

Un numeroso grupo de sustancias puede ser considerado como productores de efectos estimulantes. Extracto de levadura, varias peptonas, extracto de hígado, macerado de maíz y jugo de tomates son algunos de estos compuestos. En general, estos estimulantes incluyen compuestos como peptonas, aminoácidos, vitaminas y otros cofactores. Por ejemplo, el macerado de maíz contiene aminoácidos y péptidos que son estimulantes del desarrollo de *L. casei*.

El jugo de tomates contiene tanto estimulantes como inhibidores de bacterias ácidolácticas. Los estimulantes en estas sustancias incluyen adenina y adenosina. El inhibidor principal es un nucleótido que contiene adenina y xilosa.

Otros compuestos estimulantes de las bacterias ácido lácticas son los ácido oleico y fórmico (Gilliland S., 2000).

- Metabolitos producidos por las lactobacterias.

El metabolito más importante producido por las lactobacterias en cultivos en leche es el ácido láctico. Considerando a las bacterias lácticas como ácido tolerantes, la cantidad de ácido láctico que se genera es limitada por el mismo desarrollo microbiano.

Al ser las bacterias lácticas catalasa negativas, metabólicamente algunas especies pueden producir peróxido de hidrógeno, que por lo tanto suele acumularse en el medio de cultivo y puede actuar como inhibidor de otras especies.

- Interacciones con otras bacterias de starter.

En los cultivos starter para yogurt, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. thermophilus* cultivadas conjuntamente, producen ácido más rápidamente que cada una de ellas desarrollando en forma aislada. Durante el crecimiento en leche, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* produce suficiente cantidad de aminoácidos libres, especialmente histidina, estimulando así el desarrollo y producción de ácido por parte del *S. thermophilus*. A su vez, *S. thermophilus* produce ácido fórmico cuando es estimulado por *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. También *S. thermophilus* produce suficientes cantidades de dióxido de carbono como para estimular el crecimiento y la acción de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Bautista E.S. et al., 1966; Accolas J. P. et al., 1977; Pette J.W. et al., 1950; Galesloot T.E. et al., 1968; Driessen F. M. et al., 1982; Moon N.J. et al., 1976).

- Antibióticos en leche.

La presencia de antibióticos residuales en leche es un problema importante en la manufactura de los productos lácteos. Muchos starters son sensibles a los antibióticos. Las lactobacterias no son la excepción en lo que respecta a la sensibilidad a bajos niveles de antibióticos.

- Bacteriófagos.

Se debe prestar especial cuidado en la manufactura de cultivos starter en lo que respecta al control de bacteriófagos. Se observa un patrón específico de fagos para bacterias lácticas, tal como es observado con otras especies bacterianas. Algunos de las lactobacterias muestran lisogénesis. Dentro del grupo de los estreptococos lácticos, las cepas tienen un muy estrecho rango para el patrón específico al que se ha atribuido por causas inmunitarias la frecuente lisogénesis. En algunas especies atenuadas se induce la formación de placas para lactobacterias lisogénicas a través del tratamiento de los cultivos con mitomicina, que elimina estructuras tipo fago. En cambio, algunos casos que no son formadores de placas, indican una relativa baja actividad correlacionada con la acción lítica de estos tipos de bacteriófagos. Los bacteriófagos para *L. casei* requieren iones Ca^{++} para la penetración en la célula huésped. Estos fagos también exhiben un rango óptimo de pH entre 5,5 y 6 y una temperatura de 30 °C (Peaje S. E. et al., 1978; Accolas J. P. et al., 1979; Yokokura T. et al; 1974; De Klerk H. C. et al., 1970; Stetter K. O. et al., 1978; Watanabe K. et al., 1972).

1.5.4. Starters mesófilos y termófilos. Usos industriales.

Los starters usados en productos lácteos pueden ser clasificados en mesófilos y termófilos, según su temperatura óptima de desarrollo. Los cultivos mesófilos crecen a temperaturas óptimas entre 10 y 40°C, con un valor medio de 30°C, mientras que los termófilos tienen un valor óptimo aproximado comprendido entre 40 y 50 °C.

Los cultivos starter mesófilos, compuestos por lactococos formadores de ácidos y productores de flavor, son usados para la fabricación de algunas variedades de quesos, productos lácteos fermentados y manteca. Los starter termófilos son usados en la producción de yogurt y en variedades de quesos con temperaturas de cocción altas (Emmental, Gruyere, Comte, Grana).

Los cultivos starter están compuestos usualmente por diferentes especies o por numerosas cepas de una misma especie, pudiendo así categorizarlos de la siguiente manera:

- Starter de cepa única: constituido por una sola cepa de cierta especie determinada.
- Starter de cepas múltiples: formado por diferentes cepas de una misma especie.
- Starter mezcla de cepas múltiples: integrado por diferentes cepas de diferentes especies.
- Starter de mezcla de cepas naturales: constituido por cepas y especies parcial o totalmente desconocidas.

Los tradicionales starters integrados por mezclas de cepas naturales son ampliamente usados, especialmente en leches fermentadas y en manteca. Todas las categorías son conocidas como starters casearios.

1.6. TECNOLOGÍA DE PRODUCCIÓN DE LOS CULTIVOS INICIADORES UTILIZADOS EN LA INDUSTRIA LÁCTEA

En la industria los cultivos iniciadores deben contener el mayor número posible de microorganismos viables, deben estar totalmente activos bajo condiciones de producción de lechería y deben estar exentos de contaminantes. Dando por sentado que la inoculación para dar inicio al proceso de obtención del cultivo se efectuará en condiciones asépticas y que el crecimiento se iniciará en un medio estéril, se sugiere que deben adoptarse uno de los dos siguientes principios para mantener la actividad del cultivo iniciador que se obtendrá al final del proceso:

- Reducir y/o controlar la actividad metabólica de los microorganismos.
- Separar los microorganismos de sus productos de desecho.

El primer principio se efectiviza con el uso de la refrigeración, mientras que la separación de los desechos se lleva a cabo durante la concentración del cultivo, en la producción de cultivos iniciadores concentrados, ya sea que esta producción se lleve a cabo mediante procesos continuos o discontinuos.

1.6.1. Métodos de producción

Para disponer de una reserva de microorganismos importantes, la metodología de producción y conservación de los cultivos iniciadores constituye un aspecto fundamental. Esto evitará la inducción de mutantes que a largo plazo darán lugar a alteraciones del comportamiento global y de las características generales del cultivo.

La provisión final a la industria láctea de los cultivos iniciadores plenamente activos puede realizarse mediante la implementación de distintas estrategias, que conducen a la existencia de los siguientes tipos diferentes de starters lácteos:

- 1) Cultivos iniciadores líquidos.
- 2) Cultivos iniciadores deshidratados.
 - a- Deshidratados por atomización.
 - b- Liofilizados.
 - c- Concentrados liofilizados.
- 3) Cultivos iniciadores congelados.
 - a- Congelados a -40°C .
 - b- Ultracongelados a -196°C en nitrógeno líquido.

Cultivos iniciadores líquidos.

El estado líquido ha sido durante mucho tiempo la forma más habitual y más utilizada para la manipulación de los cultivos en las fábricas de productos lácteos. Los cultivos iniciadores se conservan habitualmente en pequeñas cantidades y es necesario tener un volumen apropiado para la fabricación de cualquier producto; por ello, se requiere primero propagarlos de la siguiente manera:

Cultivo “stock” → Cultivo “madre” → Cultivo intermedio → Cultivo para la producción.

La actividad de los cultivos iniciadores depende de una serie de factores, tales como la velocidad de enfriamiento después de la inoculación, la acidez final alcanzada y la temperatura y duración del tiempo de almacenamiento.

El medio inoculado se incuba durante un período de tiempo corto y se conserva bajo condiciones de refrigeración normales. La reactivación necesita realizarse sólo cada tres meses.

Esta tecnología ya ha sido totalmente abandonada en la práctica en las industrias lácteas de mediana o gran producción, y sólo puede encontrarse aún en pequeñas industrias más bien de tipo artesanal.

Cultivos iniciadores deshidratados.

Un método alternativo de conservación de cultivos iniciadores es la deshidratación. El desarrollo de tal proceso persigue evitar el trabajo que implica el mantenimiento de los cultivos “stock” en medio líquido. Asimismo, facilita el comercio de los cultivos sin que pierdan actividad. La deshidratación al vacío genera cultivos con 1-2 % de bacterias viables y puede requerir varios subcultivos antes de que recupere su máxima actividad.

Se puede lograr una máxima viabilidad de los microorganismos del cultivo iniciador efectuando una deshidratación por atomización, de esta manera se logra un cultivo tan activo como uno líquido de 24 horas.

Los cultivos liofilizados se preparan deshidratando el cultivo iniciador una vez congelado. Esto proporciona una mayor viabilidad de los microorganismos que componen el cultivo.

Se ha observado que tanto el proceso de congelación como el de deshidratación pueden producir daños en la membrana celular de las bacterias, pero este efecto se

minimiza mediante la adición de ciertos agentes protectores criogénicos antes del proceso. Estas sustancias tienen grupos que forman puentes de hidrogeno y/o iónicos que interaccionan con los componentes de la membrana celular, evitando así las lesiones.

Se han estudiado las condiciones óptimas para la producción de cultivos iniciadores liofilizados y se han obtenido una serie de conclusiones en relación con la viabilidad de los cultivos lácticos liofilizados, siendo las siguientes las más importantes:

- 1) La mayoría de las bacterias lácticas se conservan bien por este procedimiento.
- 2) La propagación de los cultivos iniciadores en leche enriquecida con extracto de levadura y proteína hidrolizada permite recuperar un porcentaje mayor de supervivientes, y al aumentar la concentración celular del cultivo a valores superiores a 10^{10} células mL⁻¹, puede obtenerse un número de bacterias viables mayor en el cultivo deshidratado.
- 3) Los cultivos iniciadores son menos sensibles a la congelación y deshidratación cuando las células se recogen en la última etapa de la fase exponencial de crecimiento, con excepción de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. lactis* subsp. *cremoris*, que son más resistentes en la primera parte de la fase estacionaria.
- 4) Los medios con un pH entre 5 y 6 son más favorables para obtener una mejor viabilidad celular y una mayor neutralización del medio durante el crecimiento.
- 5) El medio de suspensión más adecuado para las células cosechadas depende del tipo de microorganismo.
- 6) El contenido de humedad en los cultivos deshidratados debe ser inferior al 3 %.
- 7) Los cultivos deshidratados mantenidos entre 5 y 10° C presentan una mayor viabilidad tras el almacenamiento prolongado que los mantenidos a temperatura ambiente.

8) Los cultivos deshidratados deben ser envasados al vacío a causa de la sensibilidad al oxígeno de los microorganismos así conservados.

9) El material más difundido para el envasado de estos cultivos es el aluminio laminado; con el nylon se ha observado una disminución de la viabilidad de los microorganismos debido al oxígeno que difunde a través del material.

10) Los cultivos congelados entre -20 y -30° C y deshidratados entre -10° C y 30°C presentan una gran actividad una vez finalizada la liofilización.

11) Los compuestos carbonílicos, tales como piruvato y diacetilo, reaccionan con los grupos amino de las bacterias deshidratadas, lo que puede acelerar su muerte. Se recomienda que este tipo de sustancias se separen durante la recolección de las bacterias. Cuando la conservación se lleva a cabo por períodos largos, el medio de suspensión debe ser enriquecido con azúcares no reductores, aminoácidos y/o semicarbada.

12) La temperatura de rehidratación puede ocasionar pérdida de ribonucleótidos procedentes de las células lesionadas.

Los cultivos iniciadores conservados por liofilización tienden a tener una conservación bastante prolongada, y si no son concentrados se utilizan como inóculos para la preparación del cultivo "madre". Se necesitan mayores concentraciones celulares (cultivos liofilizados concentrados) cuando se utilizan para la inoculación directa; asimismo, la propagación del inóculo puede requerir un tiempo mayor que el habitual.

Cultivos iniciadores congelados.

Los cultivos iniciadores líquidos (“madre” o intermedio) pueden conservarse mediante congelación entre -20 y -40°C durante algunos meses. Esta operación se realiza en los laboratorios centralizados y los cultivos congelados se dispersan a las lecherías, cuando es necesario, para su utilización como inóculo directo. La congelación y el almacenamiento prolongado en este estado puede dañar a ciertos lactobacilos, pero el uso de un medio con la concentración adecuada de leche descremada, sacarosa, crema fresca y cloruro de sodio permite una mayor viabilidad celular.

Aunque se ha demostrado que la congelación a -40° C es un procedimiento útil para la conservación de cultivos iniciadores, la ultra congelación a -196°C en nitrógeno líquido es el mejor método. Las ventajas de este método son la comodidad, seguridad de cultivo, fiabilidad y balance de cepas diario, mayor flexibilidad, control de fagos más adecuado y mejora de la calidad. Entre las desventajas podemos citar la dificultad en el suministro de nitrógeno líquido, el mayor costo, la mayor dependencia de los proveedores de cultivo y el desconocimiento de soluciones rápidas en el caso de error (Robinson R.K., 1987).

1.6.2. Medios y condiciones de desarrollo.

En la elección de un medio de desarrollo se deben considerar varios aspectos, siendo los más importantes el costo y facilidad de generación de un alto número de células con buena actividad.

El uso de suero o permeado de quesería como medios de cultivo ha sido estudiado debido a sus bajos costos y al contenido de nutrientes que los hace útiles para el desarrollo de cepas de starters. Cuando el desarrollo máximo esperado no se logra, se

enriquece el medio con la adición de suplementos nutricionales extras. Este agregado puede acarrear una precipitación indeseada en el medio y debe realizarse una clarificación posterior.

La leche descremada ha sido el medio más comúnmente usado para lactococos, y las dificultades de recolección han sido superadas con la adición de citrato de sodio.

Los nutrientes complejos tales como leche descremada, lactosuero, extracto de levadura y peptonas son usados para satisfacer demandas complejas de los microorganismos de starters.

Con ciertos nutrientes o aditivos se puede mejorar la resistencia en los procesos repetidos de concentración/congelamiento/deshidratación. Los mismos son cepa dependientes. La actividad y el recuento celular de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* luego del congelamiento a -196°C puede aumentar considerablemente si sus células han crecido en un medio apropiado suplementado con Tween 80. Estos mismos resultados se encontraron a -17°C . El ácido oleico presente en Tween 80 fue identificado como un compuesto efectivo para aumentar la estabilidad de los procesos que tienden a elevar los niveles de ácido graso de 19 átomos de carbono en la fracción lipídica de la célula. La mayoría de los ácidos grasos de las bacterias están localizados en la membrana celular, y considerando que la composición de la membrana celular es muy importante para la subsistencia en el frío, pueden aumentar la flexibilidad de la membrana y la consecuente resistencia al congelamiento.

La adición de $100\ \mu\text{M}$ o $1\ \text{mM}$ de calcio tiene influencia en la criorresistencia de los lactobacilos, tanto si se encuentran dispuestos en largas cadenas de células como en pequeños grupos irregulares. El magnesio y el manganeso no mostraron este efecto.

Las principales condiciones que durante la propagación afectan el crecimiento celular y la actividad de los cultivos son:

- Temperatura
- pH
- Agitación (contenido de oxígeno)
- Tipo de neutralización utilizada

También el tiempo relativo de congelamiento/descongelamiento afecta la curva de crecimiento celular (Salminen et. al., 1993).

OBJETIVOS

Teniendo en cuenta que el Grupo de Investigación del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de esta Universidad ha logrado obtener y patentar fracciones peptídicas a partir de hidrolizados caseínicos con probada acción estimulante del crecimiento de células de insectos, se ha propuesto oportunamente llevar a cabo estudios conjuntos sobre esta temática.

Los mismos tendrán por **objetivo general** determinar la acción de esos hidrolizados caseínicos sobre el crecimiento y las propiedades tecnológicas de cepas de colección propia de bacterias del ácido láctico, cuando ellos se agregan en concentraciones variables a distintos medios utilizados para la propagación de estos microorganismos. De este modo se pretende contribuir al desarrollo de una temática de interés tecnológico siempre vigente, como lo es la de optimizar medios de cultivos cada vez más económicos para la producción de starters lácticos concentrados, teniendo en cuenta no sólo la consecución de altas poblaciones celulares sino también el mantenimiento de un estado fisiológico celular de alta performance.

Para tender al logro de este objetivo central, se plantea la investigación y estudio de los siguientes **objetivos específicos**:

- Obtención y purificación de las distintas fracciones peptídicas a partir de un hidrolizado de caseína comercial.

- Determinación del efecto provocado por los hidrolizados caseínicos totales y fraccionados sobre la cinética de crecimiento de cepas de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*) de colección propia, obtenidas de alimentos fermentados comerciales y artesanales de la región, cuando las mismas desarrollan en medios de cultivo económicos, como los formulados a base de suero o permeado de quesería. Como referencia se utilizarán los medios comerciales de elevado costo aconsejados para su cultivo, como los caldos MRS y M 17.

- Investigación de la influencia del agregado de los hidrolizados caseínicos totales y fraccionados sobre el estado fisiológico de las bacterias, mediante la determinación comparativa de propiedades tecnológicas de relevante interés, como lo son las actividades acidificante, proteolítica y lipolítica y la producción de inhibidores tipo bacteriocinas.

- Determinación de la capacidad de crecimiento en leche de las células de las distintas especies de bacterias ácido lácticas propagadas previamente en los medios con agregado de los hidrolizados caseínicos, utilizando como referencia a las células obtenidas de propagaciones en los medios comerciales.

MATERIALES Y METODOS

1- Fraccionamiento de un hidrolizado enzimático de caseínas.

Se utilizó un hidrolizado enzimático comercial de caseínas (N-Z- CASE PLUS From Bovine Milk, Sigma N- 4642).

Como primera etapa el hidrolizado se fraccionó mediante cromatografía de filtración por geles, con el objetivo de obtener fracciones con diferente peso molecular, y posteriormente las mismas fueron liofilizadas y almacenadas a -20°C. El seguimiento del proceso cromatográfico se realizó por medición espectrofotométrica de la absorbancia de cada una de las fracciones recolectadas, las que posteriormente fueron analizadas por cromatografía en capa delgada y finalmente por cromatografía líquida de alta presión.

Cromatografía de filtración por geles

Se utilizó una columna de vidrio de 2,4 cm de diámetro interno y 40,0 cm de largo con una placa de vidrio poroso prensado en la parte inferior y con un regulador de elución. Se colocaron dos prefiltros de polipropileno, uno previo al vidrio poroso y otro en la parte superior del lecho, y la columna se rellenó con Sephadex G25 Medium (Pharmacia) (30g de resina generaron un volumen aproximado de 150 mL de gel). Luego de equilibrada, la columna se cargó con 400 mg de hidrolizado de caseínas comercial (Sigma) disueltos en 4 mL de agua. La elución se realizó con agua ultrapura grado Milli Q (velocidad de flujo: 1 gota por segundo).

Se utilizó Blue dextran (Sigma, St. Louis, MO, USA) para medir el volumen muerto de la columna.

Se recolectaron fracciones de 1,5 mL y se midió la absorbancia de cada una de ellas a 280 nm, en un Espectrofotómetro UV-VIS (Metrolab, modelo 1700). Las fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa delgada ascendente.

Se obtuvieron cuatro fracciones, identificadas como A, B, C y D.

Todas las fracciones fueron concentradas al vacío, en un evaporador rotatorio (Büchi, modelo B-169) y posteriormente fueron liofilizadas (liofilizador semiindustrial marca Rificor modelo L-I-E 300-CRT) para su posterior almacenamiento y conservación.

Cromatografía en capa delgada

Soporte: Se utilizaron placas de silicagel GF 254 (Sigma)

Sistema de solventes: n-butanol: ácido acético: agua (40:15:30).

Reactivo de visualización: ninhidrina (0,2 g) y 0.1 mL de piridina. Se llevó a 100 mL con etanol absoluto.

Luego de la aspersion con el reactivo de ninhidrina, se llevó a estufa (100 °C) durante 5 minutos.

Cromatografía Líquida de alta presión (HPLC)

Las fracción A obtenida mediante cromatografía por filtración por geles fue analizada y fraccionada por HPLC en fase reversa, en un equipo Gilson (USA). A tal fin se utilizó una columna de fase reversa (C18) (90 Å, 10 µm, 10 mm i.d. x 250 mm). Solvente A: agua conteniendo 0.1 % de TFA. Solvente B: acetonitrilo conteniendo 0.1 % de TFA. Se empleó un detector UV, y la detección se realizó a 220 nm. Las fracciones fueron colectadas y concentradas en vacío, y posteriormente almacenadas a -20 °C.

Identificación de los principales constituyentes de la fracción A

Los constituyentes fueron analizados por espectrometría de masas, empleando la técnica Maldi-Tof (ionización: desorción por láser asistida por matriz; analizador: tiempo de vuelo) en un equipo Kratos MALDI-III Analytical Kompact (V5.2.0). La determinación de las secuencias se realizó por Degradación de Edman. Estos estudios se realizaron en el Instituto GBF, Braunschweig (Alemania).

2- Cepas de bacterias del ácido láctico utilizadas.

Se utilizaron 7 cepas de bacterias del ácido láctico pertenecientes a la colección propia del Área Microbiología y Biotecnología de la FIQ (UNL). Estas cepas fueron seleccionadas en función de los resultados arrojados por estudios realizados previamente relativos a algunas de sus propiedades de interés tecnológico.

Las mismas han sido aisladas a partir de leche cruda, productos lácteos y productos cárnicos producidos industrial o artesanalmente en la región santafesina.

A continuación se detalla la ubicación taxonómica, la identificación y el origen de cada una de las 7 cepas utilizadas en el estudio:

Enterococcus faecalis E24 (cepa aislada a partir de leche cruda)

Enterococcus faecalis E30 (cepa aislada a partir de leche cruda)

Enterococcus faecium E23 (cepa aislada a partir de leche cruda)

Lactobacillus plantarum Lp31 (cepa aislada a partir de embutido cárnico)

Streptococcus thermophilus Ch3-4 (cepa aislada a partir de starter láctico comercial)

Lactococcus lactis subsp. *lactis* Sf 1-1 (cepa aislada a partir de suero fermento artesanal)

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* Lb 92 (cepa aislada a partir queso de producción industrial).

3-Conservación de las cepas (Heckly R. J., 1978).

Cada una de las cepas en estudio fue inoculada en 10 mL de medio de cultivo adecuado [Caldo MRS o Caldo M17 (Merck), según se tratase de bacilos o cocos lácticos, respectivamente] y se procedió a incubar los cultivos durante una noche a 37°C (cultivos overnight).

Se centrifugó el cultivo así obtenido durante 15 minutos a 3000 rpm y se descartó el sobrenadante límpido.

Las células recuperadas se lavaron dos veces con un volumen aproximadamente igual al del sedimento celular de solución fisiológica (solución de NaCl en agua destilada al 0,85% p/v).

El sedimento celular fue luego resuspendido en 2 mL de solución protectora, constituida por el mismo caldo utilizado para el desarrollo al cual se le adicionó un 15% de glicerol.

Estas suspensiones celulares fueron finalmente fraccionadas en tubos de vidrio con tapa roscada y conservadas en freezer a –20°C y en ultrafreezer a –80°C.

4- Activación de las cepas.

Se partió de los cultivos puros conservados a -20 ó a -80°C , los que fueron resembrados en caldo MRS o M17 (Merck), según corresponda, e incubados durante 24 horas a 37°C .

Pasado este período se procedió a realizar observaciones microscópicas de cada uno de los cultivos activados, realizando coloraciones simples y de Gram, a fin de verificar las características morfológicas típicas de cada una de las cepas, así como la ausencia de potenciales contaminantes.

5- Estandarización de los cultivos bacterianos.

Para realizar los estudios correspondientes a la determinación del crecimiento bacteriano en los diferentes medios de propagación a ensayar, se procedió a estandarizar las poblaciones celulares iniciales de cada una de las cepas, de modo que en cada ensayo se partiese de una concentración celular conocida, que permitiese luego efectuar una comparación válida de los resultados obtenidos.

Para ello, partiendo de los cultivos conservados se realizó una activación de cada una de las cepas durante dos días consecutivos. Con el último cultivo obtenido de estas propagaciones se procedió a realizar las diluciones adecuadas en solución fisiológica estéril, de modo de lograr un inóculo inicial para todos los ensayos que tuviese un valor de densidades ópticas de 0.80, determinado con un espectrofotómetro BOECO S-22 UV-VIS, a una longitud de onda de 560 nm. Este valor correspondió siempre, según la experiencia propia actual y previa y en forma concordante con los datos hallados en la bibliografía, a una concentración celular comprendida entre valores de 10^8 y 10^9 UFC/mL.

6- Determinación de las curvas de evolución de las poblaciones bacterianas.

6.1- Condiciones de cultivo:

Los cultivos se desarrollaron en cinco medios diferentes, con la finalidad de poder realizar los estudios comparativos posteriores relativos a la influencia de los hidrolizados caseínicos total y fraccionado sobre el desarrollo microbiano.

Cuatro de los cinco medios utilizados fueron formulados de manera individual, utilizando como base para su preparación suero de quesería previamente tratado. El quinto fue un medio de cultivo comercial, especialmente aconsejado para el desarrollo de cocos o de bacilos lácticos, y el cuarto fue un medio a base de lactosuero con el agregado de peptona de carne. Ambos se utilizaron como referencia para comparar los resultados obtenidos con los medios a base de lactosuero adicionados con los hidrolizados caseínicos (Scarinci y col., 1994), (Carrasco y col., 2005).

Todos los ensayos para determinar la evolución característica de las poblaciones celulares de cada una de las cepas bacterianas en estudio, se realizaron incubando los cultivos a 37°C durante un período máximo de 24 horas.

6.2- Preparación del suero de quesería:

Se pesaron 70 gramos de lactosuero deshidratado comercial, y se disolvieron en 1 litro de agua destilada.

Esta solución, que contiene un 5% (p/v) de lactosa, fue equilibrada a pH 4,25 (punto isoelectrico de la caseína) con H₃PO₄ al 50% (v/v).

Luego se la sometió a un tratamiento en autoclave durante 30 minutos, calentando a 100°C (vapor fluente), a fin de precipitar las proteínas presentes.

Una vez enfriada la solución se la filtró empleando papel Wathman N°2 y se le agregó peptona al 2 % (p/v) y $MnSO_4$ al 0,2% (p/v).

Posteriormente fue tratada nuevamente en autoclave a 100°C durante 15 minutos y, en caso de observar la aparición de precipitado después de este segundo tratamiento térmico, nuevamente se repitió el filtrado.

Una vez que se logró obtener una solución límpida (y por lo tanto desproteinizada), se la esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 115°C, o bien por filtración utilizando un equipo Millipore con membranas filtrantes de 0,45 μm de diámetro de poro (Scarinci H. y col., 1997).

6.3-Medios de cultivo utilizados:

- Suero de quesería en polvo (comercial) rehidratado y adicionado con un 2% (p/v) de hidrolizado total de caseína (Sigma).

-Suero de quesería en polvo (comercial) rehidratado y adicionado con un 2% (p/v) de hidrolizado de caseína fraccionado (fracción A).

-Suero de quesería en polvo (comercial) rehidratado y adicionado con un 4% (p/v) de hidrolizado de caseína fraccionado (fracción A).

-Suero de quesería en polvo (comercial) rehidratado y adicionado con un 2% (p/v) de peptona de carne (medio de referencia).

-Caldos MRS o M17 (Merck), medios comerciales de uso muy extendido, especialmente recomendados para el desarrollo de bacilos y de cocos lácticos, respectivamente, y también utilizados como medios de referencia en este trabajo.

Los cultivos finales de cada cepa en cada medio a ensayar se obtuvieron a partir de siembras con los respectivos precultivos, con una concentración celular que fue previamente estandarizada, y aplicando una relación de siembra del 0,1 % (v/v).

6.4-Determinación de la cinética de crecimiento.

Con 0.3 mL del último precultivo de cada una de las cepas, previamente estandarizado en lo que respecta al valor de concentración celular por medida de las densidades ópticas, se inoculó un volumen final de 30 mL de cada uno de los cinco medios de cultivo a ensayar, previamente descritos, y se procedió a su incubación a 37°C durante un período total de 24 horas.

Inmediatamente después de efectuada la siembra (hora cero) se tomó una alícuota de 2 mL del cultivo y se midió el valor de densidades ópticas a 560 nm, en un espectrofotómetro BOECO S-22 UV-VIS. Por otra parte, se tomó otra alícuota de 1 mL y a partir de ella se realizaron diluciones decimales sucesivas hasta 10^{-7} , utilizando agua peptonada (1g de peptona bacteriológica en 1000 mL de agua destilada) como diluyente. Se tomaron alícuotas de cada una de estas diluciones y se sembraron, por duplicado y en profundidad, en placas de Petri a las que se agregaron 15 mL de agar LAPT_{LAC5}. Las placas inoculadas se incubaron durante 36 h a 37°C, luego de lo cual se procedió a contar el número de colonias desarrolladas, eligiendo las placas que contenían entre 30 y 300 colonias.

Durante las 24 horas siguientes y con intervalos de 2 horas, se repitieron en cada cultivo los ensayos de medidas de DO y de conteos microbiológicos, para luego graficar los resultados y así obtener las curvas representativas de la cinética de crecimiento (o de evolución poblacional) de cada cepa en cada uno de los medios de cultivo en ensayo.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, y los resultados se expresaron como promedios de los valores individuales obtenidos en cada determinación.

7- Propiedades tecnológicas.

A partir de cultivos de cada cepa en cada uno de los medios de propagación ensayados, se procedió a cosechar las células en la fase logarítmica de crecimiento (12 a 18 horas de incubación) y a preparar suspensiones celulares estandarizadas, siguiendo la metodología ya descrita.

Estas suspensiones celulares estandarizadas se utilizaron como inóculo para la siembra de los distintos sustratos empleados para determinar las diferentes propiedades tecnológicas.

7.1- Actividad acidificante.

10 mL de leche descremada en polvo reconstituida al 10% (p/v), se inocularon con 1 mL de cada una de las suspensiones celulares previamente estandarizadas y se incubaron a 37 °C por términos de 12h, 24h, 48h y 5 días. Al cabo de esos tiempos de incubación se procedió a determinar la acidez total generada.

La acidez, expresada en grados Dornic (°D), fue determinada por titulación con solución patrón de NaOH (N/9). La actividad acidificante se expresó como Δ de acidez promedio de tres medidas realizadas en los distintos períodos de tiempo, enfrentadas contra blanco de acidez determinado sobre leche sin cultivar (Carrasco y col., 1992).

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, y los resultados se expresaron como promedios de los valores individuales obtenidos en cada determinación.

7.2- Actividad lipolítica.

Se prepararon cultivos a partir de 10 mL de leche descremada en polvo reconstituida al 10% (p/v), que se inocularon con 1 mL de cada una de las suspensiones bacterianas previamente estandarizadas y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Luego de la incubación se tomaron alícuotas de 3 mL de cada cultivo y se las sometió a una extracción de los ácidos grasos libres mediante tratamiento con 10 mL de una mezcla de solventes (isopropanol: éter de petróleo: H₂SO₄ 4N, en una relación 40: 10: 1).

Una vez generadas dos fases, se procedió a separar la superior (generalmente 7,5 mL) y se la tituló con KOH 0.02 N, utilizando fenolftaleína metanólica como indicador.

Para el cálculo de la concentración de los ácidos grasos libres se utilizó la siguiente expresión:

$$\frac{T \times N \times 10^3}{P \times 3}$$

Donde:

T: Volumen neto de la titulación (mL).

N: Normalidad de la solución de KOH metanólico (meq/mL).

P: Proporción de la fase superior titulada (volumen de la alícuota / volumen total de la fase superior).

3: Volumen de leche (mL).

El contenido de ácidos grasos libres se expresó como μ equivalentes / mL (Deeth and Fitz Gerald, 1975).

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, y los resultados se expresaron como promedios de los valores individuales obtenidos en cada determinación.

7.3- Actividad proteolítica.

Se realizó según el denominado Test del aldehído ftálico (OPA).

De cultivos en leche de 24 horas de incubación, obtenidos a partir de 10 mL de leche descremada en polvo reconstituida al 10% (p/v), que se inocularon con 1 mL de cada una de las suspensiones bacterianas previamente estandarizadas, se tomó una alícuota de 2,5 mL a la que se le agregaron 0,5 mL de H₂O destilada y se la trató con 5 mL de TCA (ácido tricloroacético). Se agitó la mezcla con vórtex y luego de dejarla reposar durante 10 minutos se la filtró con papel Whatman N°2. Se tomó una fracción de 100 μ L del filtrado y se la hizo reaccionar con 2 mL del reactivo de OPA durante 2 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se determinó la absorbancia de la mezcla de reacción en espectrofotómetro BOECO S-22 UV-VIS, a una longitud de onda de 340 nm, efectuando las lecturas contra blanco de reactivo.

Composición del reactivo de OPA:

25 mL de tetraborato de sodio 100 mM, 100 μ L de β -mercaptoetanol, 2,5 mL de SDS (dodecil sulfato de sodio) al 20% (p/p) y 40 mg de OPA (aldehído ftálico) disueltos en 1 mL de metanol. El volumen final del reactivo se ajustó a 50 mL mediante la adición de la cantidad necesaria de agua destilada.

Para el cálculo de los resultados se utilizó la siguiente fórmula (Church y col. 1983).

$$n = \Delta A_{340\text{nm}} / \epsilon M F$$

Donde:

n: Número de enlaces peptídicos hidrolizados en el tiempo de reacción.

ΔA : Variación de la absorbancia observada experimentalmente a 340nm.

ϵ : Absortividad molar de grupos α y ϵ amino medidos a 340 nm ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

M: Concentración molar de proteínas (Mol/ L).

F: Factor de dilución.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, y los resultados se expresaron como promedios de los valores individuales obtenidos en cada determinación.

7.4- Determinación de la capacidad de producción de bacteriocinas.

Se determinó según la siguiente secuencia:

7.4.1-Obtención de los sobrenadantes libres de células: suspensiones bacterianas previamente estandarizadas de cada una de las cepas en estudio se cultivaron en 50 mL de medio de cultivo adecuado (Caldo M17 o Caldo MRS) (Merck) a 37°C y durante una noche (cultivo overnight). Para obtener los sobrenadantes libres de células los cultivos fueron centrifugados a 6000 rpm por un período de 15 minutos a una temperatura de 5 °C. Los sobrenadantes fueron concentrados 10 veces, utilizando destilación a presión reducida en rotavapor a 70°C, y luego esterilizados por filtración con sistema Millipore, empleando membranas de 0,20 µm de diámetro de poro. Los sobrenadantes fueron conservados a -20 °C.

7.4.2-Determinación de la capacidad inhibitoria: se determinó aplicando el ensayo de difusión en agar. Se prepararon placas de Petri con 20 mL de Agar Nutritivo (Merck), inoculados con 1 mL de cultivo estandarizado de bacterias blanco previamente seleccionadas y propagadas durante una noche (cultivo overnight).

A la placas así acondicionadas se les realizaron pocillos u orificios de 7 mm de diámetro, en los cuales se sembraron 60 µL del sobrenadante obtenido del cultivo de cada microorganismo en estudio.

Luego de 24 horas de incubación a 37°C se determinó la medida en milímetros de las zonas translúcidas correspondientes a los halos de inhibición.

Como bacterias blanco se emplearon cepas de especies Gram positivas y Gram negativas reconocidas como alteradoras de alimentos y/o causantes de enfermedades de transmisión alimentaria, todas pertenecientes a la colección

propia del Área Microbiología y Biotecnología de la FIQ (UNL) (Carrasco M. y col.,1997) (Simonetta A.y col.,1998) (Martínez Magro M. y col., 2000). Las mismas se detallan a continuación:

-*Bacillus cereus* DBFIQ Bc 28

-*Bacillus subtilis* DBFIQ Bs 11

-*Escherichia coli* DBFIQ Ec 9

-*Pseudomonas* sp. DBFIQ P 55

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, y los resultados se expresaron como promedios de los valores individuales obtenidos en cada determinación.

8- Capacidad de crecimiento en leche.

La capacidad de desarrollo en leche, medida como concentración celular máxima alcanzada por cada cepa en ensayo, luego de 24 h de incubación en dicho medio a 37°C, se determinó de acuerdo a la técnica de Kanasaki (1975) modificada por Thomas y Turner (1977).

Para la activación de los microorganismos se procedió del siguiente modo:

Las siete cepas en estudio fueron activadas por propagación durante 24 horas, a 37°C, en los Caldos MRS o M17 (Merck), según lo más conveniente para cada tipo de microorganismo en particular. Luego los cultivos fueron centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos, las células resuspendidas en solución fisiológica, y las concentraciones celulares de estas suspensiones fueron estandarizadas en un valor de DO de 0.80, determinado a 560 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro BOECO S-22 UV-VIS.

Con 1 mL de cada una de estas suspensiones estandarizadas se procedió a inocular 9 mL de algunos de los medios de cultivo en estudio en el presente trabajo, los que se incubaron durante 24 h a 37°C. Para realizar los ensayos se seleccionaron tres de los cinco medios de propagación previamente estudiados, habiéndose elegido a aquellos que arrojaron los mejores resultados en lo que respecta al crecimiento de las cepas de bacterias ácidolácticas, los que se detallan a continuación:

-Suero de quesería en polvo (comercial) rehidratado y adicionado con un 2% (p/v) de hidrolizado total de caseína (Sigma).

-Suero de quesería en polvo (comercial) rehidratado y adicionado con un 4% (p/v) de hidrolizado de caseína fraccionado (fracción A).

-Caldos MRS o M17 (Merck).

Luego de recuperar las células de cada una de estas propagaciones por centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos, de lavar tres veces los sedimentos bacterianos con solución fisiológica estéril y de estandarizar su concentración en un valor de D.O. de 0.80 (determinado a 560 nm de longitud de onda en espectrofotómetro BOECO S-22 UV-VIS, siguiendo la metodología ya descrita), se procedió a sembrar alícuotas de 10 mL de leche descremada en polvo reconstituida al 10% (p/v) con 1 mL de las suspensiones estandarizadas de cada propagación. Estos cultivos en leche se incubaron a 37°C durante 24 h, procediendo al cabo de este tiempo de incubación a evaluar la concentración celular alcanzada por cada cepa en estudio, mediante medidas de la turbidez.

La metodología utilizada en esta última etapa fue la aconsejada por Kanasaki (1975), luego modificada por Thomas y Turner (1977):

A 0.5 ml de cada cultivo en leche, adecuadamente homogeneizado, se lo hizo reaccionar con 4,5 mL de solución de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) al 0.2 % (p/v) en agua a pH controlado en un valor de 12 mediante el agregado de NaOH 20 M. La mezcla reaccionante fue agitada vigorosamente y luego se procedió a la determinación de su turbidez, expresada como valores de DO leídos a temperatura ambiente y a 480 nm de longitud de onda, en un espectrofotómetro BOECO S-22 UV-VIS.

Los valores de DO determinados de este modo son proporcionales a la concentraciones celulares bacterianas presentes en la mezcla de reacción, y por lo tanto en 0,5 mL de cada cultivo en leche ensayado.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, y los resultados se expresaron como promedios de los valores individuales obtenidos en cada determinación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los hidrolizados de proteínas y los extractos de proteínas completas son habitualmente incorporados en los medios de cultivo como aditivos, para promover el crecimiento de células eucariotas (Coste, M. et al., 1992; Sutas, Y. et al., 1996; Medigan M.T. et al, 2004).

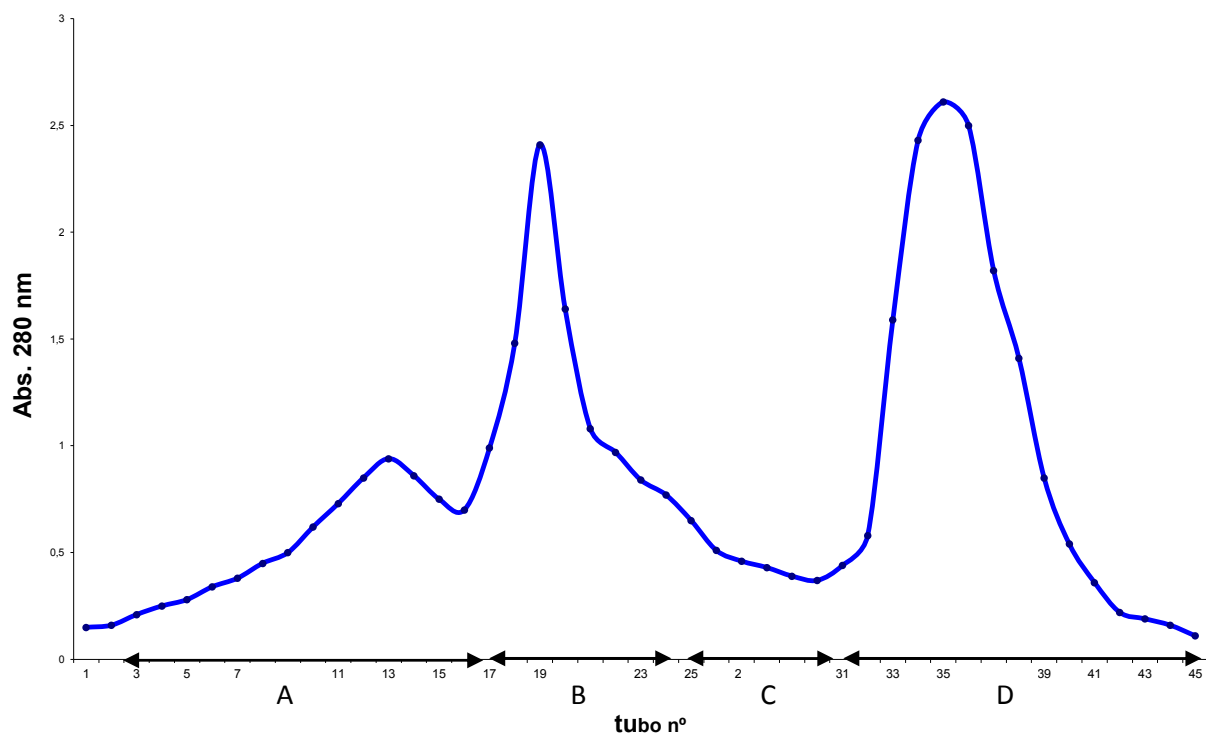
Integrantes del grupo de trabajo asociado a esta Tesis han demostrado previamente que un hidrolizado enzimático comercial de caseína bovina, y en particular una fracción obtenida a partir de él, ha sido capaz de promover el crecimiento de la línea celular de insecto IPLB-Sf21 (*Spodoptera frugiperda*). Además, se pudo observar que la hidrólisis ácida completa de estas fracciones producía una pérdida total de la actividad, evidenciando que la capacidad promotora estaría asociada a la presencia de péptidos procedentes de las diferentes caseínas (Claus J.C. et al., 2003)

Dado que el conocimiento sobre la potencial actividad promotora de estos péptidos sobre el crecimiento de diferentes organismos procariotas no ha sido aún explorado, en esta Tesis se ha evaluado el efecto de la adición del hidrolizado completo y de una fracción en particular, identificada como fracción A, a medios de cultivos destinados a la propagación de bacterias ácido lácticas para su posterior utilización en la preparación de cultivos starters para la industria alimentaria.

1.- Fraccionamiento del hidrolizado caseínico.

El primer paso empleado para el fraccionamiento del hidrolizado enzimático de caseínas fue la Cromatografía de Filtración por geles. La única información disponible sobre el hidrolizado de partida consistía en saber que se trataba de un hidrolizado obtenido por tratamiento con tripsina y quimotripsina. Sobre la base de esta información, y analizando las secuencias de las caseínas, se consideró oportuno comenzar el fraccionamiento empleando una columna de Sephadex G25 (rango de fraccionamiento 1000 a 5000 Da). Los resultados se presentan en la Figura N°9, donde se muestran las cuatro fracciones obtenidas, identificadas como A, B, C y D.

Figura 9: Fraccionamiento por Sephadex G25.



Referencias: Tubos 1-15, Fracción A; tubos 16-22, Fracción B; tubos 23-30, Fracción

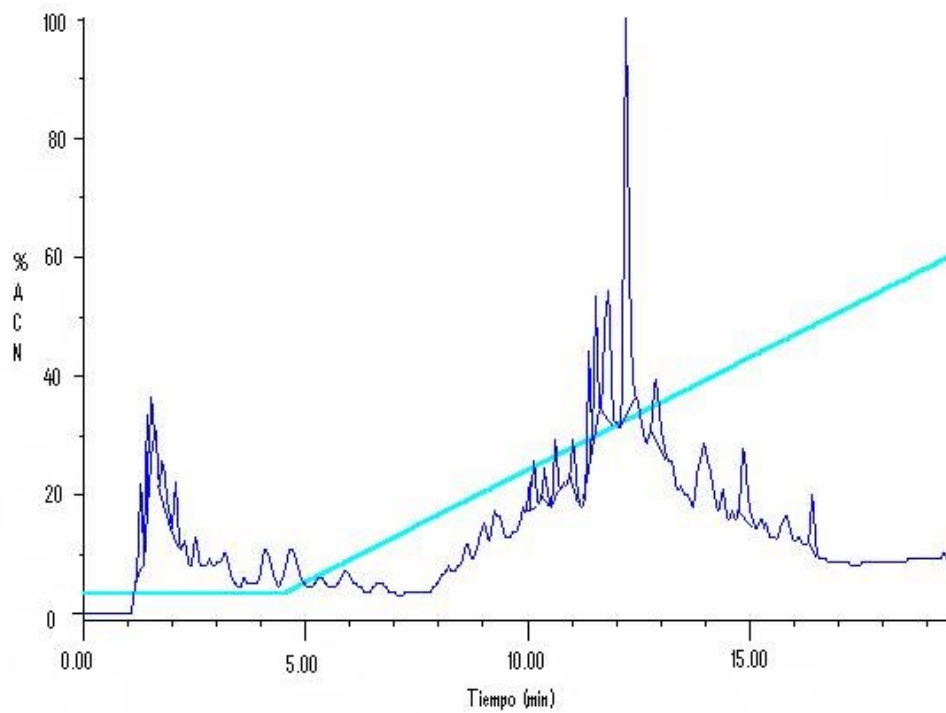
C; tubos 31-45, Fracción D

Los métodos de fraccionamiento posteriores fueron aplicados en forma exclusiva sobre la fracción A.

Dado que trabajos anteriores (Claus J.C. et al., 2003) han evidenciado que esta fracción contiene péptidos que promueven el crecimiento de células de insecto en cultivos celulares, se decidió evaluar qué efecto tendría la misma fracción sobre el crecimiento de bacterias ácido lácticas.

En la Figura N°10 se muestra un análisis por HPLC analítico de la fracción A, donde se puede constatar la complejidad de la muestra. Los compuestos bioactivos eluyeron con un porcentaje de ACN comprendido entre el 20 y el 30%. Tal como se pudo constatar posteriormente, varios de los picos que eluyeron con 0.5 % de ACN correspondían a los mismos péptidos pero agregados, razón por la cual no fueron prácticamente retenidos por la columna.

Figura 10: Análisis por HPLC analítico en fase reversa (C18) de la fracción A.



Los análisis por espectrometría de masas y el posterior secuenciamiento por Degradación de Edman permitieron determinar que la fracción A contiene al menos tres péptidos de muy bajo peso molecular (rango 926.5-1151 Da), dos de ellos procedentes de la β A2 caseína (regiones 89-95 y 160-169), y el tercero procedente de la κ caseína (región 177-183). Dichos péptidos tienen las siguientes secuencias:

- Región 89-95 de la β A2 caseína: IPPLTQT
- Región 160-169 de la β A2 caseína: HQPHQPLPPT
- Región 177-183 de la κ caseína: PPEINTV

Teniendo en cuenta el bajo peso molecular de los péptidos identificados en esta fracción, y las características de las secuencias, resulta claro que los mismos aparecen como consecuencia de la acción enzimática de tripsina y quimotripsina, así como de otras enzimas proteolíticas no especificadas por el proveedor del hidrolizado comercial (Sigma).

Uno de los principales componentes de esta fracción es el péptido HQPHQPLPPT procedente de la β A2 caseína, cuya actividad promotora sobre el crecimiento de células de insecto fue demostrada anteriormente (Claus J.C. et al., 2003).

2.- Determinación de la cinética de crecimiento de las cepas de bacterias ácido lácticas

2.1.- Curvas de desarrollo microbiano para *Enterococcus faecalis* E24.

En la Figura N° 11 (a) se observa la representación de la evolución del número de unidades formadoras de colonias, expresado en escala logarítmica, en función del tiempo, para esta cepa bacteriana. Se pueden apreciar comparativamente las distintas curvas obtenidas en función de los ensayos realizados con cada uno de los cinco medios de cultivo estudiados.

En todos los casos los valores de concentraciones celulares se obtuvieron realizando conteo en placas, utilizando como medio de cultivo agar LAPT_{L5}.

En la Figura se aprecia que los valores iniciales de concentraciones celulares (determinados a tiempo cero) oscilaron en torno al orden de 10^6 UFC/mL.

Se puede también observar que el valor más elevado de concentración celular se obtuvo cuando *E. faecalis* E 24 se hizo desarrollar en lactosuero adicionado con hidrolizado caseínico total, alcanzándose el valor máximo (del orden de 10^{11} UFC/mL) luego de 12 h de cultivo. También puede apreciarse que las adiciones al lactosuero de la fracción A al 2 y al 4 % (p/v), dieron valores significativamente inferiores a los obtenidos con el hidrolizado total. Concentraciones celulares máximas considerablemente mayores se obtuvieron cuando el medio fue adicionado con peptona de carne.

Para estos tres últimos medios (lactosuero adicionado con fracción A al 2 y al 4 %, y con peptona de carne), los tiempos en los que se lograron los valores máximos de concentración celular fueron variables entre las 12 y las 18 horas. Con el medio de referencia (Caldo M 17) se obtuvo el valor máximo de

concentración celular (del orden de 10^9 UFC/mL) más próximo al logrado con lactosuero adicionado con el hidrolizado total, luego de 6 horas de cultivo.

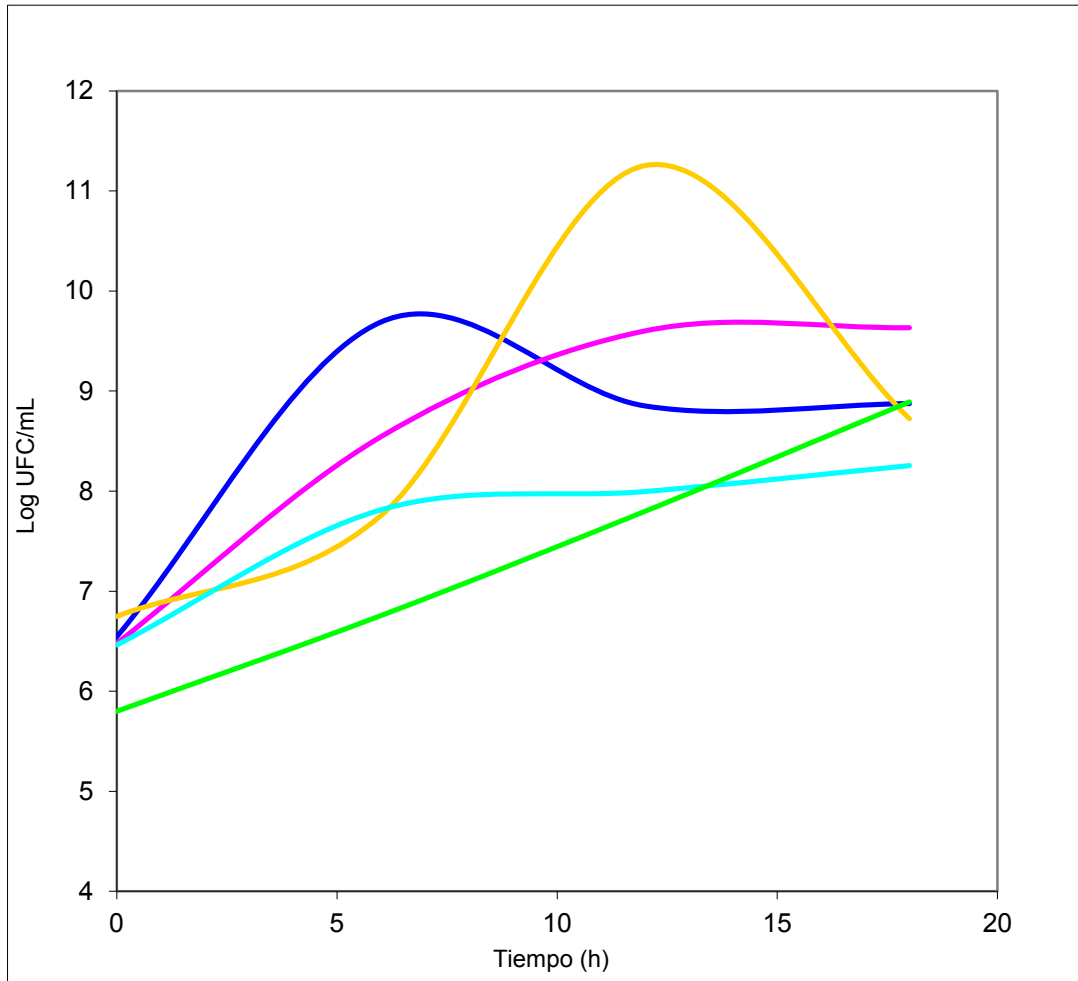
Los valores obtenidos muestran una cinética de crecimiento particular y considerablemente variable de la cepa en estudio según el medio de cultivo en el que se realiza la propagación. Sin embargo, resulta claro que el medio más conveniente es el lactosuero adicionado con el hidrolizado caseínico total, con el que se logró una concentración celular máxima superior en dos ciclos logarítmicos a la alcanzada con el medio de referencia, aunque el tiempo de incubación demandado para alcanzar este valor máximo fue mayor.

En la Figura N° 11 (b), se representan las evoluciones de los valores de DO en función del tiempo, correspondientes a los ensayos realizados con cada uno de los medios de cultivo en estudio.

Los valores de DO evaluados a 560 nm mostraron una aceptable correlación con los valores correspondientes obtenidos mediante conteo en placa. Al comparar las dos metodologías utilizadas para evaluar la evolución de las poblaciones bacterianas, se observa la misma tendencia en la cinética de crecimiento de la cepa, determinada en cada medio aplicando estos dos métodos de cuantificación. Las diferencias observadas son atribuibles al aumento de la concentración de los detritos celulares así como a la permanencia de las células muertas en el medio de cultivo, los que influyen notablemente en las determinaciones de DO.

En la Tabla N° 3 se detallan los valores numéricos determinados en los diversos ensayos, a partir de los cuales se trazaron las gráficas que se observan en las Figuras N° 11 (a) y 11 (b).

Figura N° 11 (a): Evolución de las concentraciones celulares de *Enterococcus faecalis* E24 en función del tiempo en los distintos medios de cultivo ensayados



Referencias:

CALDO M 17

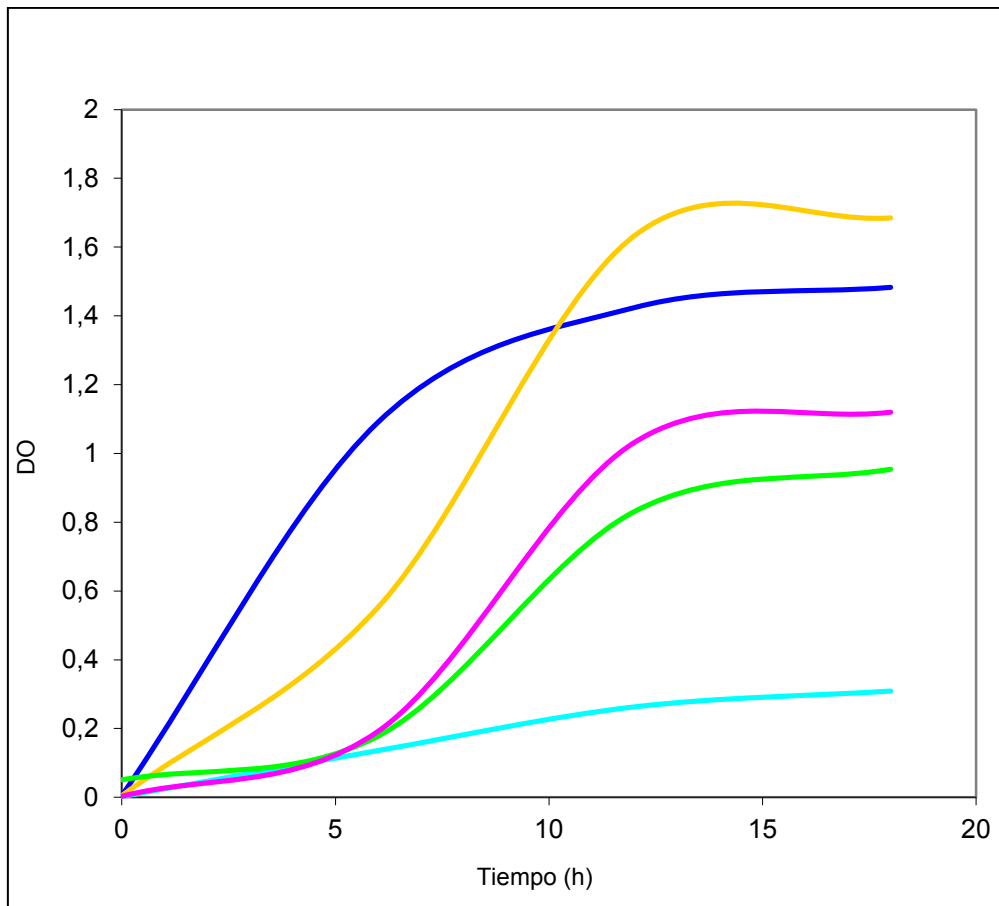
LACTOSUERO+PEPTONA DE CARNE

LACTOSUERO+FRACCION A 4%

LACTOSUERO+FRACCION A2%

LACTOSUERO+HIDROLIZADO DE CASEINA

Figura N° 11 (b): Evolución de los valores de Densidades Ópticas de *Enterococcus faecalis* E24 en función del tiempo en los distintos medios de cultivo ensayados.



Referencias:

CALDO M 17

LACTOSUERO+PEPTONA DE CARNE

LACTOSUERO+FRACCION A 4%

LACTOSUERO+FRACCION A2%

LACTOSUERO+HIDROLIZADO DE CASEINA

Tabla N° 3: Valores de DO y de concentraciones celulares de *Enterococcus faecalis* E24 determinados en los distintos ensayos efectuados.

Medio de Cultivo	Caldo M17		Lactosuero + Peptona de carne 2%		Lactosuero + Fracción A 2%		Lactosuero + Fracción A 4%		Lactosuero + Hidrolizado total de Caseína	
	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL
Tiempo (horas)										
0	0,005	4,5x10 ⁶	0,003	4,0x10 ⁶	0,002	3,9x10 ⁶	0,051	8,7x10 ⁵	0,005	6,6x10 ⁶
6	1,091	4,3x10 ⁹	0,192	3,5x10 ⁸	0,136	6,5x10 ⁷	0,178	5,7x10 ⁶	0,593	5,7x10 ⁷
12	1,424	7,1x10 ⁸	1,032	4,0x10 ⁹	0,263	9,9x10 ⁷	0,831	6,3x10 ⁷	1,633	1,8x10 ¹¹
18	1,483	7,5x10 ⁸	1,120	4,3x10 ⁹	0,309	1,8x10 ⁸	0,954	7,8x10 ⁸	1,685	7,3x10 ⁸

2.2.- Curvas de desarrollo microbiano para *Enterococcus faecalis* E30.

En la Figura N° 12 (a) se observa la representación de la evolución del número de unidades formadoras de colonias, expresado en escala logarítmica, en función del tiempo. Se pueden apreciar comparativamente las distintas curvas obtenidas para *Enterococcus faecalis* E30 en función de los ensayos realizados con cada uno de los cinco medios de cultivo estudiados.

En todos los casos los valores de concentraciones celulares se obtuvieron realizando conteo en placas, utilizando como medio de cultivo agar LAPT_{L5}.

En la Figura se aprecia que los valores iniciales de concentraciones celulares (determinados a tiempo cero) oscilaron en los órdenes de 10^5 y 10^6 UFC/mL.

En las curvas obtenidas se puede observar que los mejores valores de concentración celular se obtuvieron cuando *E. faecalis* E30 se hizo desarrollar en lactosuero adicionado con hidrolizado caseínico total, alcanzándose el valor máximo ($5,2 \times 10^{10}$ UFC/mL) luego de 12 h de cultivo.

También puede apreciarse que las adiciones al lactosuero de la fracción A al 2 y al 4 % (p/v), dieron valores muy inferiores al anterior, y con sus máximos a las 6 y 12 horas de cultivo, respectivamente. En cambio, con lactosuero con el agregado de peptona de carne, se obtuvieron concentraciones celulares considerablemente mayores a éstas ($1,1 \times 10^{10}$ UFC/mL), que resultaron próximas a las alcanzadas con lactosuero con hidrolizado caseínico total y superiores a las logradas con el medio de referencia (Caldo M17), para el cual el valor máximo fue de $7,0 \times 10^8$ UFC/mL. Además, con peptona de carne, la mencionada concentración celular máxima se alcanzó con sólo 6 horas de incubación, mientras que con Caldo M17 se logró luego de 18 horas.

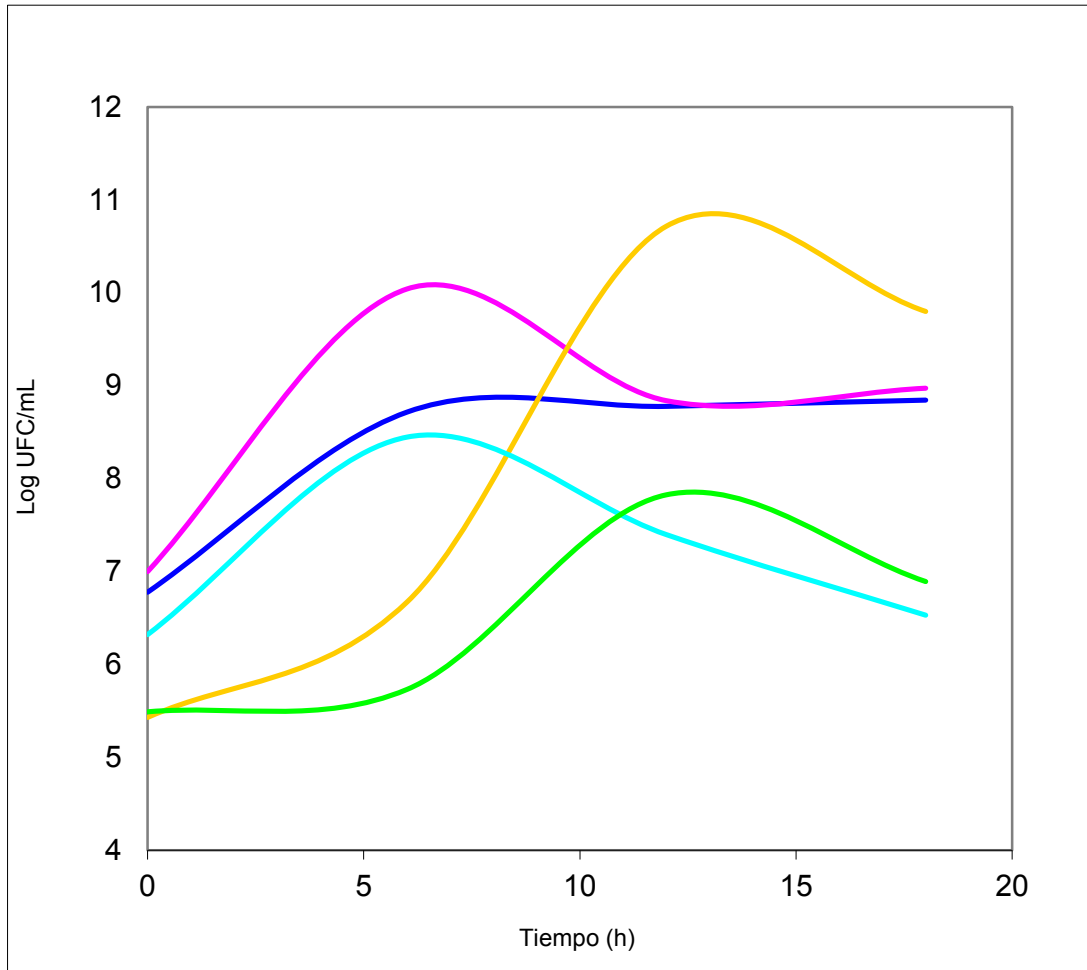
Estos valores confirman la aseveración realizada en el ítem anterior en cuanto a que la cinética de crecimiento es particular y considerablemente variable para la cepa en estudio según el medio de cultivo en el que se realiza la propagación. Pero también queda ahora confirmado que la cinética de crecimiento es particular para cada cepa, independientemente de la especie a la que pertenezca, dado que dos cepas de *E. faecalis* han mostrado variaciones significativas en su desarrollo.

Lo que resulta coincidente entre estas dos cepas de *E. faecalis* es que el medio más apropiado para alcanzar la máxima concentración celular es el lactosuero adicionado con el hidrolizado caseínico total, pero en el caso de la cepa E30 el segundo lugar no lo ocupa el Caldo M 17 sino el lactosuero con peptona de carne, que además de mostrar un valor máximo de concentración celular próximo al logrado con el mejor medio, también ha permitido alcanzarlo en un tiempo de incubación mucho menor que el verificado para el Caldo M 17.

En la Figura N° 12 (b), donde se representan las evoluciones de los valores de DO en función del tiempo correspondientes a los ensayos realizados con cada uno de los medios de cultivo en estudio, se aprecia, al igual que en el caso anterior, una aceptable correlación con los valores correspondientes obtenidos mediante conteo en placa. Si bien en este caso también se observa la misma tendencia en la cinética de crecimiento en cada medio, de igual modo se aprecian diferencias atribuibles al aumento de la concentración de los detritos celulares así como a la permanencia de las células muertas en el medio de cultivo, que impactan significativamente en las determinaciones de DO.

En la Tabla N° 4 se detallan los valores numéricos determinados en los diversos ensayos, a partir de los cuales se trazaron las gráficas que se observan en las Figuras N° 12 (a) y 12 (b).

Figura N° 12 (a): Evolución de las concentraciones celulares de *Enterococcus faecalis* E30 en función del tiempo en los distintos medios de cultivo ensayados.



Referencias:

CALDO M17

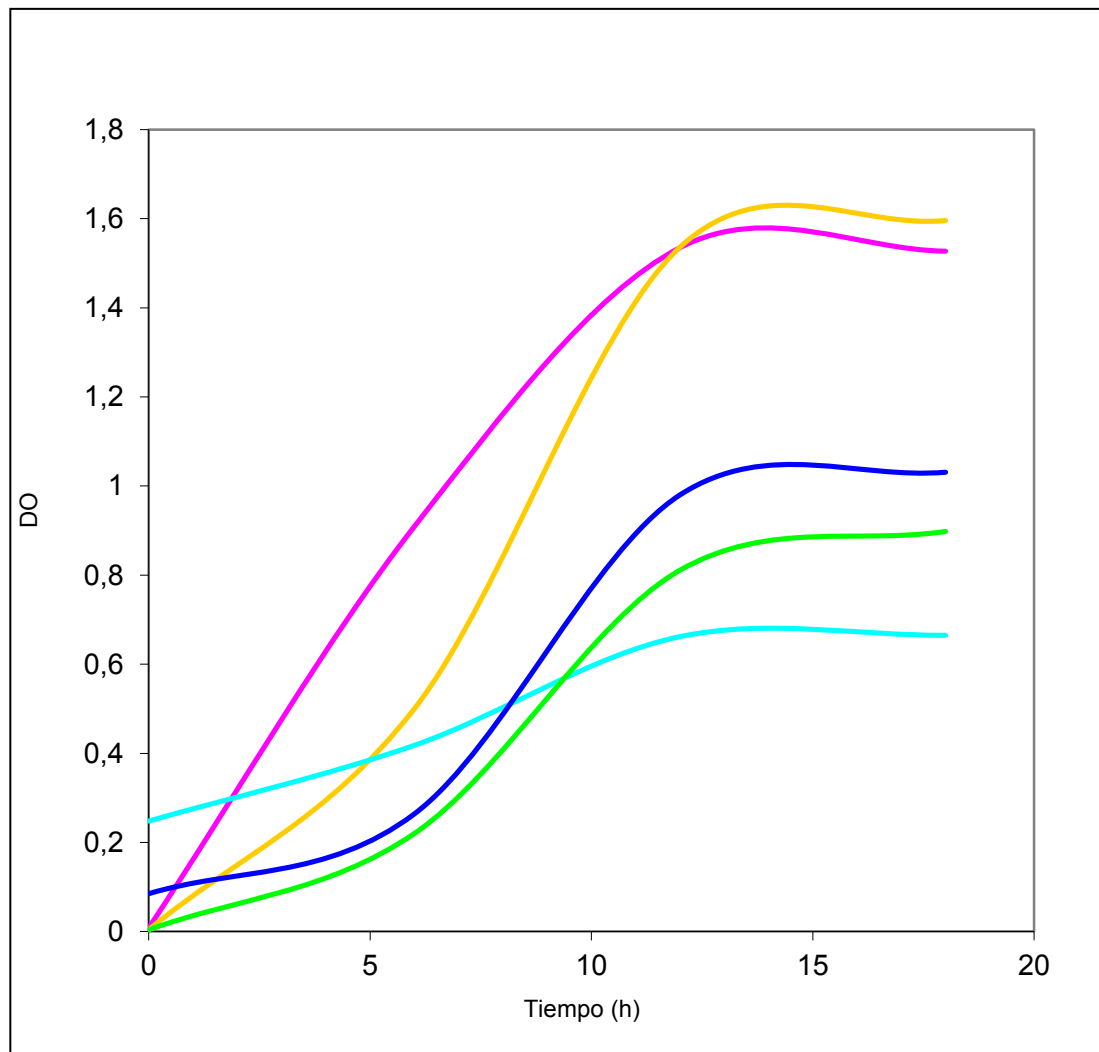
LACTOSUERO + PEPTONA DE CARNE

LACTOSUERO + FRACCION A 4%

LACTOSUERO + FRACCION A 2%

SUERO + HIDROLIZADO DE CASEINA

Figura N° 12 (b): Evolución de los valores de Densidades Ópticas de *Enterococcus faecalis* E30 en función del tiempo en los distintos medios de cultivo ensayados.



Referencias:

CALDO M17

LACTOSUERO + PEPTONA DE CARNE

LACTOSUERO + FRACCION A 4%

LACTOSUERO + FRACCION A 2%

SUERO + HIDROLIZADO DE CASEINA

Tabla N° 4: Valores de DO y de concentraciones celulares de *Enterococcus faecalis* E30 determinados en los distintos ensayos efectuados.

Medio de Cultivo	Caldo M17		Lactosuero + Peptona de carne 2%		Lactosuero + Fracción A 2%		Lactosuero + Fracción A 4%		Lactosuero + Hidrolizado total de Caseína	
	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL
0	0,085	$6,0 \times 10^6$	0,008	$1,0 \times 10^7$	0,248	$2,1 \times 10^6$	0,004	$6,1 \times 10^5$	0,004	$5,7 \times 10^5$
6	0,264	$5,2 \times 10^8$	0,909	$1,1 \times 10^{10}$	0,418	$2,8 \times 10^8$	0,200	$5,4 \times 10^5$	0,500	$4,7 \times 10^6$
12	0,910	$6,0 \times 10^8$	1,527	$6,9 \times 10^8$	0,612	$5,2 \times 10^7$	0,790	$8,7 \times 10^7$	1,436	$5,2 \times 10^{10}$
18	1,031	$7,0 \times 10^8$	1,535	$8,4 \times 10^8$	0,665	$3,4 \times 10^6$	0,848	$7,8 \times 10^6$	1,596	$9,3 \times 10^9$

2.3.- Curvas de desarrollo microbiano para *Enterococcus faecium* E23.

Al igual que en los casos anteriores, en la Figura N° 13 (a) se observa la representación de la evolución del número de unidades formadoras de colonias, expresado en escala logarítmica, en función del tiempo. Se pueden apreciar comparativamente las distintas curvas obtenidas en función de los ensayos realizados con cada uno de los cinco medios de cultivo estudiados.

En todos los casos los valores de concentraciones celulares se obtuvieron realizando conteo en placas, utilizando como medio de cultivo agar LAPT_{L5}.

En ellas se aprecia que los valores iniciales de concentraciones celulares (determinados a tiempo cero) oscilaron en torno a $10^6 - 10^7$ UFC/mL.

En las curvas trazadas a partir de los resultados experimentales obtenidos se puede observar que los mejores valores de concentración celular se obtuvieron cuando *E. faecium* E23 se hizo desarrollar en lactosuero adicionado con hidrolizado caseínico total, alcanzándose dicho valor máximo ($9,9 \times 10^9$ UFC/mL) luego de 12 h de cultivo.

También puede apreciarse que la adición al lactosuero de la Fracción A al 4 % (p/v) dio valores muy similares a los logrados con la adición de hidrolizado caseínico total, y con su máximo ($9,6 \times 10^9$ UFC/mL), alcanzado luego de 12 horas de cultivo. En cambio, con el lactosuero con agregado de peptona de carne, se obtuvo una concentración celular máxima menor que las anteriores, que resultó muy próxima a la alcanzada con el medio de referencia (Caldo M17), la que fue de $7,6 \times 10^8$ UFC/mL; ambas se verificaron luego de 12 y 18 horas de incubación respectivamente. En estos dos últimos casos los valores de concentración celular fueron superiores al logrado con el agregado de

fracción A al 2% (p/v) ($5,17 \times 10^7$ UFC/mL); además, en este medio en particular, la concentración celular máxima se alcanzó con sólo 6 horas de incubación.

En función de estos resultados se puede afirmar que, en cuanto a conveniencia se refiere, el segundo lugar es ocupado por el lactosuero con adición de fracción A al 4 % (p/v), que además de mostrar un valor máximo de concentración celular próximo al logrado con el mejor medio, también ha permitido mantenerlo entre las 12 y las 18 horas de incubación.

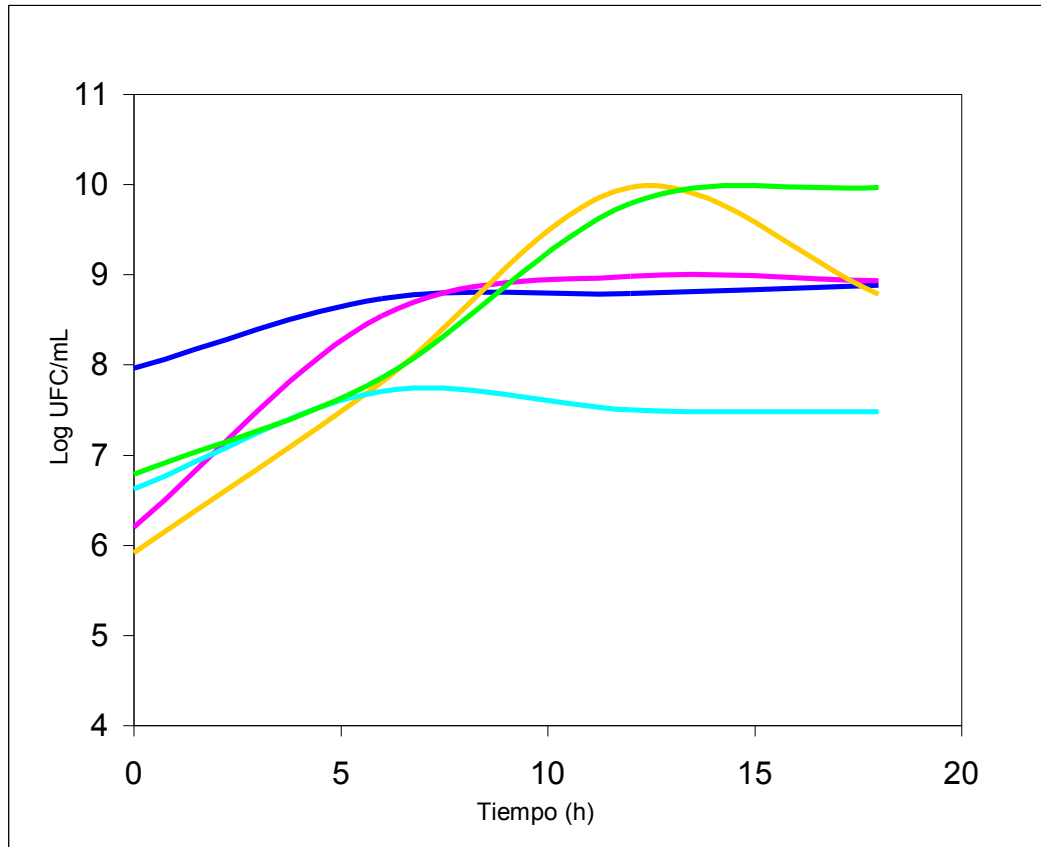
En la Figura N° 13 (b) se representan las evoluciones de los valores de DO en función del tiempo. Nuevamente en ella se aprecia una aceptable correlación con los valores correspondientes obtenidos mediante conteo en placa, aunque con diferencias atribuibles, como en los resultados obtenidos para las cepas anteriormente estudiadas, al aumento de la concentración de los detritos celulares así como a la permanencia de las células muertas en el medio de cultivo.

Con respecto a la cinética de crecimiento de las tres cepas de *Enterococcus* estudiadas hasta aquí, se puede decir que es particular para cada una de ellas y para cada medio de cultivo en el que se realiza la propagación. Sin embargo, en función de los resultados obtenidos, se puede asegurar que el medio que permite conseguir los mejores valores de desarrollo microbiano para el género *Enterococcus* es el lactosuero con el agregado de hidrolizado caseínico total. Si bien estos valores han mostrado significativas diferencias entre sí, ya que han variado entre $1,8 \times 10^{11}$ y $9,9 \times 10^9$ UFC/mL, siempre han sido los máximos alcanzados y siempre se han logrado luego de un período de 12 horas de incubación, independientemente de cuál sea la cepa en estudio. Por el contrario, la evolución de la cinética de crecimiento en los otros medios

ensayados, tanto en lo que se refiere a valores máximos de concentración celular como al tiempo de cultivo en que se los ha alcanzado, ha sido variable y característico para cada una de las tres cepas en particular.

En la Tabla N° 5 se detallan los valores numéricos determinados en los diversos ensayos, a partir de los cuales se trazaron las gráficas que se observan en las Figuras N° 13 (a) y 13 (b).

Figura N° 13 (a): Evolución de las concentraciones celulares de *Enterococcus faecium* E23 en función del tiempo en los distintos medios de cultivo ensayados.



Referencias:

CALDO17

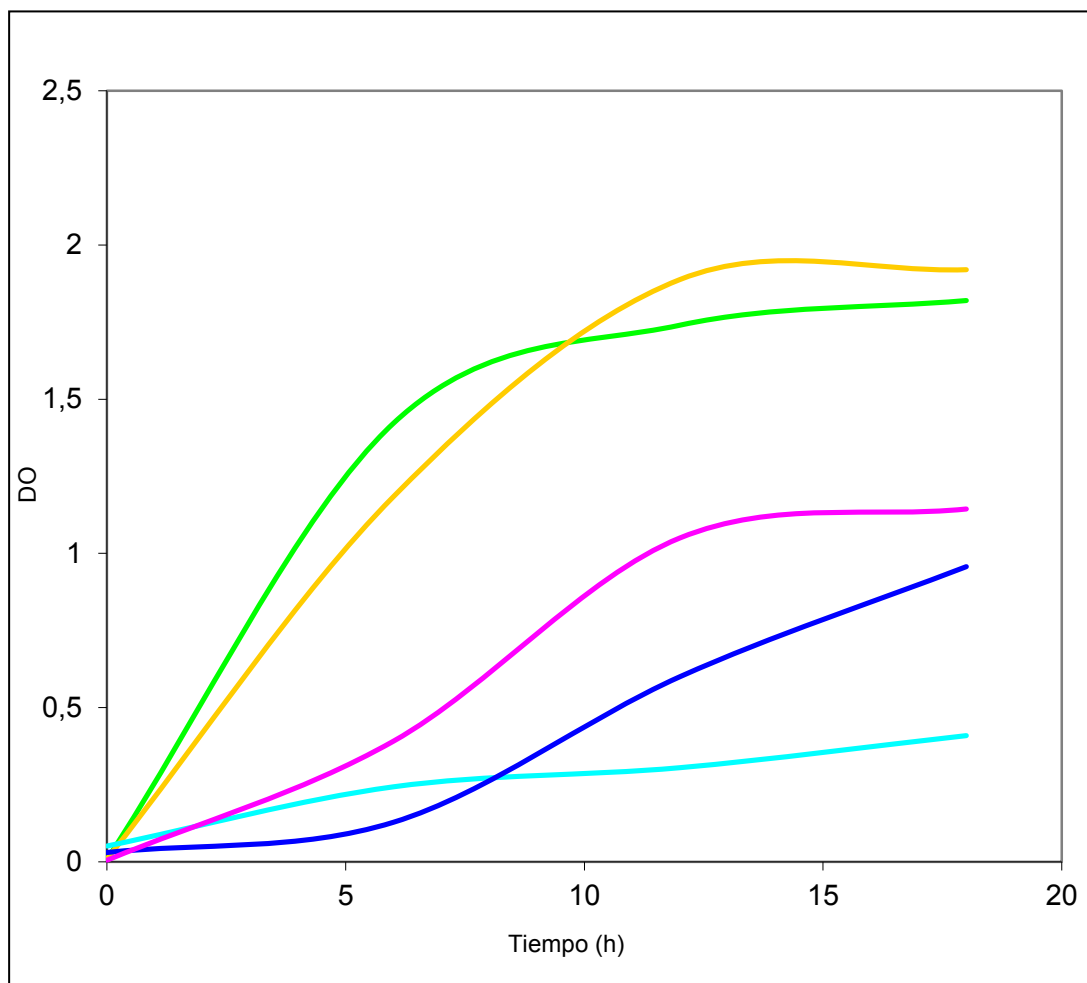
LACTOSUERO + PEPTONA DE CARNE

LACTOSUERO + FRACCION A 4%

LACTOSUERO + FRACCION A 2%

SUERO + HIDROLIZADO DE CASEINA

Figura N° 13 (b): Evolución de los valores de Densidades Ópticas de los cultivos de *Enterococcus faecium* E23 en función del tiempo en los distintos medios de cultivo ensayados.



Referencias:

CALDO M17

LACTOSUERO + PEPTONA DE CARNE

LACTOSUERO + FRACCION A 4%

LACTOSUERO + FRACCION A 2%

SUERO + HIDROLIZADO DE CASEINA

Tabla N° 5: Valores de DO y de concentraciones celulares de *Enterococcus faecium* E 23 determinados en los distintos ensayos efectuados.

Medio de Cultivo	Caldo M17		Lactosuero + Peptona de carne 2%		Lactosuero + Fracción A 2%		Lactosuero + Fracción A 4%		Lactosuero + Hidrolizado total de Caseína	
	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL
0	0,030	$9,2 \times 10^7$	0,005	$1,58 \times 10^6$	0,051	$6,6 \times 10^6$	0,008	$8,1 \times 10^6$	0,009	$9,2 \times 10^5$
6	0,128	$6,4 \times 10^8$	0,391	$3,5 \times 10^8$	0,243	$5,17 \times 10^7$	1,422	$6,6 \times 10^7$	1,184	$6,4 \times 10^7$
12	0,600	$6,0 \times 10^8$	1,050	$9,6 \times 10^8$	0,305	$3,09 \times 10^7$	1,740	$9,6 \times 10^9$	1,881	$9,9 \times 10^9$
18	0,957	$7,6 \times 10^8$	1,144	$8,6 \times 10^8$	0,409	$3,0 \times 10^7$	1,820	$9,3 \times 10^9$	1,920	$7,1 \times 10^8$

2.4.- Curvas de desarrollo microbiano para *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sf1-1.

En la Figura N° 14 (a) se observa la representación de la evolución del número de unidades formadoras de colonias, expresado en escala logarítmica, en función del tiempo. Se pueden apreciar comparativamente las distintas curvas obtenidas en función de los ensayos realizados con cada uno de los cinco medios de cultivo estudiados.

En todos los casos los valores de concentraciones celulares se obtuvieron realizando conteo en placas, utilizando como medio de cultivo agar LAPT_{L5}.

En dicha Figura se aprecia que los valores iniciales de concentraciones celulares (determinados a tiempo cero) oscilaron entre 10^5 y 10^6 UFC/mL, y que el máximo desarrollo microbiano para los diferentes medios ensayados se observó entre las 6 y 18 horas de cultivo, tiempos en los que se obtuvieron valores del orden de 10^8 - 10^9 UFC/mL.

Siguiendo el trazado de las diferentes curvas se puede observar que el mejor valor de concentración celular se obtuvo cuando *L. lactis* subsp. *lactis* Sf 1-1 se hizo desarrollar en lactosuero adicionado con fracción A al 4% (p/v), alcanzándose dicho valor máximo ($1,0 \times 10^9$ UFC/mL) luego de 18 horas de cultivo. Este valor es muy próximo al logrado con lactosuero con el agregado de hidrolizado caseínico total luego de sólo 12 h de cultivo ($8,0 \times 10^8$ UFC/mL), así como al máximo logrado con este medio al cabo de 18 h de incubación ($8,3 \times 10^8$ UFC/mL). También puede apreciarse que los dos medios de cultivo mencionados dieron valores similares a los obtenidos con el medio comercial de referencia (Caldo M17), aunque con este último el máximo valor resultó algo más elevado ($9,3 \times 10^8$ UFC/mL) que el obtenido con la adición de hidrolizado

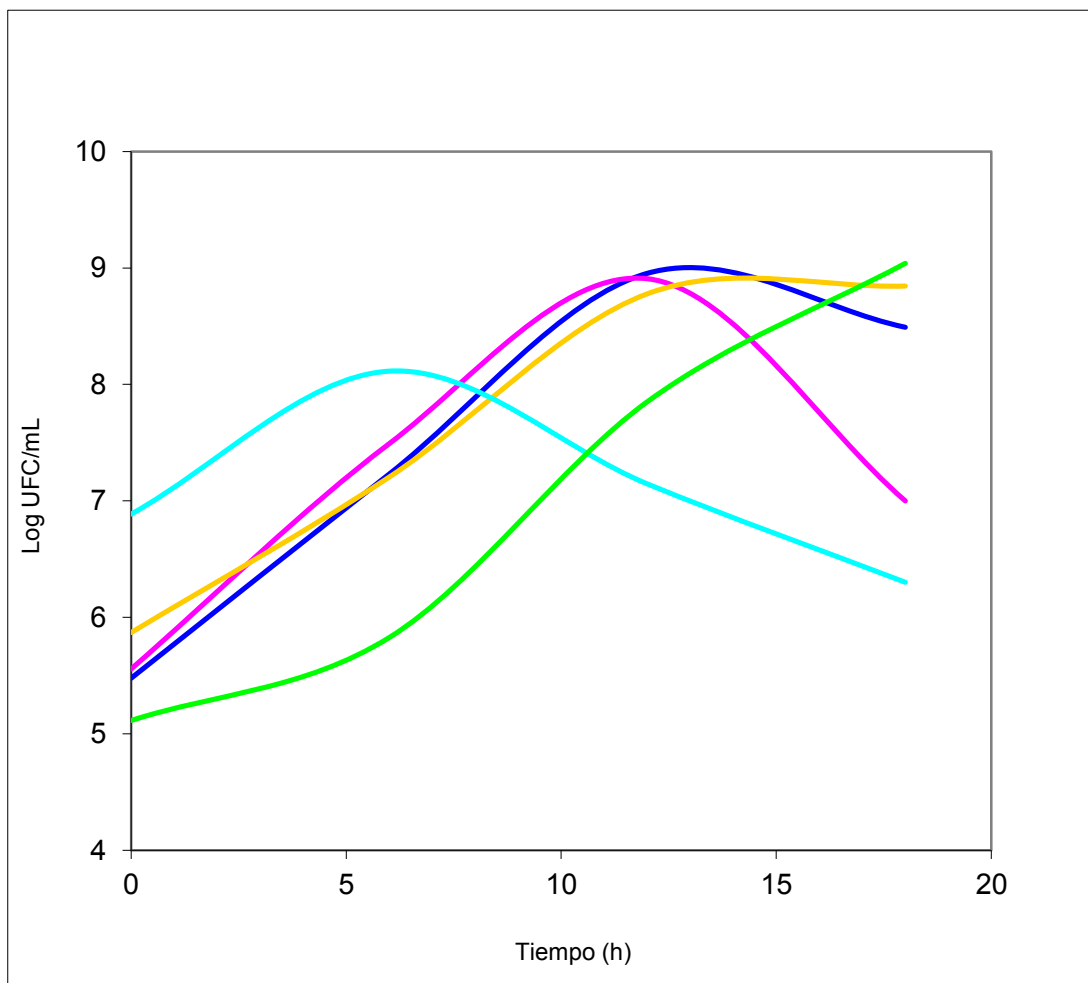
caseínico total y se logró a las 12 horas de incubación. La curva de crecimiento obtenida para esta cepa en lactosuero adicionado de peptona de carne mostró una evolución similar a las correspondientes a lactosuero con el agregado de hidrolizado total y a Caldo M17, aunque luego de alcanzar la máxima concentración celular a las 12 h, se produce un rápido y marcado descenso de la misma. El crecimiento en medio adicionado con fracción A al 2% (p/v) mostró valores inferiores de máximo desarrollo ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL), obtenidos a las 6 horas de cultivo.

Los valores obtenidos muestran una cinética de crecimiento particular y relativamente variable de la cepa en estudio según el medio de cultivo en el que se realiza la propagación, diferenciándose claramente las obtenidas en lactosuero con 2 y 4 % (p/v) de fracción A de las obtenidas con los otros tres medios de cultivo estudiados. Si se considera solamente la máxima concentración celular alcanzada, resulta claro que el medio más conveniente es el lactosuero adicionado con la fracción A al 4% (p/v), pero si se tiene en cuenta el tiempo de cultivo es evidente que el Caldo M17 y el lactosuero con agregado de hidrolizado caseínico total y con peptona de carne son más convenientes, dado que permiten alcanzar poblaciones cuantitativamente semejantes seis horas antes. Por lo tanto, con esta cepa no son tan definitivas las diferencias a favor de un medio de cultivo en particular.

Los valores de DO evaluados a 560 nm mostraron una aceptable correlación con los valores propios del conteo en placa, con las limitaciones propias de la comparación entre ambos métodos, debidas a las causas ya expuestas para los casos anteriormente descritos. Esto se puede observar en la Figura N° 14 (b), donde se muestra la evolución de las DO en función del tiempo.

En la Tabla N° 6 se detallan los valores numéricos determinados en los diversos ensayos, a partir de los cuales se trazaron las gráficas que se observan en las Figuras N° 14 (a) y 14(b).

Figura N° 14 (a): Evolución de las concentraciones celulares de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sf1-1 en función del tiempo en los distintos medios de cultivo ensayados.



Referencias:

M 17

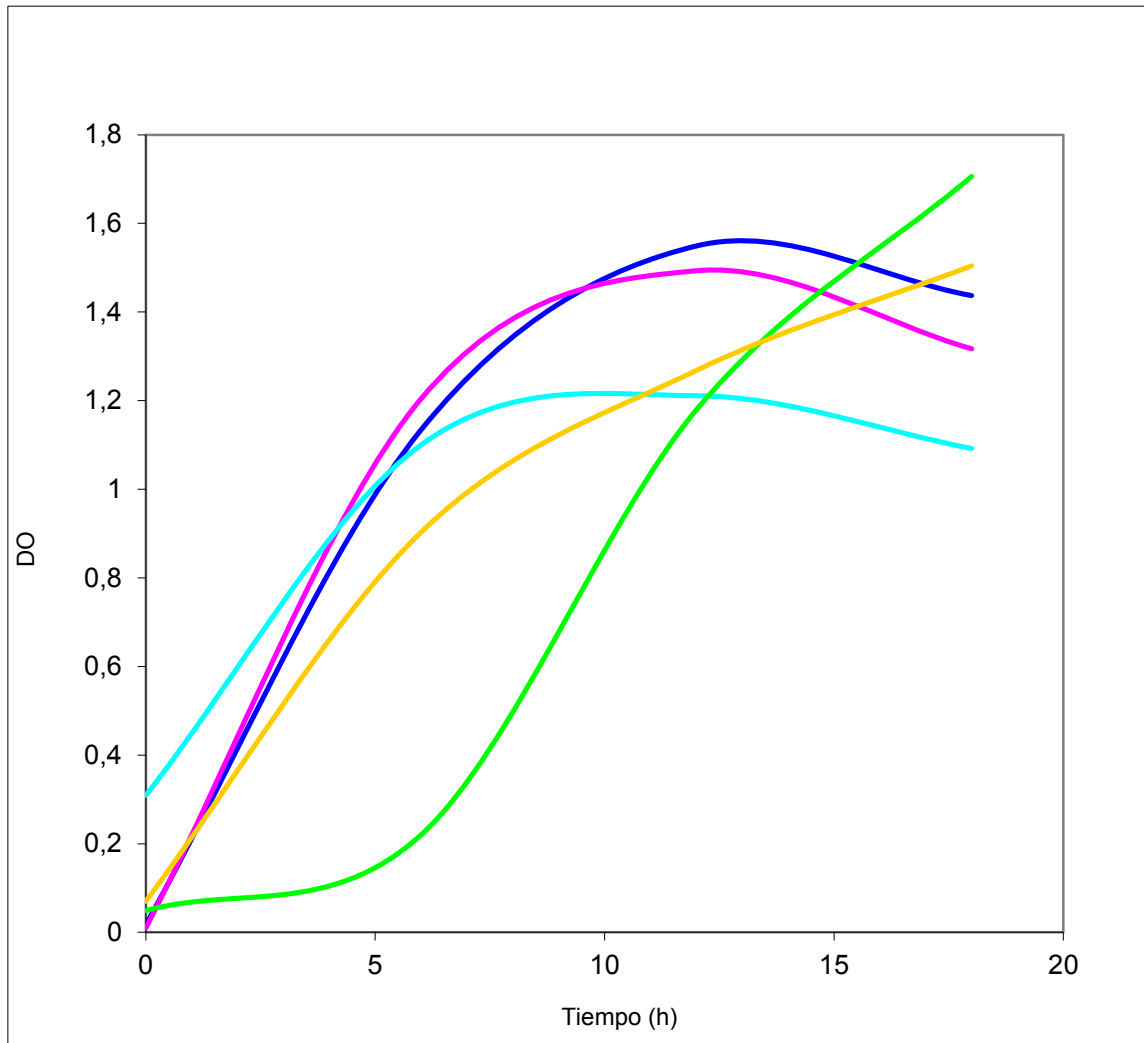
LACTOSUERO + PEPTONA DE CARNE

LACTOSUERO + FRACCION (A) 4%

LACTOSUERO + FRACCION (A) 2%

SUERO + HIDROLIZADO DE CASEINA

Figura N° 14 (b): Evolución de los valores de Densidades Ópticas de los cultivos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sf 1-1 en función del tiempo en los distintos medios de cultivo ensayados.



Referencias:

CALDO M17

LACTOSUERO + PEPTONA DE CARNE

LACTOSUERO + FRACCION A 4%

LACTOSUERO + FRACCION A 2%

SUERO + HIDROLIZADO DE CASEINA

Tabla N° 6: Valores de DO y de concentraciones celulares de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sf1-1 determinados en los distintos ensayos efectuados.

Medio de Cultivo	Caldo M17		Lactosuero + Peptona de carne 2%		Lactosuero + Fracción A 2%		Lactosuero + Fracción A 4%		Lactosuero + Hidrolizado total de Caseína	
	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL
0	0,012	2,3x10 ⁵	0,019	2,8x10 ⁵	0,310	9,4x10 ⁶	0,049	1,9x10 ⁵	0,007	9,6x10 ⁵
6	1,134	1,2x10 ⁷	1,204	5,3x10 ⁷	1,100	1,0x10 ⁸	0,224	7,9x10 ⁵	0,906	1,0x10 ⁷
12	1,549	9,3x10 ⁸	1,493	8,4x10 ⁸	1,211	1,1x10 ⁷	1,205	9,7x10 ⁷	1,268	8,0x10 ⁸
18	1,437	2,0x10 ⁸	1,317	1,0x10 ⁷	1,092	2,1x10 ⁶	1,706	1,0x10 ⁹	1,505	8,3x10 ⁸

2.5.- Curvas de desarrollo microbiano para *Streptococcus thermophilus*

Ch3-4

En la Figura N° 15 (a) se observa la representación de la evolución del número de unidades formadoras de colonias, expresado en escala logarítmica, en función del tiempo, para esta cepa bacteriana. Se pueden apreciar comparativamente las distintas curvas obtenidas en función de los ensayos realizados con cada uno de los cinco medios de cultivo estudiados.

En todos los casos los valores de concentraciones celulares se obtuvieron realizando conteo en placas, utilizando como medio de cultivo agar LAPT_{L5}.

En la Figura se aprecia que los valores iniciales de concentraciones celulares (determinados a tiempo cero) oscilaron entre 10^5 y 10^6 UFC/mL.

Asimismo, se puede observar que el mejor valor de concentración celular se obtuvo cuando *S. thermophilus* Ch 3-4 se hizo desarrollar en lactosuero adicionado con hidrolizado caseínico total, alcanzándose dicho valor máximo ($6,0 \times 10^9$ UFC/mL) luego de 12 h de cultivo.

También puede apreciarse que la curva que muestra la cinética de crecimiento de esta cepa en el medio formulado mediante la adición al lactosuero de la fracción A al 4 % (p/v), es prácticamente idéntica a la obtenida con lactosuero adicionado con el hidrolizado total, con la diferencia de que presenta valores levemente inferiores a los obtenidos con este último medio, para los mismos tiempos de cultivo.

Por otra parte, se observa que para los otros tres medios ensayados también se obtuvieron curvas de evolución poblacional con trazados similares entre sí, aunque con diferentes valores de concentraciones celulares. La adición al

lactosuero de peptona de carne al 2 % (p/v) dio valores más elevados, con su máximo ($3,9 \times 10^8$ UFC/mL) a las 18 horas de cultivo. En cambio, con el medio de referencia (Caldo M17), se obtuvieron concentraciones celulares máximas menores a éstas, que resultaron a su vez mayores que las alcanzadas con el agregado al lactosuero de fracción A al 2% (p/v), a las 18 y 12 horas de incubación, respectivamente.

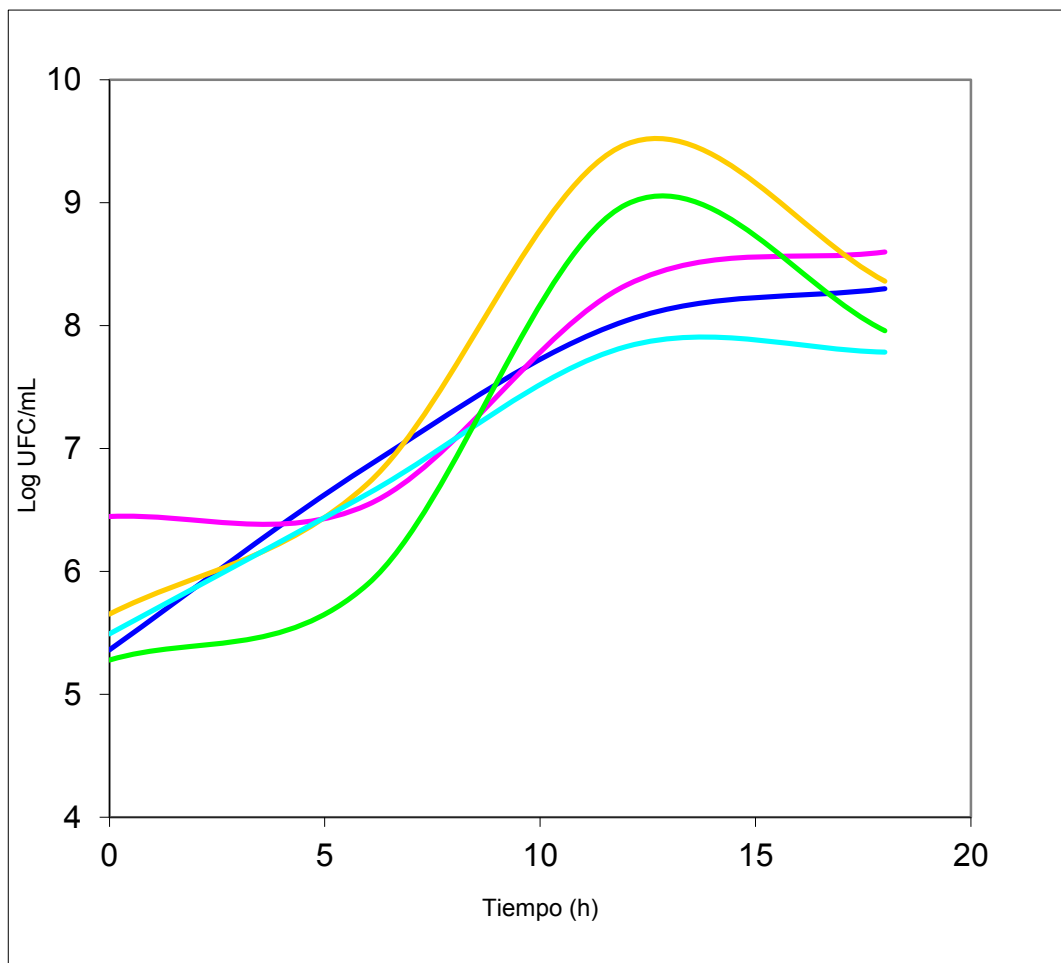
Al igual que en los casos anteriores, los valores obtenidos muestran una cinética de crecimiento particular de la cepa en estudio según el medio de cultivo en el que se realiza la propagación; sin embargo, para esta cepa se comprobó la existencia de una gran similitud en la evolución poblacional para dos grupos de medios de desarrollo: lactosuero con hidrolizado caseínico total y con fracción A al 4% (p/v), por un lado, y Caldo M17 y lactosuero con peptona de carne y fracción A al 2% (p/v), por el otro. En todos los casos, el máximo desarrollo microbiano se observó entre las 12 y 18 horas de cultivo, tiempos en los que se obtuvieron valores del orden de 10^7 - 10^9 UFC/mL.

Los valores de DO mostraron una aceptable correlación con los valores propios del conteo en placa, con las diferencias cuyas causales ya han sido explicitadas para los ensayos anteriormente tratados.

Esto se puede apreciar en la Figura N° 15 (b), donde se analiza la evolución de las DO en función del tiempo.

En la Tabla N° 7 se detallan los valores numéricos determinados en los diversos ensayos, a partir de los cuales se trazaron las gráficas que se observan en las Figuras N°15 (a) y 15 (b).

Figura N° 15 (a): Evolución de las concentraciones celulares de *Streptococcus thermophilus* Ch3-4 en función del tiempo en los distintos medios de cultivo ensayados.



Referencias:

CALDO M17

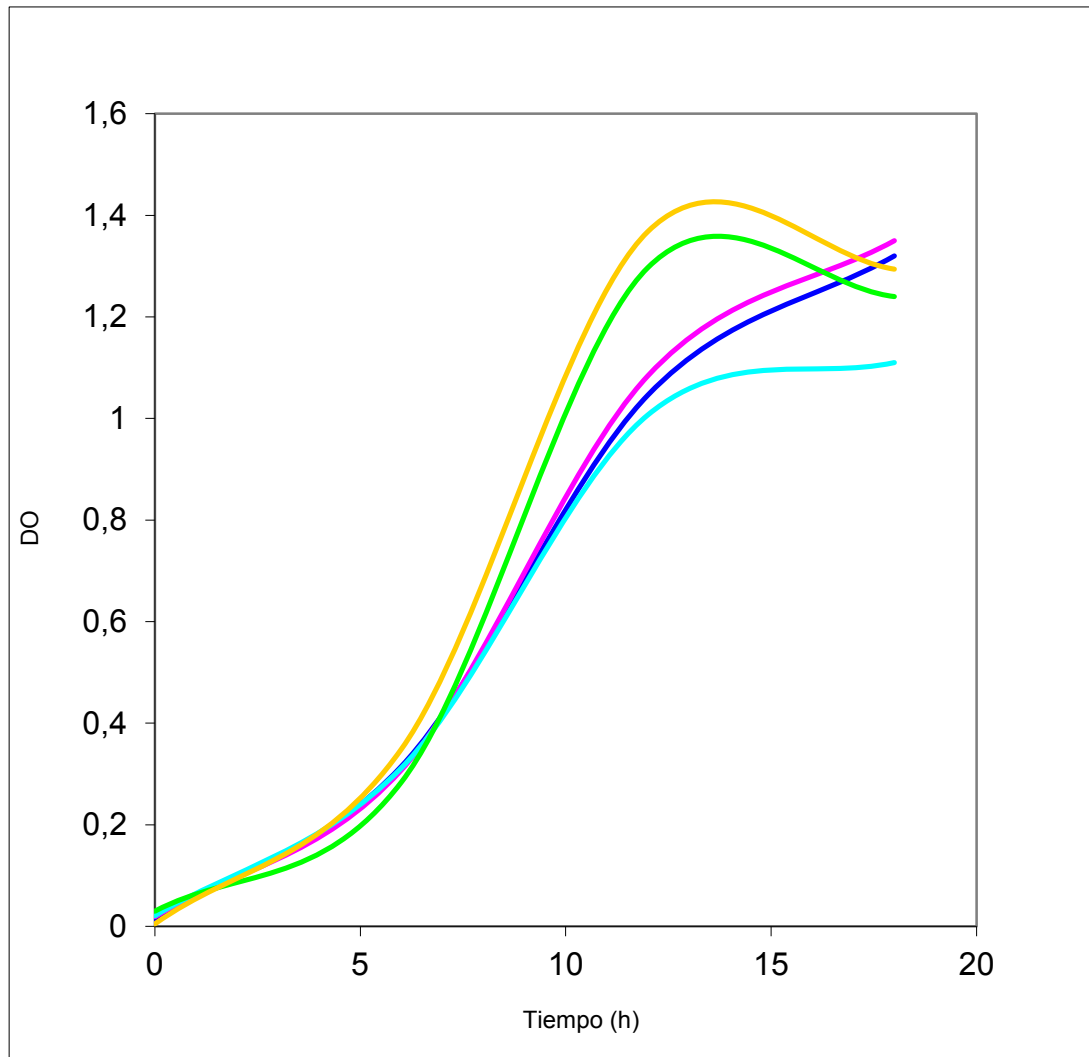
LACTOSUERO + PEPTONA DE CARNE

LACTOSUERO + FRACCION A 4%

LACTOSUERO + FRACCION A 2%

SUERO + HIDROLIZADO DE CASEINA

Figura N° 15 (b): Evolución de los valores de Densidades Ópticas de los cultivos de *Streptococcus thermophilus* Ch3-4 en función del tiempo en los distintos medios de cultivo ensayados.



Referencias:

CALDO M17

LACTOSUERO + PEPTONA DE CARNE

LACTOSUERO + FRACCION (A) 4%

LACTOSUERO + FRACCION (A) 2%

SUERO + HIDROLIZADO DE CASEINA

Tabla N° 7: Valores de DO y de concentraciones celulares de *Streptococcus thermophilus* Ch3-4 determinados en los distintos ensayos efectuados.

Medio de Cultivo	Caldo M17		Lactosuero + Peptona de carne 2%		Lactosuero + Fracción A 2%		Lactosuero + Fracción A 4%		Lactosuero + Hidrolizado total de Caseína	
	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL
0	0,017	$3,0 \times 10^5$	0,040	$3,6 \times 10^6$	0,030	$5,74 \times 10^6$	0,030	$1,3 \times 10^5$	0,011	$7,4 \times 10^5$
6	0,315	$7,1 \times 10^6$	0,308	$3,1 \times 10^6$	0,312	$4,3 \times 10^6$	0,284	$6,7 \times 10^5$	0,349	$7,6 \times 10^6$
12	1,046	$9,0 \times 10^7$	1,084	$2,1 \times 10^8$	1,007	$8,0 \times 10^7$	1,297	7×10^8	1,368	$6,0 \times 10^9$
18	1,321	$3,1 \times 10^8$	1,350	$3,9 \times 10^8$	1,110	$5,1 \times 10^7$	1,240	$9,8 \times 10^7$	1,294	$1,0 \times 10^8$

Con los valores hasta aquí expuestos, pueden ahora obtenerse resultados comparativos relativos a las cinco cepas de cocos lácticos ensayadas en el presente trabajo. Si bien debe reiterarse lo ya expresado acerca de que la cinética de crecimiento es particular para cada cepa y para cada medio de cultivo en el que se realiza la propagación, se pueden realizar también algunas otras observaciones de índole general.

Por una parte, se aprecia que el medio más adecuado para la propagación de las tres cepas del género *Enterococcus* es el lactosuero con el agregado de hidrolizado caseínico total, con el cual se han logrado valores máximos de concentración celular comprendidos entre $1,8 \times 10^{11}$ y $9,9 \times 10^9$ UFC/mL, siempre luego de un período de 12 horas de incubación.

Por otro lado, para la cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* se ha comprobado que la máxima concentración celular ($1,0 \times 10^9$ UFC/mL), considerablemente más baja que las menores obtenidas para *Enterococcus*, se consigue luego de 18 h de propagación en lactosuero adicionado con la fracción A al 4% (p/v); sin embargo, para esta cepa también se ha comprobado que el Caldo M17 y el lactosuero con agregado de hidrolizado caseínico total y con peptona de carne permiten alcanzar poblaciones cuantitativamente semejantes en sólo 12 h de incubación.

Por último, para la cepa de *S. thermophilus*, el valor máximo de concentración celular ($6,0 \times 10^9$ UFC/mL) resultó más próximo a los menores obtenidos para *Enterococcus* que el correspondiente a *L. lactis* subsp. *lactis*, y al igual que con aquellos microorganismos se logró con el agregado al lactosuero de hidrolizado caseínico total, y luego de 12 h de propagación. Pudo también comprobarse

para esta cepa que tanto el valor máximo como la cinética de crecimiento correspondientes al lactosuero con el 4% (p/v) de la fracción A, resultaron muy similares a los obtenidos con el agregado del hidrolizado caseínico total.

En función de lo expuesto puede afirmarse, a modo de primera conclusión parcial, que para la mayoría de las cepas estudiadas pertenecientes a géneros integrados por cocos lácticos, la estrategia más recomendable a aplicar para conseguir elevadas poblaciones celulares en los menores tiempos de incubación posibles, es el empleo de lactosuero con adición de hidrolizado caseínico total.

Sin embargo, los resultados obtenidos también han demostrado la imposibilidad de realizar generalizaciones contundentes, lo que refuerza el concepto preexistente en este tema acerca de que cada cepa debe ser estudiada en particular, para determinar sus condiciones óptimas de propagación y así poder establecer los parámetros más adecuados para efectuar la misma, cuando se pretende obtener cultivos starters de bacterias ácido lácticas para uso alimentario.

2.6.- Curvas de desarrollo microbiano para *Lactobacillus plantarum* Lp31.

En la Figura N°16 (a) se observa la representación de la evolución del número de unidades formadoras de colonias, expresado en escala logarítmica, en función del tiempo. Se pueden apreciar comparativamente las distintas curvas obtenidas en función de los ensayos realizados con cada uno de los cinco medios de cultivo estudiados.

En todos los casos los valores de concentraciones celulares se obtuvieron realizando conteo en placas, utilizando como medio de cultivo agar LAPT_{L5}.

En ella se aprecia que los valores iniciales de concentraciones celulares (determinados a tiempo cero) oscilaron entre 10^5 y 10^6 UFC/mL. También se aprecia que el máximo desarrollo microbiano con los distintos medios se logró entre las 6 y 18 horas de cultivo, tiempos en los que se obtuvieron valores del orden de 10^8 UFC/mL.

En las curvas se puede observar que los mejores valores de concentración celular se obtuvieron cuando *L. plantarum* Lp31 se cultivó en lactosuero adicionado con hidrolizado caseínico total, alcanzándose dicho valor máximo ($9,0 \times 10^8$ UFC/mL) luego de 18 h de cultivo. También puede apreciarse que la adición de la fracción A al 4 % (p/v) al lactosuero, si bien mostró una cinética diferente a la correspondiente al medio anterior, dio valores similares a los obtenidos cuando se adicionó el hidrolizado total, con un máximo de $8,7 \times 10^8$ UFC/mL, logrado luego de 18 h de incubación. Valores máximos inferiores pero de orden similar entre sí, y cinéticas de crecimiento prácticamente idénticas, se observan cuando Lp31 desarrolló en el medio comercial (caldo MRS) y en lactosuero con la adición de peptona de carne, lográndose en ambos casos el máximo desarrollo a las 18 horas de cultivo. Con respecto al medio de cultivo

que tiene adicionada la fracción A al 2 % (p/v), se observa que el máximo valor es sensiblemente inferior que los correspondientes a los otros medios, y que se logra a las 6 horas de cultivo, produciéndose luego una disminución progresiva de la concentración celular hasta las 18 horas de incubación.

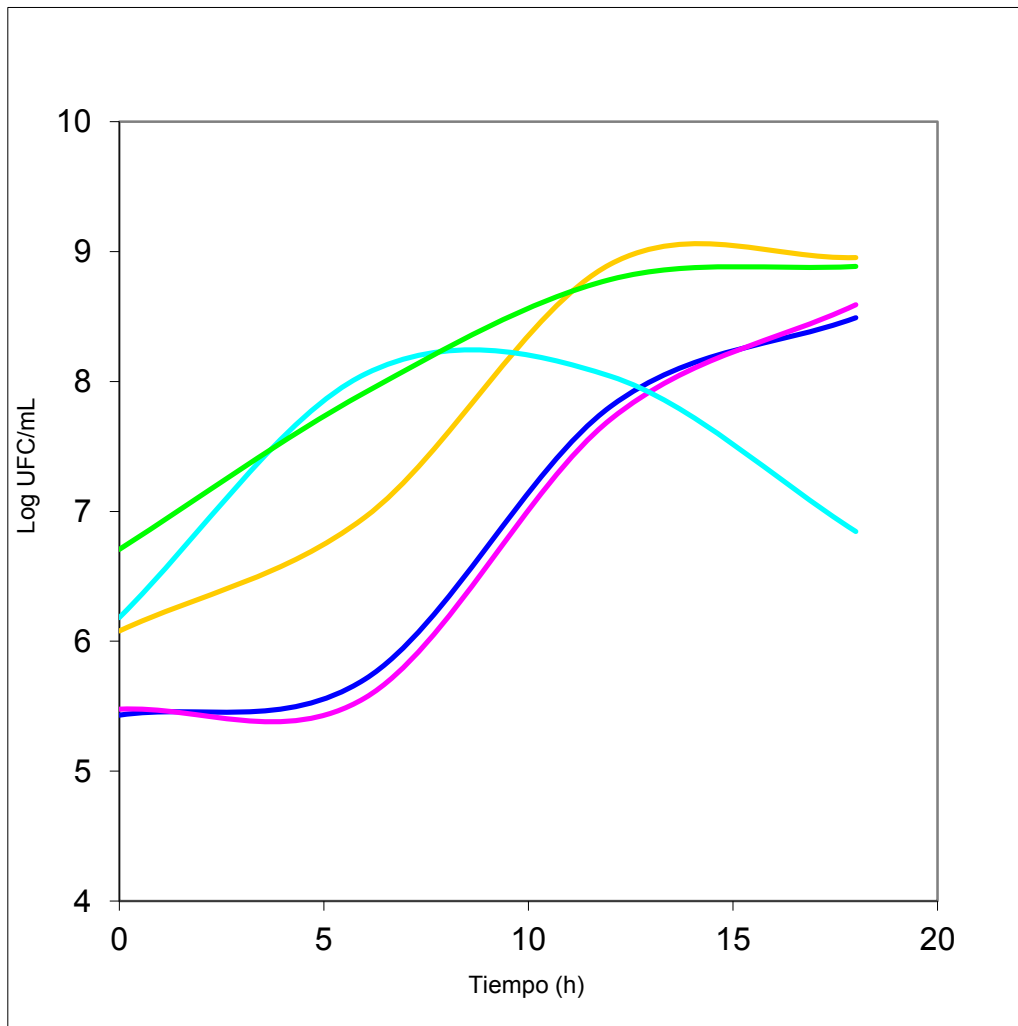
Los valores obtenidos muestran una cinética de crecimiento particular y considerablemente variable de la cepa en estudio según el medio de cultivo en el que se realiza la propagación. Sin embargo se puede observar que, aunque con valores variables y propios de cada medio, la cinética de desarrollo de este microorganismo en los cuatro medios nombrados en primer término, responde a un patrón similar de crecimiento, cosa que en cambio no se verificó cuando el agregado de fracción A disminuyó al 2 % (p/v).

Los valores de DO mostraron una aceptable correlación con los valores propios del conteo en placa, pudiendo las diferencias atribuirse, al igual que en los restantes casos, al aumento de detritos celulares así como de células muertas no lisadas presentes en el medio.

Esto se puede observar en la Figura N° 16 (b), donde se representa la evolución de las DO en función del tiempo de cultivo.

En la Tabla N° 8 se detallan los valores numéricos determinados en los diversos ensayos, a partir de los cuales se trazaron las gráficas que se observan en las Figuras N° 16 (a) y 16 (b).

Figura N° 16 (a): Evolución de las concentraciones celulares de *Lactobacillus plantarum* Lp31 en función del tiempo en los distintos medios de cultivo ensayados.



Referencias:

CALDO MRS

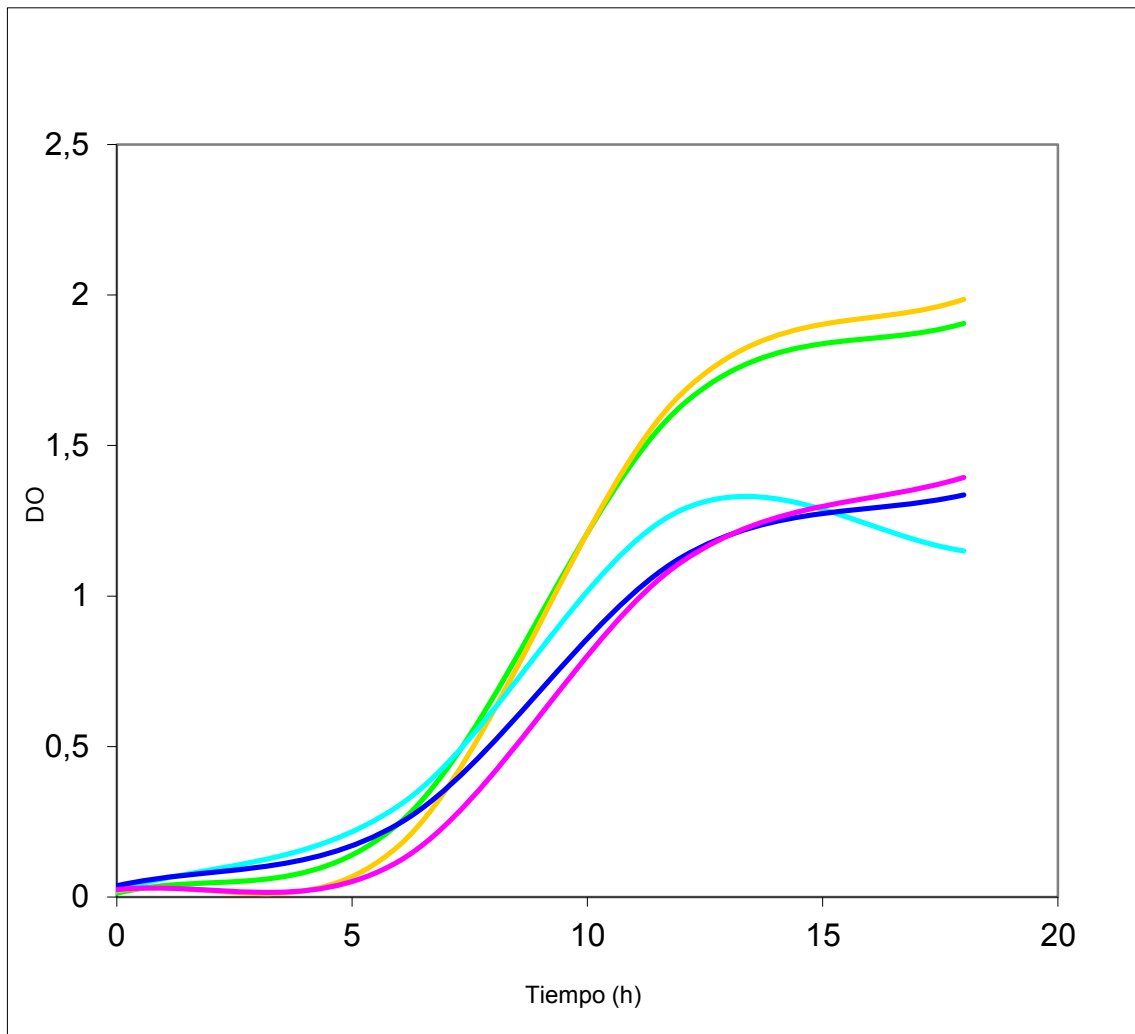
LACTOSUERO + PEPTONA DE CARNE

LACTOSUERO + FRACCION A 4%

LACTOSUERO + FRACCION A 2%

SUERO + HIDROLIZADO DE CASEINA

Figura N° 16 (b): Evolución de los valores de Densidades Ópticas de los cultivos de *Lactobacillus plantarum* Lp31 en función del tiempo en los distintos medios de cultivo ensayados.



Referencias:

MRS

LACTOSUERO + PEPTONA DE CARNE

LACTOSUERO + FRACCION (A) 4%

LACTOSUERO + FRACCION (A) 2%

SUERO + HIDROLIZADO DE CASEINA

Tabla N° 8: Valores de DO y de concentraciones celulares de *Lactobacillus plantarum*

Lp31 determinados en los distintos ensayos efectuados.

Medio de Cultivo	Caldo MRS		Lactosuero + Peptona de carne 2%		Lactosuero + Fracción A 2%		Lactosuero + Fracción A 4%		actosuero + Hidrolizado total de Caseína	
	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL
Tiempo (horas)										
0	0,037	$2,7 \times 10^5$	0,024	$3,0 \times 10^5$	0,022	$1,52 \times 10^6$	0,024	$5,1 \times 10^6$	0,024	$1,2 \times 10^6$
6	0,244	$5,1 \times 10^5$	0,119	$4,5 \times 10^5$	0,304	$1,14 \times 10^8$	0,245	$8,2 \times 10^7$	0,171	$9,0 \times 10^6$
12	1,128	$6,4 \times 10^7$	1,113	$5,1 \times 10^7$	1,286	$1,1 \times 10^8$	1,632	$6,1 \times 10^8$	1,818	$8,0 \times 10^8$
18	1,366	$4,1 \times 10^8$	1,394	$4,9 \times 10^8$	1,150	$8,0 \times 10^6$	1,906	$8,7 \times 10^8$	1,986	$9,0 \times 10^8$

2.7.- Curvas de desarrollo microbiano para *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lb92.

En la figura N° 17 (a) se observa la representación de la evolución del número de unidades formadoras de colonias, expresado en escala logarítmica, en función del tiempo. Se pueden apreciar comparativamente las distintas curvas obtenidas en función de los ensayos realizados con cada uno de los cinco medios de cultivo estudiados.

En todos los casos los valores de concentraciones celulares se obtuvieron realizando conteo en placas, utilizando como medio de cultivo agar LAPT_{L5}.

En ella se aprecia que los valores iniciales de concentraciones celulares (determinados a tiempo cero) oscilaron entre $10^5 - 10^6$ UFC/mL.

El máximo desarrollo microbiano se observó entre las 12 y 18 horas de cultivo, tiempos en los que se obtuvieron valores del orden de $10^8 - 10^{10}$ UFC/mL.

En las curvas se puede observar que los mejores valores de concentración celular se obtuvieron cuando *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lb92 se cultivó en lactosuero adicionado con hidrolizado caseínico total, alcanzándose dicho valor máximo (2.3×10^{10} UFC/mL) luego de 18 h de cultivo. También puede apreciarse que la adición de la fracción A al 4 % (p/v) al lactosuero dio valores muy similares a los obtenidos con el hidrolizado total, con una concentración máxima de 1.2×10^{10} UFC/mL, valor que también se logró al cabo de 18 h de incubación. Valores inferiores a los anteriores pero con cinéticas de crecimiento prácticamente idénticas entre sí, se observaron cuando la cepa Lp31 desarrolló en medio comercial (Caldo MRS) y en lactosuero con la adición de peptona de carne, logrando el máximo desarrollo a las 18 horas de cultivo. Con respecto al medio de cultivo que contiene la fracción A al 2 % (p/v), se observa que el

máximo valor resultó mayor que el alcanzado con caldo MRS o con lactosuero con peptona de carne, y que se logró a las 12 horas de cultivo, produciéndose luego una progresiva disminución de la concentración celular hasta las 18 horas de incubación.

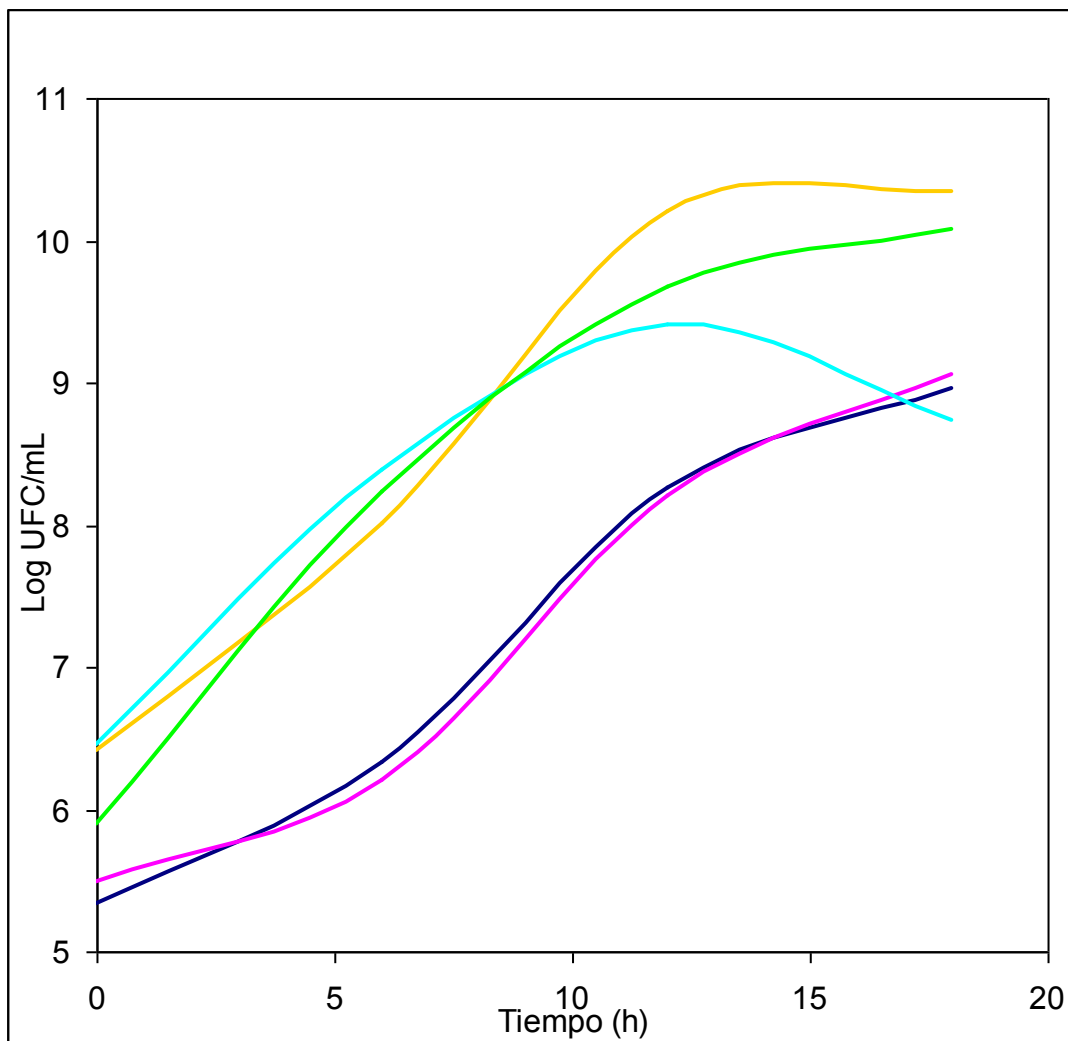
Los valores obtenidos muestran una cinética de crecimiento particular y considerablemente variable de la cepa en estudio según el medio de cultivo en el que se realiza la propagación. Sin embargo, se puede observar que, aunque con valores distintos de concentraciones celulares, la cinética determinada para los cuatro primeros medios nombrados responde a un patrón similar de evolución; en cambio, ésta se modificó cuando el agregado de la fracción A disminuyó al 2 % (p/v). Puede apreciarse que el lactosuero con agregado de hidrolizado caseínico total resultó ser también para esta cepa el medio de propagación más adecuado, y que en segundo lugar se ubicó el lactosuero adicionado con la fracción A al 4% (p/v). Los otros medios ensayados sólo permitieron obtener concentraciones celulares máximas sensiblemente menores en el mismo tiempo de cultivo, excepto el lactosuero con agregado de fracción A al 2 % (p/v), que permitió lograr el máximo desarrollo al cabo de sólo 12 h de propagación.

Los valores de DO mostraron una aceptable correlación con los valores propios del conteo en placa, verificándose una vez más diferencias atribuibles a las causas ya detalladas anteriormente.

Esto se puede observar en la Figura N° 17 (b), donde se analiza la evolución de las DO en función del tiempo.

En la Tabla N° 9 se detallan los valores numéricos determinados en los diversos ensayos, a partir de los cuales se trazaron las gráficas que se observan en las Figuras N° 17 (a) y 17 (b).

Figura N° 17 (a): Evolución de las concentraciones celulares de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lb92 en función del tiempo en los distintos medios de cultivo ensayados.



Referencias:

CALDO MRS

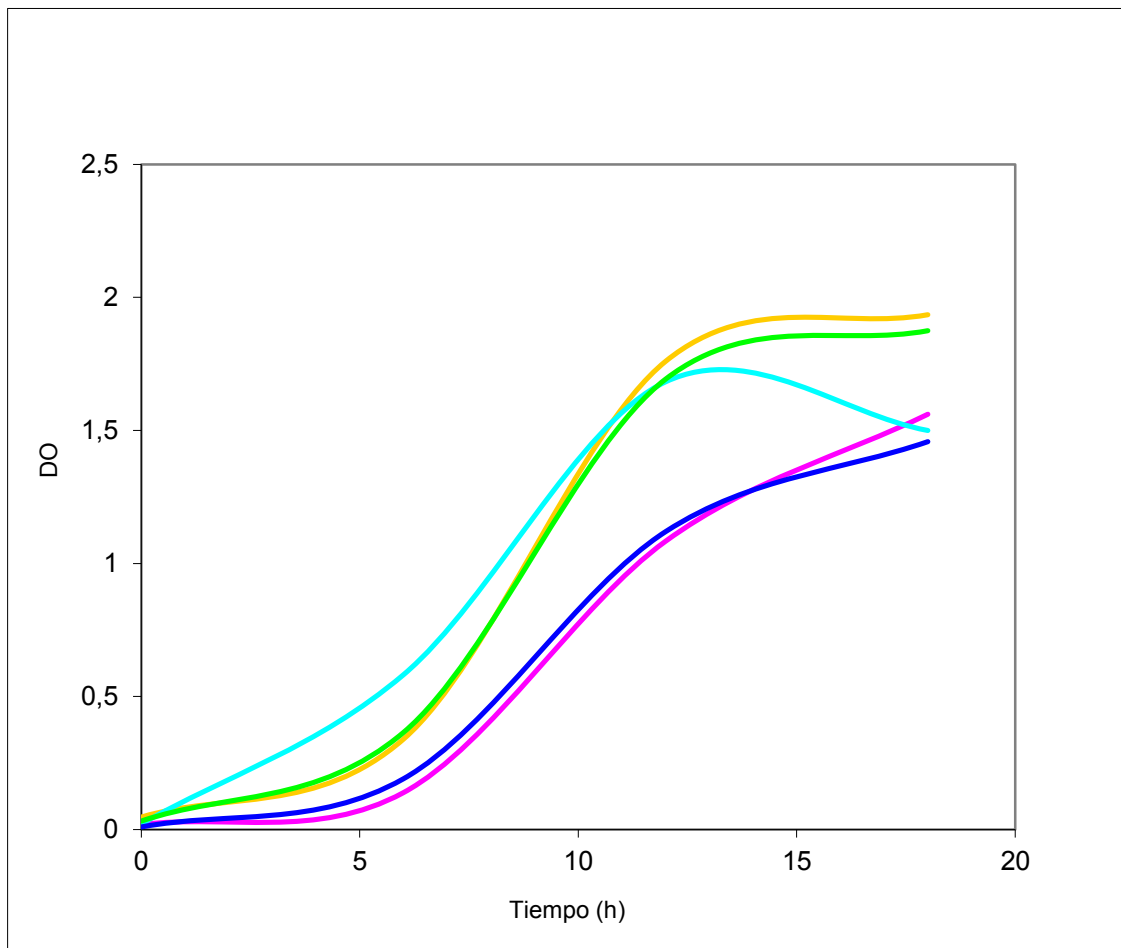
LACTOSUERO + PEPTONA DE CARNE

LACTOSUERO + FRACCION A 4%

LACTOSUERO + FRACCION A 2%

SUERO + HIDROLIZADO DE CASEINA

Figura N° 17 (b): Evolución de los valores de Densidades Ópticas de los cultivos de *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* Lb92 en función del tiempo.



Referencias:

CALDO MRS

LACTOSUERO + PEPTONA DE CARNE

LACTOSUERO + FRACCION A 4%

LACTOSUERO + FRACCION A 2%

SUERO + HIDROLIZADO DE CASEINA

Tabla N° 9: Valores de DO y de concentraciones celulares de *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus* Lb92 determinados en los distintos ensayos efectuados.

Medio de Cultivo	Caldo MRS		Lactosuero + Peptona de carne 2%		Lactosuero + Fracción A 2%		Lactosuero + Fracción A 4%		Lactosuero + Hidrolizado total de Caseína	
	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL	DO	UFC/mL
Tiempo (horas)										
0	0,010	2,23x10 ⁵	0,019	3,02x10 ⁵	0,021	2,9x10 ⁶	0,032	8,0x10 ⁵	0,047	2,9x10 ⁶
6	0,188	2,13x10 ⁶	0,139	1,58x10 ⁶	0,538	2,51x10 ⁸	0,368	1,69x10 ⁸	0,340	1,04x10 ⁸
12	1,113	1,77x10 ⁸	1,084	1,58x10 ⁸	1,683	2,63x10 ⁹	1,695	4,8x10 ⁹	1,760	1,7x10 ¹⁰
18	1,455	9,12x10 ⁸	1,561	1,15x10 ⁹	1,50	5,62x10 ⁸	1,875	1,2x10 ¹⁰	1,935	2,3x10 ¹⁰

Con los valores de cinética de crecimiento obtenidos para las dos cepas estudiadas que integran el género *Lactobacillus*, se puede afirmar que ambas presentaron evoluciones poblacionales particulares para cada medio de cultivo, pero prácticamente idénticas si se compara el desarrollo de cada cepa en el mismo medio. La única excepción a la afirmación realizada en primer término la constituyen el Caldo MRS y el lactosuero con agregado de peptona de carne, dado que en ambos medios las dos cepas mostraron curvas de crecimiento prácticamente superpuestas. Cabe aquí aclarar que el número de cepas de *Lactobacillus* estudiado es sumamente exiguo, por lo que de los resultados sólo se puede inferir una cierta tendencia, que de ningún modo es generalizable a todos los integrantes de este género, que además es el más complejo entre los que constituyen las denominadas bacterias del ácido láctico.

En función de los resultados logrados, se puede decir que el medio que permite conseguir los mayores valores de concentración celular para estas cepas es el lactosuero con el agregado de hidrolizado caseínico total. Si bien estos valores han mostrado importantes diferencias entre sí, ya que han variado entre 2.3×10^{10} y 9.0×10^8 UFC/mL, siempre han sido los máximos alcanzados y siempre se han logrado luego de un período de 18 horas de incubación.

También es conveniente destacar que el lactosuero con el agregado de la fracción A al 4% (p/v) ha proporcionado para estas dos cepas valores máximos de concentración celular muy similares a los obtenidos con el hidrolizado caseínico total, comprendidos entre 1.2×10^{10} y $8,7 \times 10^8$ UFC/mL, igualmente logrados al cabo de 18 h de propagación.

Comparando las cinéticas de crecimiento determinadas para todas las cepas de bacterias del ácido láctico en estudio, sean éstas cocos o bacilos, puede

afirmarse que el medio más adecuado para seis de las siete cepas ensayadas ha resultado ser el lactosuero con la adición de hidrolizado caseínico total. La excepción la constituye la cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* Sf1-1, para la que se ha comprobado que la máxima concentración celular se consigue en lactosuero adicionado con la fracción A al 4% (p/v); sin embargo, para esta cepa también se ha determinado que el lactosuero con agregado de hidrolizado caseínico total permite alcanzar una población cuantitativamente semejante y en menor tiempo de cultivo. También se aprecia que, para la cepa de *E. faecium* E23, la de *S. thermophilus* Ch 3-4 y las dos de *Lactobacillus*, el medio que ocupa el segundo lugar en cuanto a conveniencia es el lactosuero con adición de la fracción A al 4% (p/v).

En función de lo expuesto sobre los estudios de cinética de crecimiento, se puede afirmar que, para la mayoría de las cepas de bacterias del ácido láctico, la estrategia más recomendable a aplicar para conseguir elevadas poblaciones celulares es el empleo de lactosuero con adición de hidrolizado caseínico total, seguida por la utilización de lactosuero con agregado de la fracción A al 4% (p/v).

Conviene nuevamente reiterar aquí que la cinética de crecimiento es particular para cada cepa y para cada medio de cultivo en el que se realiza la propagación, y que los resultados obtenidos han demostrado la imposibilidad de realizar generalizaciones contundentes. Todo esto ratifica el concepto preexistente acerca de que cada cepa debe ser estudiada en particular, para

determinar sus condiciones óptimas de propagación y así poder establecer los parámetros más adecuados para efectuar la misma, cuando se pretende obtener elevadas poblaciones celulares destinadas a la preparación de cultivos starters de bacterias ácido lácticas para uso alimentario.

De acuerdo con nuestro conocimiento, la probable capacidad del hidrolizado caseínico total y de la fracción del mismo que ha sido denominada como fracción A, para actuar como promotoras del crecimiento de bacterias del ácido láctico, no ha sido estudiada previamente por otros investigadores. Sin embargo y a pesar de ello, pueden realizarse comparaciones de los resultados aquí obtenidos con los logrados en estudios previos relativos al uso de medios de cultivo alternativos para la propagación de estas bacterias, formulados en base a suero de quesería con el agregado de nutrientes complementarios.

Así por ejemplo, se puede afirmar que los resultados obtenidos con la cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* Sf 1-1 son similares a los logrados con otra cepa de este mismo microorganismo por Garat et al. (1983, 1984) y por Carrasco et al. (1986). Estos autores demostraron la conveniencia del uso de lactosuero con el agregado de un 2 % (p/v) de triptona y de un 0,2 % (p/v) de $MnSO_4$, frente al empleo del medio sintético propuesto por Elliker et al. (1956), y aconsejado por Bergère (1968) y por Gilliland (1977), ampliamente utilizado en esa época para el cultivo de bacterias del ácido láctico para la formulación de starters. También Scarinci et al. (1997), trabajando en la optimización de la propagación de una cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* y de una de *L. lactis* subsp. *cremoris*, demostraron la superioridad de un medio preparado a partir de suero de quesería con el agregado de triptona y de $MnSO_4$, frente al medio LAPT-L5,

recomendado por Peral de Portillo et al. (1988) para el cultivo de estos microorganismos.

De igual modo, los mismos autores mencionados en el párrafo anterior (Scarinci et al., 1997) también pudieron comprobar la superioridad del medio preparado a partir de lactosuero con respecto al medio LAPT-L5, para la obtención de cultivos de una cepa de *S. thermophilus* con la más alta concentración celular. Es de destacar que el valor máximo alcanzado por estos autores con la cepa ensayada, aún en el caso de propagaciones con pH controlado en un valor constante de 6,5, mediante el agregado automático de NH_4OH al 14 % (v/v), fue levemente inferior al logrado en el presente estudio, sin aplicar control automático de pH. Por otra parte, Carrasco et al. (2005) también informan haber obtenido para tres cepas de *S. thermophilus* propagadas en caldo LAPT-L5, valores de concentraciones celulares máximas inferiores en más de un ciclo logarítmico a los logrados en el presente trabajo con la cepa de *S. thermophilus* propagada en lactosuero adicionado con el hidrolizado caseínico total.

En lo que respecta a las cepas de *Enterococcus*, los resultados logrados en el presente estudio son comparables a los obtenidos por Scarinci et al. (1994). Estos autores consiguieron la más alta población celular luego de 12 h de cultivo empleando un medio preparado a base de lactosuero con el agregado de triptona y de MnSO_4 , demostrando la superioridad de dicho medio frente a los aconsejados por Richardson et al. (1977, 1979), Wright y Richardson (1982), Sandine (1979) y Peebles et al. (1969). Cabe aclarar que la concentración celular máxima conseguida con el medio a base de lactosuero para la cepa de *Enterococcus faecalis* estudiada por Scarinci et al. (1994), fue

sensiblemente menor que las logradas en el presente estudio con las tres cepas de *Enterococcus* ensayadas.

En lo que respecta a la cepa de *L. plantarum* Lp31, los resultados determinados son parcialmente coincidentes con los obtenidos por Bainotti et al. (1986), dado que estos autores demostraron la conveniencia de la utilización de un medio a base de lactosuero con el agregado de un 1,5 % (p/v) de extracto de carne comercial y de un 2 % (p/v) de D(+)-glucosa, para la propagación de una cepa de esta especie perteneciente a la colección ATCC. Sin embargo, esta conveniencia sólo resultó válida desde el punto de vista económico, debido al bajo costo del suero de leche, ya que la concentración celular máxima lograda resultó igual, pero no superior, a la alcanzada con el medio comercial de Man, Rogosa y Sharpe (caldo MRS).

Por último, los resultados obtenidos con la cepa de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* muestran igual tendencia que la demostrada por Scarinci et al. (1997) al comparar el uso del medio a base de lactosuero frente a la utilización del caldo LAPT-L5, para una cepa de la misma subespecie y una de *L. helveticus*. Merece destacarse que los valores máximos de concentración celular alcanzados para las dos cepas en estudio en la investigación precedente, fueron francamente inferiores (un ciclo logarítmico) que los logrados en el presente estudio utilizando el aditamento de hidrolizado caseínico total y de la fracción A al 4 % (p/v), aún con la ventaja de que los investigadores citados trabajaron con control de pH a un valor de 6,5, mediante el agregado automático de NH₄OH al 14 % (v/v). Asimismo, los valores de concentraciones celulares máximas obtenidos en el presente trabajo empleando lactosuero con el agregado del hidrolizado caseínico total y del 4 %

(p/v) de la fracción A, también superaron ampliamente a los logrados por Carrasco et al. (2005) para tres cepas de la misma subespecie propagadas en caldo LAPT-L5.

Para realizar una discusión final en función de los requerimientos de fuente de nitrógeno que sean fácilmente asimilables por las bacterias lácticas, se puede hacer alusión a lo expuesto por Desmazeaud M. (2000),

Quien muestra en detalle las necesidades relativas a los distintos aminoácidos de las diferentes especies de microorganismos que constituyen las denominadas bacterias ácido lácticas. Se puede observar que, en el caso de los lactobacilos, las necesidades externas de provisión de aminoácidos están orientadas hacia nueve de estos, entre ellos el ácido glutámico y la isoleucina, encontrados en dos de los péptidos que constituyen la fracción A. Esto justifica el efecto promotor del crecimiento de las cepas del género *Lactobacillus* observado para la fracción A, como así también el mayor efecto promotor verificado para el hidrolizado caseínico total, dado que en el mismo se encuentran los aminoácidos mencionados junto a otros tales como ácido aspártico, valina, metionina, leucina, tirosina, lisina e histidina, que pueden favorecer aún más el desarrollo de las cepas integrantes de este género.

Para el caso de los lactococos y según el mismo autor, las necesidades se remiten a cuatro aminoácidos, dos de los cuales, histidina y leucina, se encuentran en el decapeptido integrante de la fracción A en estudio. Además, en una de las dos fracciones provenientes de la β A2 caseína, y que por lo tanto integran la denominada fracción A, observamos también la existencia de

isoleucina y valina, otros de los aminoácidos indicados como esenciales para los cocos lácticos.

Por su parte, los estreptococos lácticos termófilos son auxotrofos para ocho aminoácidos, dos de los cuales, histidina y leucina, están presentes en el decapeptido, y otros dos, ácido glutámico y valina, en el péptido proveniente de k-caseína, aunque cistina, metionina, triptofano y tirosina también se describen como constituyentes del hidrolizado total de caseínas.

En función de los requerimientos aminoacídicos analizados se puede deducir que, para la mayoría de los casos estudiados, el crecimiento de las cepas de bacterias ácido lácticas ha sido estimulado por el hidrolizado total de caseínas debido a que éste es más rico en aminoácidos y péptidos cortos, los que resultarían entonces fácilmente asequibles para las células de estos microorganismos cuando se las cultiva en un medio al que se ha agregado el citado hidrolizado total. Sin embargo, no se puede dejar de considerar la importancia observada en la estimulación del desarrollo bacteriano cuando el medio de cultivo a base de lactosuero fue enriquecido con un 4% (p/v) de la fracción A; debe aquí destacarse que con este agregado se ha superado al hidrolizado comercial cuando se analizó el rendimiento en células de la cepa de *L. lactis* subsp. *lactis*, subespecie integrante del género con la menor cantidad de aminoácidos requeridos exógenamente.

3.- Propiedades tecnológicas de las cepas de bacterias ácido lácticas.

Se estudiaron las propiedades de mayor interés en tecnologías alimentarias, según se ha descrito en la Sección Materiales y Métodos, de las siete cepas previamente propagadas en los caldos MRS o M17 (Merck), según se tratase de bacilos o de cocos lácticos, respectivamente, y en los medios formulados en base a suero de quesería con el agregado de un 2 % (p/v) del hidrolizado total de caseína y de un 4 % (p/v) de la fracción A. Los Caldos MRS o M17 (Merck) se emplearon como medios de referencia, y los otros dos se seleccionaron por ser los que arrojaron los mejores resultados en las experiencias efectuadas para determinar la cinética de crecimiento de las poblaciones celulares.

La capacidad de producción de sustancias antimicrobianas tipo bacteriocinas se estudió solamente en cuatro cepas de bacterias ácido lácticas. Las mismas fueron seleccionadas en función de ensayos previos, mediante los cuales se determinó su real actividad inhibitoria frente a distintas especies y cepas bacterianas utilizadas como blancos.

3.1.- Actividad acidificante:

Para su determinación se utilizó solución de NaOH N/9 (factor: 0,9151), a fin de efectuar las valoraciones de la acidez generada por cada una de las cepas.

Los resultados se expresaron como acidez en grados Dornic (°D), equivalente a gramos de ácido láctico presentes en 100 mL de la leche en la que se hizo desarrollar a cada una de las cepas, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\text{°D} = \text{volumen gastado de NaOH} \times 20 \times \text{factor.}$$

donde 20 corresponde al factor de dilución relativo al volumen de leche utilizado en la titulación con NaOH (se utilizaron 5 mL y se lo refirió a 100 mL de leche).

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, y los resultados se expresaron como promedios de los valores individuales obtenidos en cada determinación.

Los valores promedios obtenidos para cada uno de los tiempos ensayados y para cada cepa se detallan en las siguientes Tablas, donde se indica con la abreviatura HT la utilización como medio de propagación de lactosuero con el agregado de un 2 % (p/v) de hidrolizado caseínico total, como A 4% el empleo de lactosuero con la adición de un 4 % (p/v) de la fracción A, y como **Vol (mL)** el volumen de la solución de NaOH gastado en la titulación.

Tabla N°10: Actividad acidificante correspondiente a la cepa de *Enterococcus faecium* E23.

<i>E. faecium</i> E23	Vol. (mL)	°D	Vol. (mL)	°D	Vol. (mL)	°D	Vol. (mL)	°D
	12 horas		24 horas		48 horas		5 días	
M17	1,5	27,47	1,9	34,78	3,6	65,89	5,3	97,01
HT	1,5	27,47	2,0	36,61	4,0	73,22	5,6	102,50
A 4%	1,5	27,47	2,1	38,44	4,2	76,88	7,1	129,96

Tabla N° 11: Actividad acidificante correspondiente a la cepa de *Enterococcus faecalis* E24.

<i>E. faecalis</i> E24	Vol. (mL)	°D	Vol. (mL)	°D	Vol. (mL)	°D	Vol. (mL)	°D
	12 horas		24 horas		48 horas		5 días	
M17	1,4	25,63	1,7	31,12	3,9	71,39	6,9	126,30
HT	1,2	21,96	1,5	27,46	4,7	86,03	7,8	142,77
A 4%	1,0	18,30	1,6	29,29	5,1	93,35	7,7	140,94

Tabla N° 12: Actividad acidificante correspondiente a la cepa de *Enterococcus faecalis* E30.

<i>E. faecalis</i> E30	Vol. (mL)	°D	Vol. (mL)	°D	Vol. (mL)	°D	Vol. (mL)	°D
	12 horas		24 horas		48 horas		5 días	
M17	4,0	73,22	4,9	86,69	5,0	91,52	7,4	135,45
HT	3,6	65,89	4,5	82,37	5,0	91,52	7,9	144,60
A 4%	3,2	58,57	3,8	69,55	5,2	95,18	8,0	146,43

Tabla N° 13: Actividad acidificante correspondiente a la cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sf1-1.

<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Sf1-1	Vol. (mL)	°D	Vol. (mL)	°D	Vol. (mL)	°D	Vol. (mL)	°D
	12 horas		24 horas		48 horas		5 días	
M17	1,3	23,79	1,3	23,79	4,0	73,22	5,0	91,52
HT	1,3	23,79	1,3	23,79	4,2	76,88	5,1	93,35
A 4%	1,2	21,96	1,5	27,46	5,1	93,35	7,5	129,96

Tabla N° 14: Actividad acidificante correspondiente a la cepa de *Streptococcus thermophilus* Ch3-4.

S. <i>thermophilus</i> Ch3-4	Vol.	°D	Vol.	°D	Vol.	°D	Vol.	°D
	(mL)		(mL)		(mL)		(mL)	
	12 horas		24 horas		48 horas		5 días	
M17	1,8	32,95	1,9	34,78	3,6	65,89	5,3	97,01
HT	1,6	29,29	2,0	36,61	4,0	73,22	5,6	102,50
A 4%	1,3	23,80	2,1	38,44	4,2	76,88	7,1	129,96

Tabla N° 15: Actividad acidificante correspondiente a la cepa de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lb92.

L. <i>delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Lb92	Vol.	°D	Vol.	°D	Vol.	°D	Vol.	°D
	(mL)		(mL)		(mL)		mL)	
	12 horas		24 horas		48 horas		5 días	
MRS	1,5	27,47	2,1	38,44	3,7	67,72	5,7	104,33
HT	1,4	25,63	2,6	47,59	3,7	67,72	6,3	115,32
A 4%	1,9	34,78	3,2	58,57	4,1	75,05	6,0	109,82

Tabla N° 16: Actividad acidificante correspondiente a la cepa de *Lactobacillus plantarum* Lp31.

L. <i>plantarum</i> Lp31	Vol. (mL)	°D	Vol. (mL)	°D	Vol. (mL)	°D	Vol. (mL)	°D
	12 horas		24 horas		48 horas		5 días	
MRS	1,1	20,13	2,5	45,76	3,1	56,74	5,9	107,99
HT	1,3	23,79	2,5	45,76	3,6	65,89	5,9	107,99
A 4%	1,5	27,46	2,6	47,59	3,9	71,39	6,2	113,48

A modo de comentario general relativo al conjunto formado por todos los valores obtenidos, puede decirse que la actividad acidificante resultó variable de cepa a cepa, aún dentro de un mismo género bacteriano, y que su tendencia a aumentar o disminuir según el medio utilizado para la propagación también ha sido variable para cada cepa y en función del tiempo al que se determinó dicha actividad.

En todos los casos se observó un mayor aumento de la acidez en función del tiempo cuando el medio de desarrollo era suero de quesería con fracción caseínica A al 4 % (p/v), detectándose en este caso los valores más altos de acidez total luego de 48 h y/o 5 días de incubación.

Sin embargo, los valores correspondientes de acidez son similares a los encontrados cuando las cepas fueron previamente propagadas en lactosuero con el agregado de un 2 % (p/v) de hidrolizado caseínico total, aunque estos resultaron algo inferiores cuando se los determinó luego de 5 días de incubación, excepto para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Lb92 y para *E. faecalis* E24, cepas para las cuales la adición del hidrolizado total permitió superar levemente la acidez alcanzada con respecto a la observada con el agregado de la fracción A.

Cabe también aclarar que cuando la acidez se determinó luego de un período de incubación corto (12 h), para la mayoría de las cepas de cocos lácticos se lograron mejores valores cuando previamente se las propagó en lactosuero adicionado con el hidrolizado total o en el medio comercial de referencia, que cuando se utilizó la fracción A.

En lo que respecta a las cepas de *E. faecium* E23 y de *E. faecalis* E24, los valores de actividad acidificante determinados a las 12 y 24 horas son comparables con los encontrados en investigaciones previas (Scarinci H. y col., 1994; Carrasco M. y col., 1992; Neviani E. y col., 1982; Neviani E. y Mucchetti G., 1982; Battistotti B. y Bottazzi V., 1974; Schmidt J. y Lenoir J., 1972); en cambio, los valores determinados al cabo de 5 días de incubación para estas cepas fueron netamente superiores a los informados por los investigadores mencionados, especialmente cuando se utilizó lactosuero con la adición del hidrolizado total o de la fracción A como medio de propagación previa. Por otra parte, *E. faecalis* E30, la cepa con mayor velocidad de acidificación de las tres de enterococos estudiadas, mostró ya desde el comienzo de la experiencia (12 h de incubación) una actividad acidificante mucho mayor que la informada en las investigaciones previas de referencia. Cabe agregar también aquí que los resultados obtenidos confirman las afirmaciones realizadas por Sarantinopoulos y col., 2001, Suzzi y col., 2000 y Villani y Coppola, 1994, acerca de que el mayor potencial acidificante detectado en el género *Enterococcus* corresponde a cepas de *E. faecalis* de origen alimentario.

En el caso de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sf1-1, los resultados obtenidos se pueden comparar con los informados por Scarinci H. y col., 1994, quienes estudiaron 15 cepas de esta misma subespecie. En la comparación se observa que los valores iniciales de acidez (12 y 24 h de incubación) determinados por estos investigadores son notablemente mayores que los obtenidos para la cepa Sf1-1. Sin embargo, luego de 48 h de incubación la situación se modifica y los valores obtenidos para la cepa en estudio en el presente trabajo son similares a los de referencia cuando se utiliza Caldo M17 (Merck) o lactosuero con la

adición del hidrolizado caseínico total, y francamente superiores cuando se emplea lactosuero con fracción A como medio de propagación. Cabe aclarar que los resultados informados por Scarinci H. y col., 1994, son similares a los obtenidos por otros investigadores tales como Thomas T., 1985, Stadhouders J., 1986, Alais C., 1985, Sandine W., 1979, etc.

En lo que respecta a la cepa de *Streptococcus thermophilus* Ch3-4, se puede observar que ha manifestado una actividad acidificante sensiblemente mayor cuando previamente se la propagó en lactosuero adicionado con la fracción A o con el hidrolizado caseínico total, excepto para los tiempos iniciales de incubación (12 y 24 h), en los que la propagación en Caldo M17 (Merck) mostró valores muy próximos a los alcanzados con lactosuero suplementado. Los resultados obtenidos para esta cepa son comparables a los informados por Scarinci y col., 1994, y por los otros autores mencionados en el párrafo precedente, pero sólo en lo que se refiere a la evolución de la actividad acidificante en función del tiempo de incubación; por lo contrario, no existe coincidencia en lo que respecta a los valores de acidez determinados, pues los informados para las cepas estudiadas por estos investigadores son muy superiores a los detectados para la cepa evaluada en el presente trabajo. En cambio, si se comparan estos resultados con los informados por Carrasco y col., 2005, para tres cepas de *S. thermophilus*, puede apreciarse que estos autores detectaron para sus cepas una mayor actividad acidificante que la determinada para la cepa Ch3-4 a las 24 h de incubación; sin embargo, luego de 5 días de cultivo esta cepa mostró valores de capacidad de acidificación superiores a los valores de referencia, cuando había sido previamente

propagada en lactosuero con el agregado del hidrolizado caseínico total y, especialmente, de la fracción A.

En lo que se refiere a las dos cepas del género *Lactobacillus* ensayadas en el presente estudio, además de lo ya explicitado al comienzo de esta discusión puede agregarse que, si los valores obtenidos se comparan con los informados por otros autores tales como Scarinci H. y col., 1994, Thomas T., 1985, Stadhouders J., 1986, Alais C., 1985, Sandine W., 1979, Carrasco y col., 1991, Soncini y col., 1982, Egan A., 1983, Miccino J., 1983 y Zaika y Kissinger, 1979, se observa algo muy similar a lo ya detallado para *S. thermophilus* Ch 3-4: coincidencia en la evolución de la actividad acidificante en función del tiempo de incubación, y diferencias muy importantes en los valores de acidez determinados, pues los informados para las cepas estudiadas por estos investigadores superan ampliamente a los detectados para las cepas evaluadas en el presente trabajo. Si los resultados se comparan con los informados para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* por Carrasco y col., 2005, se aprecia que también en el caso de los lactobacilos estos autores detectaron para sus cepas una mayor actividad acidificante que la demostrada por las del presente estudio a las 24 h de incubación, pero luego de 5 días de cultivo sus resultados fueron coincidentes con los aquí expuestos.

3.2.- Actividad lipolítica:

Siguiendo la técnica descrita previamente se obtuvieron los resultados detallados en la Tabla N° 15, expresados como microequivalentes de ácidos grasos libres por mililitro de leche.

Las lecturas se realizaron contra blanco de reactivo (leche estéril).

Para el cálculo se utilizó la siguiente fórmula (Deeth H., 1975):

$$\frac{T \times N \times 10^3}{P \times 3}$$

Donde:

T: Volumen neto de la titulación (mL).

N: Normalidad de la solución de KOH metanólico (meq/mL).

P: Proporción de la fase superior titulada (volumen de la alícuota / volumen total de la fase superior).

3: Volumen de leche (mL).

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, y los resultados se expresaron como promedios de los valores individuales obtenidos en cada determinación.

Tabla N° 15: Actividad lipolítica de las cepas de bacterias ácido lácticas desarrolladas en los medios de cultivo seleccionados.

Microorganismo	Medio	A	B	P	C	µeq/mL
<i>Enterococcus faecium</i> E23	M17	7,5	7,7	0,97	2,2	12,09
	HT 2%	7,5	8,0	0,94	2,5	14,70
	A 4%	7,5	8,0	0,94	2,6	15,41
<i>Enterococcus faecalis</i> E24	M17	7,6	7,6	1,0	2,2	11,70
	HT 2%	7,5	7,5	1,0	2,9	16,37
	A 4%	3,0	14,0	0,21	0,7	19,24
<i>Enterococcus faecalis</i> E30	M17	7,5	7,5	1,0	3,1	16,96
	HT 2%	7,5	8,2	0,91	3,3	20,35
	A 4%	7,5	8,6	0,87	3,4	22,29
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Sf1-1	M17	7,5	7,8	0,96	2,0	10,86
	HT 2%	7,5	7,6	0,98	2,2	11,93
	A 4%	7,5	7,7	0,92	2,0	11,46
<i>Streptococcus thermophilus</i> Ch3-4	M17	7,5	9,3	0,81	2,1	13,58
	HT 2%	7,5	8,5	0,88	2,6	15,99
	A 4%	7,5	8,3	0,90	3,0	22,29
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Lb92	MRS	7,5	7,7	0,97	2,0	10,72
	HT 2%	7,5	7,8	0,96	2,2	12,25
	A 4%	7,5	7,5	1,0	2,0	10,72
<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> Lp31	MRS	7,5	7,5	1,0	1,6	7,63
	HT 2%	7,5	7,6	0,99	2,0	10,43
	A 4%	7,5	7,6	0,99	1,9	9,76

Referencias: A: Volumen fase superior titulado (en mL).

B: Volumen total fase superior (en mL).

P: Proporción de la fase superior titulada

C: Volumen de la solución de KOH metanólico utilizado en la titulación (en mL).

De los resultados obtenidos y detallados en la Tabla N° 15, analizándolos de manera general, se deduce que, para la mayoría de las cepas estudiadas, los valores indicadores de un mayor grado de actividad lipolítica se obtuvieron cuando dichas cepas fueron previamente propagadas en un el medio formulado en base a suero de quesería con la adición de la fracción A al 4% (p/v). También puede apreciarse que en todos los casos el uso en la propagación previa en lactosuero con el agregado del hidrolizado caseínico total al 2% (p/v), se tradujo en un grado de actividad de los respectivos sistemas lipolíticos mayor que el determinado cuando la propagación de las cepas se efectuó en el medio de referencia (Caldos M17 o MRS, Merck).

Estas observaciones permiten afirmar que la presencia de hidrolizados caseínicos en el medio utilizado para la propagación de cepas de bacterias ácido lácticas ejerce un efecto estimulador de las enzimas responsables de su capacidad lipolítica. Esta afirmación se afianza plenamente, al igual que las efectuadas antes para la actividad acidificante, si se tiene en cuenta que las determinaciones de las diversas propiedades tecnológicas se realizaron partiendo de concentraciones estandarizadas de células obtenidas de las propagaciones previas, lo que deja de lado todo tipo de especulación relacionado con el número de células participantes en cada ensayo efectuado para determinar estas propiedades de interés tecnológico.

Si los resultados se analizan de modo más particularizado, se pueden realizar las siguientes deducciones:

- Para las tres cepas de enterococos resultó conveniente el agregado de los hidrolizados caseínicos en estudio a fin de incrementar la actividad de sus respectivos sistemas lipolíticos, siendo más conveniente la

adición de la fracción A que la del hidrolizado total; esta ventaja ha resultado más notable para las dos cepas de *E. faecalis*, las que habitualmente poseen sistemas lipolíticos cuantitativamente más importantes que las de *E. faecium*.

- Entre todos los cocos lácticos estudiados, la cepa de *S. thermophilus* presentó la diferencia más notable a favor de la utilización durante la propagación de lactosuero adicionado del 4% (p/v) de la fracción A. Además, en estas condiciones de propagación previa, la capacidad de lipólisis de esta cepa igualó a la de la cepa más lipolítica de *E. faecalis*.
- La cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* presentó, como era previsible, la menor capacidad lipolítica, y ésta sólo resultó levemente incrementada por el uso de lactosuero adicionado con fracciones caseínicas durante la etapa de propagación.
- Las dos cepas de lactobacilos en ensayo mostraron escasa actividad lipolítica, similar o aún menor que la correspondiente a *L. lactis* subsp. *lactis*, y para ambas resultó más conveniente el agregado del hidrolizado total que el de la fracción A.
- En particular para la cepa de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, el agregado de la fracción A no mostró ninguna diferencia con respecto al uso del medio de referencia, y para la cepa de *L. plantarum*, la menos lipolítica de todas las estudiadas, la diferencia detectada en relación a estas dos condiciones de propagación resultó poco significativa.

Los resultados obtenidos para las cepas de enterococos muestran ciertas similitudes con los oportunamente informados por Carrasco y col., 1992, y por Mucchetti y col., 1982, ya que si bien estos investigadores utilizaron otra

metodología de trabajo para evaluar 61 cepas de diferentes especies de *Enterococcus*, también ellos concluyeron que la habilidad de estos microorganismos para liberar ácidos grasos a partir de los triglicéridos de la leche es sumamente variable de cepa a cepa, aún dentro de la misma especie. Por otra parte y en coincidencia con los resultados aquí expuestos, también demostraron que las cepas más lipolíticas detectadas pertenecían a la especie *E. faecalis*.

De igual modo, Sarantinopoulos y col., 2001, comprobaron la capacidad de cepas de enterococos para hidrolizar triglicéridos, demostrando que las cepas más lipolíticas eran las de origen alimentario o veterinario, pertenecientes a la especie *E. faecalis*, seguidas en orden decreciente por las cepas de *E. durans* y *E. faecium*.

Asimismo, Foulquié Moreno y col., 2006, sostienen que si bien las bacterias ácido lácticas son generalmente consideradas como débilmente lipolíticas, debe tenerse en cuenta que esta actividad metabólica juega un importante papel en la generación de aromas especiales en alimentos fermentados, sobre todo en diferentes quesos; entre estas bacterias, las pertenecientes al género *Enterococcus* contribuyen significativamente a la hidrólisis de la grasa de leche. En este trabajo de revisión también se señala que diferentes investigadores han informado que los enterococos poseen una marcada actividad lipolítica, generalmente superior a la comprobada para representantes de los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*; asimismo se destaca que en muchos casos esa actividad varía muy significativamente en función del ecosistema del que se han aislado las cepas, siendo incluso muy notable esa variación para distintas variedades queseras, típicas de diferentes regiones del mundo.

Por otra parte, también se observan para las otras bacterias del ácido láctico estudiadas en este trabajo, coincidencias de tipo general con los resultados obtenidos por Carrasco y col., 1995, Accolas y col., 1980, Thomas T., 1985, y Carini S., 1984. Así por ejemplo, estos autores demostraron que la actividad lipolítica es marcadamente más elevada en cepas de *S. thermophilus* que en cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* y de *L. lactis* subsp. *cremoris*, y que esta diferencia se vuelve más notable cuando las determinaciones de esta propiedad se realizan a 42°C. También comprobaron que la capacidad lipolítica detectada en cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* es inferior que la determinada en cepas de *S. thermophilus*, y similar a la correspondiente a cepas de *L. lactis* subsp. *lactis*.

3.3.- Actividad proteolítica:

La actividad proteolítica se evaluó aplicando el ensayo espectrofotométrico con aldehído ftálico (OPA), sobre cultivos de los microorganismos en leche.

Los resultados corresponden a lecturas de DO realizadas a 340 nm contra blanco de reactivo (leche estéril).

Para el cálculo de los resultados se utilizaron las siguientes fórmulas (Church y col., 1983).

$$n' = \Delta A_{340\text{nm}} / \epsilon \cdot M \cdot F$$

Donde:

n': Número de enlaces peptídicos hidrolizados en el tiempo de reacción.

ΔA : Variación de la absorbancia observada experimentalmente a 340nm.

ϵ : Absortividad molar de grupos α y ϵ amino medidos a 340 nm ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

M: Concentración molar de proteínas (mol/ L).

F: Factor de dilución.

Se realizaron los cálculos según un valor promedio de peso molecular (PM) de las caseínas (α_{s1} :23.000 g/mol; β : 25.000 g/mol; κ : 19.000 g/mol).

En función de estos valores, el PM promedio de las caseínas es de 22.000 g/mol.

Según datos del proveedor, la leche descremada en polvo tiene una concentración de 35 gramos de proteína cada 100 gramos de leche deshidratada, y teniendo en cuenta que para el ensayo ésta ha sido reconstituida al 10 % (p/v), resulta que:

$$M = 0,00159 \text{ mol /L.}$$

$$F = 0,005.$$

Además, según Church y col., 1983, el valor de ϵ es:

$$\epsilon = 6000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}.$$

y

$$\% H = n' \cdot 100 / n$$

Donde:

% H: Porcentaje de hidrólisis.

n' : Número de uniones peptídicas hidrolizadas en el tiempo de reacción.

n: Número inicial de uniones peptídicas .

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, y los resultados se expresaron como promedios de los valores individuales obtenidos en cada determinación. Los mismos se detallan en la Tabla N° 16.

Tabla N° 16: Actividad proteolítica, expresada como porcentaje de hidrólisis de péptidos (% H), número de enlaces peptídicos hidrolizados (n'), y valores experimentales de absorbancia, para las cepas de bacterias ácido lácticas desarrolladas previamente en los medios de cultivo seleccionados.

Microorganismo	MRS / M17			Hidrol. Total 2 % (p/v)			Frac. A 4 % (p/v)		
	Abs.	n'	% H	Abs.	n'	% H	Abs.	n'	% H
<i>E. faecium</i> E23	0,630	14,25	7,1	0,153	3,21	1,6	0,156	3,27	1,6
<i>E. faecalis</i> E24	0,660	13,83	6,9	0,182	3,81	1,9	0,103	2,16	1,1
<i>E. faecalis</i> E30	0,890	18,65	9,3	0,088	1,84	0,9	0,109	2,28	1,1
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Sf1-1	0,079	1,65	0,8	0,059	1,24	0,6	0,015	0,31	0,1
<i>S. thermophilus</i> Ch3-4	0,237	4,96	2,5	0,116	2,43	1,2	0,194	4,06	2,0
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Lb92	0,511	10,70	5,4	0,048	1,00	0,5	0,062	1,30	0,6
<i>L. plantarum</i> Lp31	0,268	5,61	2,8	0,197	4,13	2,1	0,013	0,27	0,1

Los resultados obtenidos, detallados en la Tabla N° 16, permiten realizar las siguientes deducciones:

- Para todas las cepas ensayadas, la mayor actividad proteolítica, luego de 24 horas de incubación en leche, se obtuvo cuando fueron previamente propagadas en los medios de referencia (Caldos MRS o M17, Merck).

Para explicar este fenómeno se puede plantear que, al propagar estos microorganismos en lactosuero adicionado con hidrolizados proteicos, los mismos sufren un acostumbamiento a la disposición directa e inmediata de caseínas hidrolizadas a péptidos menores más fácilmente metabolizables, que se traduce en una inhibición parcial (y muy probablemente sólo temporaria) de sus sistemas enzimáticos proteolíticos. Cuando estas bacterias son luego obligadas a desarrollar en leche, deben pasar por un período de adaptación a las nuevas condiciones, período en el cual sus enzimas proteolíticas están aún muy poco activas. Lo más probable es que este período sea breve, y que luego las bacterias alcancen sus niveles normales de actividad proteolítica. Como los presentes ensayos se realizaron cultivando las cepas en leche durante sólo 24 horas, el retorno a su actividad enzimática normal no ha podido ser comprobado en esta experiencia. Por ello resultaría aconsejable continuar con el estudio de esta propiedad.

Estos resultados y la hipótesis planteada a partir ellos son coincidentes con los obtenidos al estudiar la cinética de crecimiento de las BAL, donde se observó que la disponibilidad de péptidos pequeños se tradujo en un mayor crecimiento de la masa microbiana.

-En lo que respecta a la intensidad de la actividad proteolítica en sí misma, independientemente del medio de propagación utilizado previamente, puede

apreciarse que, tal como era dado esperar, las cepas de enterococos fueron las que exhibieron la máxima capacidad para hidrolizar las caseínas de la leche. Al igual que en la determinación de la actividad lipolítica, se destaca especialmente la cepa de *E. faecalis* E30, que exhibió la máxima capacidad hidrolítica de proteínas.

En lo que se refiere a los otros cocos lácticos, *L. lactis* subsp. *lactis* Sf1-1 mostró la menor actividad proteolítica detectada en este trabajo. En cambio, *S. thermophilus* CH3-4 mostró valores intermedios entre los máximos y mínimos detectados, similares a los observados para la cepa de *L. plantarum*.

Entre las dos cepas de lactobacilos, la más destacada resultó ser la de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, para la cual se detectó el valor de actividad proteolítica más próximo al alcanzado por las cepas de enterococos, y considerablemente superior a los determinados para las otras cepas en estudio. En cambio y tal como ya se ha detallado, *L. plantarum* Lp31 mostró valores inferiores, similares a los correspondientes a *S. thermophilus* CH3-4.

Los resultados obtenidos se pueden comparar de modo relativo con los informados por otros investigadores. Así por ejemplo, Carrasco y col., 1989, estudiaron 61 cepas de enterococos y demostraron que, luego de incubarlas en presencia de una solución de caseinato de sodio por períodos comprendidos entre 24 y 48 h, los mayores porcentajes de las mismas presentaron una actividad proteolítica exocelular comprendida entre valores considerados medios y altos. También observaron una actividad considerablemente mayor, a las 24 h, de las cepas de *E. faecalis* en comparación con las de *E. faecium*, diferencia que se volvió mucho más notable al cabo de 48 h de incubación.

Asimismo, en todos los tiempos ensayados las cepas de *E. durans* resultaron sólo débilmente proteolíticas.

Por su parte, Sarantinopoulos y col., 2001, en coincidencia con Foulquié Moreno y col., 2006, Dovat y col. 1970, Arizcun y col., 1997, y Suzzi y col., 2000, informaron que la mayoría de una importante cantidad de cepas de enterococos examinadas luego de ser propagadas en leche descremada, exhibieron sólo una baja actividad proteolítica exocelular. En 55 cepas (el 42,6% del total) no se detectó capacidad hidrolítica de las caseínas de la leche; 52 cepas (40,3%) mostraron una escasa actividad y sólo 22 cepas (17,1%) resultaron poseedoras de una considerable actividad de proteasas. También observaron, en coincidencia parcial con los resultados del presente trabajo, que las cepas más proteolíticas fueron las de *E. faecalis* de origen alimentario, seguidas en orden decreciente de actividad por las de *E. durans* y *E. faecium*.

También Carrasco y col., 1995, estudiaron la actividad proteolítica exocelular de 38 cepas de bacterias ácido lácticas (*L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *L. helveticus*). En su trabajo demostraron que la máxima actividad caseinolítica exocelular, en períodos de incubación de 24 y 48 h, correspondió a las cepas de *Lactobacillus*, seguidas en orden de importancia por las de *Lactococcus*, resultando en cambio muy poco proteolíticas las de *S. thermophilus*. Estos resultados, coincidentes con los de Rajagopal y Sandine, 1990, coinciden también con los de la presente investigación en lo que respecta a la considerable actividad enzimática detectada para las cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, la que resultó superior a la determinada para los lactococos. En cambio, no existe coincidencia en cuanto a la intensidad de la actividad

caseinolítica de los cocos lácticos entre sí, pues mientras en el presente trabajo la cepa de *S. thermophilus* Ch 3-4 resultó netamente superior a la de *L. lactis* subsp. *lactis* Sf1-1, en los trabajos de referencia se comprobó lo contrario. Cabe aclarar que, tratándose de estudios realizados sobre cepas diferentes, no hay razón para esperar que las coincidencias en las comparaciones sean una constante.

Asimismo, Carrasco y col., 2005, en coincidencia con Moon y Reinbold, 1976, observaron que tres cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* propagadas previamente en un medio sintético recomendado para el cultivo de bacterias ácido lácticas (LAPT-L5, lactosa 0,5%), demostraron al cabo de 24 h de cultivo en leche una actividad proteolítica netamente superior (relaciones comprendidas entre 2 a 1 hasta aproximadamente 10 a 1) a la determinada para tres cepas de *S. thermophilus* propagadas en el mismo medio sintético. Puede apreciarse en este caso que, aún tratándose de cepas diferentes, se determinó una relación entre las actividades caseinolíticas detectadas para ambas especies que resulta coincidente con la determinada en el presente trabajo, siempre que se trate de cepas propagadas previamente en medios de cultivo sintéticos especialmente aconsejados para el desarrollo de estos microorganismos.

Por su parte, Carrasco y col., 1991, Egan A., 1983, Soncini y col., 1982, y Miccino J., 1983, observaron que la gran mayoría de numerosas cepas de *L. plantarum* estudiadas mostraron una escasa actividad proteolítica luego de 2 días de incubación a 30°C, si bien el sustrato y la metodología de ensayo empleados fueron muy distintos a los utilizados en el presente trabajo.

3.4.-Producción de sustancias antimicrobianas tipo bacteriocinas:

Se estudiaron sólo 4 de las 7 cepas en ensayo en el presente trabajo, las que fueron seleccionadas en función de los resultados arrojados por estudios previos relativos a su capacidad inhibitoria del crecimiento de otras especies bacterianas (Simonetta y col., 1997, Carrasco y col., 1997, Simonetta y col., 1998, Carrasco y col.,1999, Carrasco y col., 2002, Moragues y col.,2003, Müller y col., 2001, Müller D., 2007).

Las 4 cepas seleccionadas son las que se detallan a continuación:

- *Enterococcus faecium* (E23)
- *Enterococcus faecalis* (E24)
- *Enterococcus faecalis* (E30)
- *Lactobacillus plantarum* (Lp 31).

Se utilizaron como medio de propagación Caldos MRS o M17 (Merck), suero de quesería adicionado con hidrolizado total de caseína al 2% (p/v) y suero adicionado con la fracción A al 4 % (p/v).

Como cepas blanco para detectar la presencia de sustancias antibacterianas en los sobrenadantes libres de células obtenidos de los cultivos de las 4 cepas seleccionadas, se utilizaron las siguientes, todas de origen alimentario y pertenecientes a la colección propia:

- *Bacillus cereus* DBFIQ Bc 28 *Bacillus subtilis* DBFIQ Bs11
- *Escherichia coli* DBFIQ Ec 9 *Pseudomonas* sp. DBFIQ P55

Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla N°17.

Tabla N° 17: Actividad inhibitoria de los sobrenadantes libres de células obtenidos de cultivos de cuatro cepas de bacterias ácido lácticas.

MICROORGANISMO	Medio de cultivo	<i>B. cereus</i> DBFIQ Bc28	<i>B. subtilis</i> DBFIQ Bs11	<i>E. coli</i> DBFIQ Ec 9	<i>Pseudomonas</i> sp. DBFIQ P55
	Diámetro de los halos de inhibición (en mm)				
<i>E. faecium</i> E23	M17	17	20	17	19
	HT 2%	16	16	15	17
	A 4%	9	10	12	14
<i>E. faecalis</i> E24	M17	17	20	16	17
	HT 2%	17	20	17	19
	A 4%	11	16	15	16
<i>E. faecalis</i> E30	M17	18	19	19	19
	HT 2%	9	11	14	15
	A 4%	9	10	12	17
<i>L. plantarum</i> Lp31	MRS	16	19	15	17
	HT 2%	10	12	13	15
	A 4%	10	6	14	12

A partir del análisis de los valores expuestos en la Tabla, se pueden formular las siguientes deducciones:

- Para las cepas de *E. faecium* E23 y *E. faecalis* E24 se obtuvieron resultados comparables utilizando Caldo M17 (Merck) o lactosuero adicionado con el 2% (p/v) de hidrolizado caseínico total, dado que los diámetros de los halos de inhibición detectados resultaron similares. En cambio, al utilizar lactosuero con el agregado del 4% (p/v) de la fracción A para el cultivo de estas dos cepas, los sobrenadantes libres de células obtenidos mostraron una actividad inhibitoria frente a las cepas blanco marcadamente disminuida, excepto en el caso del sobrenadante de cultivo de la cepa E24 frente a *E. coli* y *Pseudomonas* sp.
- Para las otras dos cepas estudiadas (*E. faecalis* E30 y *L. plantarum* Lp31) los resultados fueron diferentes, dado que en ambos casos la capacidad antibacteriana frente a todas las cepas blanco fue superior cuando los sobrenadantes libres de células de ambas cepas bacteriocinogénicas se obtuvieron a partir de cultivos en Caldos M17 o MRS (Merck).

Si bien no se dispone de pruebas experimentales que permitan justificar fehacientemente las diferencias observadas en este ensayo, se puede inferir una probable justificación de las mismas en base a los siguientes hechos: en los trabajos previos ya citados que permitieron seleccionar las 4 cepas utilizadas en el presente ensayo, en los que los sobrenadantes siempre se obtuvieron a partir de medios sintéticos (caldos M17 o MRS), se determinó mediante pruebas enzimáticas que todos los sobrenadantes libres de células estaban compuestos por sustancias de naturaleza proteica o peptídica a las

cuales se podía atribuir la actividad antagonística frente a las bacterias blanco; sin embargo, hasta el presente no se ha llegado a determinar la composición aminoacídica de esas proteínas o péptidos, y menos aún a secuenciarlos. Por lo tanto, es lícito suponer que algunas de las cepas bacteriocinogénicas hayan encontrado disponibles los aminoácidos para sintetizar sus péptidos inhibidores tanto en el medio sintético M17 (Merck) como en el lactosuero adicionado de los hidrolizados caseínicos, mientras que para otras los aminoácidos necesarios sólo se hallaban disponibles (o al menos más fácilmente disponibles o en concentraciones mayores) en los Caldos M17 o MRS (Merck).

Si se comparan los resultados obtenidos en la presente experiencia con los correspondientes a trabajos previos realizados con las mismas cepas bacteriocinogénicas, ya citados al comienzo de este ítem, y en los que dichas cepas fueron siempre propagadas en medios sintéticos, se puede comprobar que los valores, expresados como diámetros (en mm) de los halos de inhibición, son muy similares en todos los casos. Esto permite aseverar que las cepas en estudio han mantenido inalterada su capacidad bacteriocinogénica en el transcurso del tiempo y también en función de los distintos períodos de conservación, y que las diferencias aquí observadas sólo son atribuibles a los medios de propagación empleados.

Por el contrario, resulta muy difícil comparar los presentes resultados con otros obtenidos por el mismo grupo de trabajo o por otros investigadores, si se considera la utilización del lactosuero adicionado de hidrolizados caseínicos como medio de propagación de las bacterias bacteriocinogénicas. Esto es

debido a que prácticamente no se han podido localizar en la bibliografía disponible estudios sobre esta temática.

Es posible, por ejemplo, efectuar una comparación relativa con los resultados obtenidos por Burgos R., 2000, quien llevó a cabo un estudio similar al presente. En dicha investigación la autora realizó una caracterización preliminar de sustancias antibacterianas producidas por una cepa particular de *L. plantarum* propagada en un medio a base de lactosuero, llegando a determinar que en el sobrenadante libre de células de los cultivos de esta cepa estaba presente una sustancia inhibitoria que podía caracterizarse *a priori* como una bacteriocina. En este trabajo de referencia se utilizó como medio de propagación suero de quesería, al que se le adicionaron un 0,25 % (p/v) de peptona y un 0,1 % (p/v) de Tween 80. Se pudo comprobar que tanto la concentración de sustancia inhibitoria producida como las características fisicoquímicas y enzimáticas de la misma eran comparables a las obtenidas cuando el microorganismo se propagaba en Caldo MRS (Merck). Por lo tanto, los resultados logrados en ese estudio no concuerdan con los del presente trabajo, donde la cepa de *L. plantarum* Lp31 mostró una capacidad considerablemente mayor de producir sustancias antibacterianas cuando se la propagó en Caldo MRS (Merck). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que esta comparación tiene sólo un valor relativo, dado que las cepas de *L. plantarum* utilizadas en ambos estudios son distintas, como así también lo es la naturaleza de los hidrolizados proteicos agregados al lactosuero en cada uno de los casos.

3.5.- Capacidad de crecimiento en leche:

Esta determinación se realizó con las siete cepas de bacterias del ácido láctico en estudio.

Se utilizaron como medios de propagación Caldos MRS o M17 (Merck), y lactosuero adicionado con hidrolizado total de caseína al 2% (p/v) y con fracción A al 4 % (p/v).

Luego de esta etapa de propagación, se cosecharon las células, se estandarizaron las suspensiones celulares y se estudió su capacidad de crecimiento en leche evaluando el grado de turbidez alcanzado (medido como D.O. a 480 nm), el cual es representativo de la concentración celular.

Los resultados obtenidos se observan en la Tabla N°18.

Tabla N°18: Capacidad de crecimiento en leche, expresada como valores de D.O. determinados a 480 nm, según la técnica de Kanasaki (1975), modificada por Thomas y Turner (1977).

MICROORGANISMO	MRS/ M17	HT 2%	FRAC. A 4%
<i>E. faecium</i> E23	0,430	0,309	0,422
<i>E. faecalis</i> E24	0,412	0,506	0,393
<i>E. faecalis</i> E30	0,346	0,377	0,403
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Sf 1-1	0,534	0,504	0,365
<i>S. thermophilus</i> Ch3-4	0,258	0,176	0,191
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> Lb92	0,514	0,735	0,273
<i>L. plantarum</i> Lp31	0,575	0,390	0,470

A partir del análisis de los resultados expuestos en la Tabla se pueden realizar las siguientes observaciones:

- Para las tres cepas de enterococos se evidenció una buena capacidad de desarrollo en leche cuando las mismas fueron previamente propagadas en lactosuero con el agregado de hidrolizados caseínicos, pero con diferencias específicas entre cepa y cepa. *E. faecium* E23 y *E. faecalis* E30 mostraron valores de concentración celular en leche comparable y francamente superior, respectivamente, a la lograda con el medio de referencia M17 (Merck), cuando la propagación previa se realizó en lactosuero con un 4% (p/v) de la fracción A; como diferencia entre estas dos cepas se aprecia que, para la última, la propagación en lactosuero con el 2% (p/v) de hidrolizado caseínico total resultó algo más ventajosa que la realizada en el medio sintético, mientras que para la primera el Caldo M17 (Merck) fue netamente superior que el suero de leche con agregado de hidrolizado total. Por su parte, la cepa E24 de *E. faecalis* se diferenció de las anteriores dado que para ella resultó decididamente más favorable, para obtener los mayores valores de concentración celular en leche, la propagación previa en suero con el 2% (p/v) de hidrolizado caseínico total.
- Para las otras dos cepas de lactococos se observó coincidencia en cuanto a que las mayores concentraciones celulares en leche se obtuvieron cuando la propagación previa se realizó en el medio sintético. Las diferencias entre ellas se consistieron en que, para *L. lactis* subsp. *lactis* Sf1-1, el segundo lugar de conveniencia (y bastante próximo al Caldo M17) lo ocupó el suero con agregado de hidrolizado caseínico

total, estando muy alejado el suero adicionado con la fracción A en cambio, para *S. thermophilus* Ch3-4 ese segundo lugar de conveniencia correspondió al lactosuero con la fracción A, siendo éste relativamente próximo al tercer lugar ocupado por el suero con hidrolizado total.

- Para las dos cepas de lactobacilos estudiadas también se observaron diferencias notables. Para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se comprobó una tendencia general similar a la de *E. faecalis* E24, con una diferencia muy importante en concentraciones celulares en leche a favor de la propagación previa en lactosuero con el agregado del hidrolizado total, seguida en segundo lugar y con valores muy alejados por el cultivo previo en Caldo MRS (Merck). En cambio, *L. plantarum* Lp 31 mostró una tendencia general similar a la observada para *E. faecium* E23 y para *S. thermophilus* Ch3-4, con una amplia ventaja a favor del uso de Caldo MRS en la propagación previa, seguida en segundo lugar de conveniencia por el lactosuero con el agregado de la fracción A.

En modo concordante con lo anteriormente dicho en lo que respecta a la capacidad de producción de bacteriocinas, si bien tampoco en este caso se dispone de pruebas experimentales que permitan justificar fehacientemente las diferencias observadas en el ensayo, se puede inferir una probable justificación de las mismas en base a los siguientes hechos: de las siete cepas ensayadas sólo una, la de *L. plantarum* Lp31, mostró una diferencia notablemente superior en lo que respecta a la concentración celular alcanzada en leche cuando la propagación previa se realizó en Caldo MRS (Merck); en los seis casos restantes las concentraciones celulares alcanzadas en leche resultaron

superiores, o al menos sin diferencias demasiado importantes, a las logradas con la propagación previa en los medios sintéticos de referencia, cuando dicha propagación previa se realizó en lactosuero con el agregado de algún hidrolizado caseínico; en este punto debe destacarse que, en general, las cepas de *L. plantarum* no encuentran en la leche su medio óptimo de crecimiento, mientras que las seis cepas restantes pertenecen a especies o subespecies de bacterias ácido lácticas que sí encuentran en la leche un medio muy apropiado para su desarrollo. También se debe tener en cuenta que en el presente ensayo se realizó una estandarización de las suspensiones celulares que fueron inoculadas en la leche, por lo que las diferencias en las densidades de población observadas al final de la experiencia no pueden atribuirse a diferencias existentes en las concentraciones celulares iniciales con que se inoculó la leche, sino sólo a diferencias en los estados fisiológicos y en las capacidades bioquímicas de cada cepa según cual haya sido el medio de propagación utilizado previamente. En este sentido se puede especular con los procesos de adaptación que deben superar los microorganismos en general cuando se cambia el medio de desarrollo; siendo el lactosuero adicionado con los hidrolizados caseínicos un medio de cultivo más similar a la leche que los medios sintéticos, los fenómenos de adaptación no incidirán demasiado sobre el desarrollo bacteriano al pasar de suero a leche, y de este modo se obtendrán concentraciones celulares mayores o al menos comparables con las que se logran cuando la propagación previa se realiza en un medio sintético especialmente formulado para el cultivo de estas bacterias.

De todos modos y cualesquiera sean las causas que puedan justificar los valores obtenidos, lo que resulta absolutamente claro del análisis de los

mismos es que el desarrollo previo en lactosuero con agregado de hidrolizados caseínicos de la gran mayoría de las bacterias ácido lácticas ensayadas, se traduce en una posterior capacidad de crecimiento en leche superior, o al menos comparable, a la que se logra aplicando una propagación previa en los medios sintéticos comerciales utilizados como referencia.

También en forma concordante con lo expresado en el ítem inmediato anterior, resulta imposible comparar los presentes resultados con otros obtenidos por el mismo grupo de trabajo o por otros investigadores, lo que se debe a que no se han podido localizar en la bibliografía disponible consultada estudios comparativos de la capacidad de crecimiento en leche para bacterias ácido lácticas luego de su propagación previa en lactosuero con el agregado de hidrolizados caseínicos y en medios sintéticos comerciales.

CONCLUSIONES

En primer lugar y teniendo en cuenta la finalidad central de la ejecución de la presente investigación, se puede afirmar que se llevó a cabo el trabajo experimental que permitió dar cumplimiento a los objetivos oportunamente planteados para el desarrollo de esta Tesis:

- Obtener y purificar distintas fracciones peptídicas a partir de un hidrolizado de caseína comercial.
- Determinar el efecto provocado por los hidrolizados caseínicos total y fraccionado sobre la cinética de crecimiento de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*) de colección propia, obtenidas de alimentos fermentados, fermentos comerciales y artesanales y materias primas alimentarias de la región, cuando las mismas desarrollan en medios de cultivo económicos, como los formulados en base a suero de quesería.
- Investigar la influencia del agregado al medio de propagación de los hidrolizados caseínicos totales y fraccionados, sobre el estado fisiológico de las bacterias, mediante la determinación comparativa de propiedades tecnológicas de relevante interés, como lo son las actividades acidificante, proteolítica y lipolítica y la producción de inhibidores tipo bacteriocinas.
- Determinar la capacidad de crecimiento en leche de las células de las distintas especies de bacterias ácido lácticas propagadas previamente en los medios con agregado de los hidrolizados caseínicos.

Por otra parte, mediante la concreción de los objetivos planteados también se ha realizado un aporte que puede contribuir, brindando soluciones novedosas, a intentar resolver un antiguo doble problema de la industria láctea y de las industrias dedicadas a la producción de fermentos o cultivos starters para distintas aplicaciones alimentarias: - el uso de medios de cultivo de elevado costo, generalmente importados, para la propagación industrial de las cepas seleccionadas de BAL; - la disposición final del suero de quesería, un desecho de la industria láctea cuya eliminación genera importantes problemas de contaminación del medio ambiente.

En efecto, se ha podido demostrar que utilizando lactosuero con el agregado de hidrolizados caseínicos en la concentración adecuada, se obtienen mejores cinéticas de crecimiento de las cepas de BAL que cuando se emplean medios comerciales. Al mismo tiempo se ha logrado una mejor expresión de algunas de sus actividades enzimáticas que determinan propiedades tecnológicas claves de estos microorganismos para su empleo en producciones alimentarias, especialmente en la elaboración de alimentos lácteos y cárnicos fermentados.

Esta conclusión general se fundamenta en las conclusiones parciales obtenidas a lo largo del desarrollo de la investigación, que ha continuación se detallan:

- Partiendo de un hidrolizado triptico comercial de caseína (Sigma), se procedió a su fraccionamiento, obteniéndose cuatro fracciones diferenciadas. Se eligió una de ellas, la denominada Fracción A (que en un trabajo previo demostró su actividad estimuladora del crecimiento de

una línea celular de insectos), que al ser analizada demostró estar integrada por al menos tres péptidos de muy bajo peso molecular, dos de ellos procedentes de la β A2 caseína, y el tercero procedente de la

➤ k-caseína. Dichos péptidos presentaron la siguiente composición:

- Región 89-95 de la β A2 caseína: **IPPLTQT**
- Región 160-169 de la β A2 caseína: **HQPHQPLPPT**
- Región 177-183 de la kappa-caseína: **PPEINTV**

Dado que uno de los principales componentes de esta fracción es el péptido **HQPHQPLPPT** procedente de la β A2 caseína, cuya actividad promotora sobre el crecimiento de células de insecto fue previamente demostrada, se concluyó que esta fracción péptidica debía ser ensayada, así como el hidrolizado caseínico total, porque ambas podrían llegar a presentar el mismo efecto sobre cepas de BAL de interés alimentario.

➤ Realizados los estudios de cinética de crecimiento de las siete cepas de BAL seleccionadas en los cinco medios de desarrollo propuestos, y en función de los resultados logrados, se puede asegurar que el medio más adecuado para seis de las siete cepas ensayadas ha resultado ser el lactosuero con la adición de hidrolizado caseínico total. La excepción la constituye la cepa de *L. lactis* subsp. *lactis* Sf1-1, para la que se ha comprobado que la máxima concentración celular se consigue en lactosuero adicionado con la fracción A al 4% (p/v). Sin embargo, para esta cepa también se ha determinado que el lactosuero con agregado

de hidrolizado caseínico total permite alcanzar una población cuantitativamente semejante y en menor tiempo de cultivo.

También se aprecia que, para la cepa de *E. faecium* E23, la de *S. thermophilus* Ch3-4 y las dos de *Lactobacillus*, el medio que ocupa el segundo lugar en cuanto a conveniencia es el lactosuero con adición de la fracción A al 4% (p/v).

Por lo tanto, se puede concluir que la estrategia más recomendable a aplicar para conseguir elevadas poblaciones celulares, superiores a las logradas con los medios comerciales de referencia, para las cepas de bacterias del ácido láctico, es el empleo de lactosuero con adición de hidrolizado caseínico total al 2 % (p/v), seguida por la utilización de lactosuero con agregado de la fracción A, y que la concentración más adecuada de ésta es al 4% (p/v).

- En lo que respecta a una de las propiedades tecnológicas de mayor interés de las BAL empleadas en la obtención de alimentos fermentados, su actividad acidificante, puede concluirse que los hidrolizados caseínicos agregados al lactosuero han producido una estimulación de esta actividad enzimática.

En todos los casos se observó un mayor aumento de la acidez en función del tiempo cuando el medio utilizado para la propagación previa ha sido suero de quesería con fracción caseínica A al 4 % (p/v), detectándose en este caso los valores más altos de acidez total luego de 48 h y/o 5 días de incubación. Debe también destacarse que los valores correspondientes de acidez son similares a los encontrados cuando las cepas fueron previamente propagadas en lactosuero con el agregado de un 2 % (p/v) de

hidrolizado caseínico total, aunque éstos resultaron algo inferiores cuando se los determinó luego de 5 días de incubación, excepto para dos cepas, para las cuales la adición del hidrolizado total permitió superar levemente la acidez alcanzada con respecto a la observada con el agregado de la fracción A.

- A partir de los resultados obtenidos al estudiar la actividad lipolítica de las BAL se concluye que, para la mayoría de las cepas, los valores indicadores de un mayor grado de lipólisis se obtienen cuando las mismas son previamente propagadas en el medio formulado en base a suero de quesería con la adición de la fracción A al 4% (p/v). También puede apreciarse que en todos los casos el uso en la propagación previa en lactosuero con el agregado del hidrolizado caseínico total al 2% (p/v), se tradujo en un grado de actividad de los respectivos sistemas lipolíticos mayor que el determinado cuando la propagación de las cepas se efectuó en el medio comercial de referencia normalmente aconsejado para cada una de ellas (Caldos M17 o MRS, Merck).

Estas observaciones permiten afirmar que la presencia de hidrolizados caseínicos en el medio utilizado para la propagación de cepas de bacterias ácido lácticas ejerce un efecto estimulador de las enzimas responsables de su capacidad lipolítica.

- En lo referente a la actividad proteolítica, resulta claro de los estudios realizados que el desarrollo de bacterias ácido lácticas en lactosuero con agregado de hidrolizados caseínicos no produce ningún estímulo

favorable sobre sus sistemas enzimáticos proteolíticos (al menos en el período de 24 horas en el que se incubó en leche para determinar la capacidad de proteólisis sobre las caseínas).

Los resultados obtenidos demuestran que, para todas las cepas ensayadas, la mayor actividad proteolítica se obtuvo cuando fueron previamente propagadas en los medios comerciales de referencia indicados como más adecuados para cada una de ellas (Caldos MRS o M17, Merck).

Una explicación de estos resultados se puede encontrar en el hecho de que, al propagar las BAL en lactosuero adicionado con hidrolizados proteicos, las mismas sufren un acostumbamiento a la disposición directa e inmediata de caseínas hidrolizadas a péptidos menores más fácilmente metabolizables, que se traduce en una inhibición parcial (y probablemente sólo temporaria) de sus sistemas enzimáticos caseinolíticos. Cuando estas bacterias son luego obligadas a desarrollar en leche, deben pasar por un período de adaptación a las nuevas condiciones, período en el cual sus enzimas proteolíticas están aún poco activas. Lo más probable es que este período de adaptación a las nuevas condiciones de desarrollo sea breve, y que luego las bacterias alcancen nuevamente sus niveles normales de actividad proteolítica.

Por otra parte estos resultados coinciden con los obtenidos al estudiar la cinética de crecimiento de estos microorganismos, dado que la presencia en los medios de desarrollo del hidrolizado caseínico total o de la fracción A estarían aportando los péptidos cortos fácilmente metabolizables que favorecen el crecimiento y multiplicación de las BAL.

- Los resultados obtenidos del estudio de la capacidad bacteriocinogénica de cuatro cepas de BAL en las que previamente se había confirmado esta propiedad, permiten formular conclusiones que no son generales sino dependientes de cada cepa en particular.

Así, para dos de las cepas de *Enterococcus* se obtuvieron resultados comparables utilizando Caldo M17 (Merck) o lactosuero adicionado con el 2% (p/v) de hidrolizado caseínico total; al utilizar lactosuero con el agregado del 4% (p/v) de la fracción A para el cultivo de estas dos cepas, los sobrenadantes libres de células obtenidos mostraron una actividad inhibitoria en general marcadamente disminuida.

En cambio, para las otras dos cepas estudiadas (una de *Enterococcus* y una de *L. plantarum*), la capacidad antibacteriana frente a todas las bacterias blanco fue superior cuando los sobrenadantes libres de células de ambas cepas bacteriocinogénicas se obtuvieron a partir de cultivos en los medios comerciales (Caldos M17 o MRS, Merck).

Por lo tanto, se puede concluir que la conveniencia o no de la presencia de hidrolizados caseínicos en el medio de propagación para que las BAL expresen su capacidad de producción de bacteriocinas dependerá de cada cepa en particular. Es lícito suponer que esto se debe a que algunas de las cepas bacteriocinogénicas encuentran disponibles los aminoácidos para sintetizar sus péptidos inhibidores tanto en los medios sintéticos comerciales como en el lactosuero adicionado de los hidrolizados caseínicos, mientras que para otras los aminoácidos necesarios sólo se hallan disponibles (o al menos más fácilmente disponibles o en concentraciones mayores) en los primeros.

- En lo que respecta a la capacidad de desarrollo en leche por parte de las cepas de BAL previamente propagadas en lactosuero con hidrolizados caseínicos y en medios sintéticos comerciales, del análisis de los valores experimentales obtenidos resulta claro que el desarrollo previo en lactosuero con agregado de hidrolizados caseínicos de la gran mayoría de las bacterias ácido lácticas ensayadas, se traduce en una posterior capacidad de crecimiento en leche superior, o al menos comparable, a la que se logra aplicando una propagación previa en los medios sintéticos comerciales utilizados como referencia. Sólo la cepa de *L. plantarum* Lp 31 mostró una diferencia notable cuando la propagación previa se realizó en Caldo MRS (Merck); a este respecto debe recordarse que, en general, las cepas de *L. plantarum* no encuentran en la leche su medio óptimo de crecimiento, mientras que las seis cepas restantes pertenecen a especies o subespecies de BAL que sí encuentran en la leche un medio muy apropiado para su desarrollo. En este sentido se puede especular con los procesos de adaptación que deben superar los microorganismos en general cuando se cambia el medio de desarrollo; los resultados obtenidos para la mayoría de las cepas estudiadas pueden explicarse teniendo en cuenta que, siendo el lactosuero adicionado con los hidrolizados caseínicos un medio de cultivo más parecido a la leche que los medios sintéticos, los fenómenos de adaptación no incidirán demasiado sobre el desarrollo bacteriano al pasar de suero a leche, y de este modo se obtendrán concentraciones celulares generalmente mayores que las que se logran cuando la propagación previa se realiza en un medio sintético.

Fundamentada así la conclusión general alcanzada en base a las conclusiones parciales que se pueden formular para cada etapa de la investigación realizada, sólo resta hacer hincapié en la importancia práctica potencial que tiene la misma para las industrias productoras de alimentos fermentados y para las asociadas a ellas.

Cabe aquí reiterar que el suero de quesería es considerado como un producto de desecho de la industria láctea, cuya eliminación genera problemas ambientales por su alta demanda química y biológica de oxígeno (DQO y DBO). Como solución racional a este problema, en la actualidad muchas industrias proceden a secar el lactosuero para destinarlo a la alimentación animal o a ser usado como aditivo en ciertos alimentos.

Por otra parte, el elevado costo y la necesidad de importación de los medios de cultivo comerciales utilizados para la propagación de cepas seleccionadas de BAL, constituyen otro problema económico que deben afrontar las industrias alimentarias que las utilizan en sus procesos productivos.

Por lo tanto, el diseño de medios de cultivo de bajo costo a partir de un subproducto lácteo adicionado con hidrolizados caseínicos, que han demostrado ser tanto o más adecuados en muchos aspectos que los medios comerciales, es una alternativa tecnológica interesante. Ésta podrá satisfacer en parte las necesidades de las industrias que elaboran y comercializan fermentos y de aquellas que los utilizan, sobre todo cuando éstas últimas deben realizar una propagación *in situ* de las BAL en forma previa a su uso como agentes de maduración alimentaria.

De este modo, la utilización de lactosuero y de hidrolizados caseínicos para formular medios económicos para la propagación industrial de BAL, plantea un uso tecnológico novedoso de estos elementos y ofrece a los sectores industriales involucrados una alternativa más económica al empleo de medios de propagación de elevado costo y de imprescindible importación.

Por otra parte, se ha tratado también de lograr la aplicación de un concepto micro-ecológico que permita considerar a cada cultivo microbiano como un verdadero ecosistema donde la vida de las poblaciones está regida por una gran complejidad de fenómenos, aún insuficientemente estudiados y cuyo impacto es de difícil apreciación. La real aplicación de este concepto será sin dudas benéfica, no sólo para resolver mejor ciertos problemas prácticos, sino también para comprender más lógicamente sus orígenes.

Por último, si bien puede aducirse que los hidrolizados caseínicos empleados en la presente investigación también son importados y de elevado costo, debe tenerse en cuenta que ésta ha sido una primera experiencia para determinar su influencia en la propagación de BAL, partiendo del conocimiento previo de su actividad promotora del crecimiento de líneas celulares de insectos. Al haber determinado con datos experimentales la conveniencia de su utilización y sabiendo que estos productos se obtienen mediante hidrólisis trípica (tripsina, quimotripsina, etc.) de la caseína de leche bovina, queda abierta la posibilidad para la ejecución de nuevos trabajos de investigación experimental. Los mismos deberán centrarse en el estudio de las condiciones óptimas de obtención de estos hidrolizados y en su adecuado fraccionamiento para su utilización como aditivos capaces de transformar al lactosuero en un medio de cultivo muy adecuado para la propagación de cepas de BAL. De este modo se

logrará una reducción de costos aún más significativa y una menor dependencia de productos de importación.

APENDICE

MEDIOS DE CULTIVO

Caldo M17

Composición(g/L):

Digerido pancreático de caseína	5,0
Peptona de soja	5,0
Extracto de res	5,0
Extracto de levadura	2,5
Ácido ascórbico	0,5
Sulfato de Magnesio	0,25
β-glicerofosfato disódico	19,0
pH final:	6.9 ± 0.2

Preparación:

Suspender 37,25 g de polvo en 950 mL de agua destilada. La esterilización se efectúa en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar a 50 °C. Agregar 50 mL de una solución estéril de lactosa al 10 % p/v y mezclar bien.

Para preparar el correspondiente medio sólido, se adiciona la cantidad necesaria de agar bacteriológico de modo de obtener una concentración del 1,2 % p/v.

Caldo MRS

Composición (g/L):

Peptona de proteasa N° 3	10
Extracto de res	10
Extracto de levadura	5
Dextrosa	20
Polisorbato 80 (Tween 80)	1
Citrato de amonio	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0,1
Sulfato de manganeso	0,05
Fosfato dipotásico	2
pH final:	6.5 ± 0.2

Preparación:

Suspender 55 g de polvo en 1000 mL de agua destilada y mezclar bien. Calentar hasta hervor agitando fuertemente de modo de disolver completamente el polvo. Para preparar el correspondiente medio sólido se adiciona la cantidad necesaria de agar bacteriológico, de modo de obtener una concentración del 1,2 % p/v. La esterilización se efectúa en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Agar LAPT_{L5}

Composición (g/L):

Peptona de carne	15
Peptona de caseína	10
Extracto de levadura	10
Polisorbato 80 (Tween 80)	1
Lactosa	5
pH final:	6.5 ± 0.2

Preparación:

Suspender los componentes en 1000 mL de agua destilada y mezclar bien. Calentar hasta disolución total agitando fuertemente. Para preparar el correspondiente medio sólido se adiciona la cantidad necesaria de agar bacteriológico, de modo de obtener una concentración del 1,2 % p/v. La esterilización se efectúa en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

BIBLIOGRAFIA

Accolas J. P. and Spillman H. Morphology of bacteriophages of *Lactobacillus bulgaricus*, *L. lactis* and *L. helveticus*. J. Appl. Bacteriol., **47**: 309-320, 1979.

Accolas J. P., Bloquel R., Didiene R. and Regnier J. Acid producing properties of thermophilic lactic bacteria in relation to yoghurt manufacture. Lait, **57**: 1-24, 1977.

Alais Ch. Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. 4ta. Ed., 103-108, 266-271, 359-404, 617-762, .Ed. Reverté S.A. (Barcelona, España) 1985.

Ammor M. S. And Mayo B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. Meat Science, **76**: 138-146, 2007.

Andrews A. T. The formation and structure of some proteose-peptone components. J. Dairy Res., **46**: 215-218, 1979.

Antila P., Paakkari I., Jarvinen A., Mattila M. J., Laukkanan M., Pihlanto-Leppala A., Mantsala P. and Hellman J. Opioid peptides derived from in vitro proteolysis of bovine whey proteins. Int. Dairy J., **1**: 215-229, 1991.

Arizcun C., Barcina Y., Torre P. Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. *Int. J- Food Microbiol.*, **38**: 17-24, 1997.

Auclair J.E. and Portman A. Influence du chauffage du lait sur le développement des bactéries. Effet stimulant du lait autoclave sur la croissance de *Lactobacillus lactis*. *Lait*, **39**: 496, 1959.

Aymerich M. T. y Hugas M. Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos. *Eurocarne*, **72**: 39-49, 1998.

Battistotti B., Bottazzi V. Il ruolo terapeutico e nutrizionale dei lattobacilli: distribuzione e significato di enterococchi e pediococchi nei formaggi. Seminario Internazionale Il ruolo terapeutico e nutrizionale dei Lattobacilli. 3-14, Roma, 1974.

Bautista E. S., Dahuya R.S., and Speck M.L. Identification of compounds causing symbiotic growth of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* in milk. *J. Dairy Res.*, **33**:299, 1966.

Bicknell R. S. Endogenous opioid peptides and hypothalamic neuroendocrine neurons. *Scand. Endocrinology*, **107**: 43-54, 1985.

Blom H., Katla T., Hagen B. F. and Axelsson L. A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. *Int. J. Food Microbiol.*, **38**: 103-109, 1997.

Brignon G., Ribadeau-Dumas B., Mercier J. C. and Pelissier J.P., Complete amino acid sequence bovine α_{s2} casein. *FEBS Lett.*, **76**: 274-279, 1977.

Burgos R. Caracterización de sustancias antibacterianas obtenidas de una cepa de *Lactobacillus plantarum* cultivada en un medio formulado a base de lactosuero. Trabajo Final de la Carrera de Licenciatura en Química, Fac. Ing. Qca., Univ. Nac. del Litoral, 2000 – No publicado.

Carini S. Comunicación personal, 1984.

Carrasco de Mendoza M., Scarinci H., Garat M., Simonetta A. Technological properties of enterococci in lactic starters: acidifying and lipolytic activities. *Microbiol. Alim. Nutr.*, **10**: 289-293., 1992.

Carrasco M., García C., Scarinci H., Simonetta A. Caracterización de inhibidores bacterianos tipo bacteriocinas producidos por cepas de *Lactobacillus plantarum*., *Microbiol. Alim. Nutr.*, **17**: 49-57, 1999.

Carrasco M., Scarinci H., Simonetta A. Associative growth of lactic acid bacteria for cheese starters: acidifying and proteolytic activities and redox potencial development. J. Food. Agr. Environ., **3**: 116-119, 2005.

Carrasco M., Scarinci H., Simonetta A. Inhibitory spectrum of bacteriocin-like substances produced by *Lactobacillus plantarum* strains. Microbiol. Alim. Nutr., **15**: 299-305, 1997.

Carrasco M., Scarinci H., Simonetta A. Techonological properties of strains of lactic acid bacteria for cheese starter: proteolytic an lipolytic activities. Microbiol. Alim. Nutr., **13**: 249-254, 1995.

Carrasco M., Scarinci H., Simonetta A. Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Argentinian dairy products. Aust. J. Dairy Technol., **57**: 15-19, 2002.

Carrasco M., Scarinci H., Umansky G., Simonetta A. Technological properties of *Lactobacillus plantarum* and *Micrococcus* sp. strains in dry sausage ripening. Microbiol. Alim. Nutr., **9**: 223-228, 1991.

Cheftel. J.C., Cuq J.L. and Lorient D. Proteínas Alimentarias. Bioquímica. Propiedades funcionales. Valor nutritivo. Modificaciones químicas. Ed. ACRIBIA., 179-194, 1989.

Church F., Swaisgood H., Porter D. and Catignani G. Spectrophotometric assay using o-Phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.*, **66**: 1219-1227, 1983.

Claus J. D., Comini M. A., Perín J. C., Salvetti J. L., Tonarelli G., Frank R. Casein Peptide Fragments with Growth- Influencing Activity on Cell Cultures. PCT / DE01/03849, 2003.

Comini M. Growth modifying activity of casein peptides in insect cell cultures. Comunicación personal. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. UNL. Santa Fe, Argentina, 1999.

Coste M., Rochet V., Léonil J., Mollé D., Bouhallab S., Tomé D. Identification of C-terminal peptides of bovine beta-casein that enhance proliferation of rat lymphocytes. *Immunol. Lett.*, **33**: 41-46, 1992.

Creamer L. K., Richardson T. and Parry D. A. D. Secondary structure of bovine α 1 and β -casein in solution. *Arch. Biochem. Biophys.*, 261-689, 1981.

Cross K. J., Huq N. L., Palamara J. E., Perich J. W. and Reynolds E. C. Physicochemical characterization of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate nanocomplexes. *J. Biol. Chem.*, **280**:15362-15369, 2005.

Daniel H., Vohwinkel M. and Rehner G. Effect of casein and β -casomorphin on gastrointestinal motility in rats. *J.Nutr.*, **120**: 252-257, 1990.

De Klerk H. C. and Hugo N. Phage-like structures from *Lactobacillus acidophilus*. *J. Gen. Virol.*, **8**: 231-235, 1970.

Deeth H., Fitz Gerald C. Lipolysis. *Aust. J. Dairy Technol.*, **30**: 109-111, 1975.

Delgado A., Brito D., Peres C., Noé-Arroyo F., and Garrido-Fernández A. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and ClNa concentration. *Food Microbiol.*, **22**: 512-528, 2005.

De Lima E. T. and Andreatti Filho R. L. Bacteriocins: nomenclature, detection, mechanism of action and potential use in poultry production. *J. Food. Agr. Environ.* Vol 3, **2**: 62-66, 2005.

Desmazeaud, M. Las Tendencias Lácticas de la Investigación sobre Cultivos Lácticos en Europa. *Rev. Arg. Lactol.*, **19**: 46-65, 2000.

Driessen F.M., Kingma F. and Stadhouders J. Evidence that *L. bulgaricus* in yoghurt is stimulated by carbon dioxide produced by *S. thermophilus*. *Neth. Milk Dairy J.*, **36**: 135-137, 1982.

Dovat A., Reinbold G., Hammond E., Vedamuthu E. Lipolytic and proteolytic activity of enterococci and lactic acid group streptococci isolated from young Cheddar cheese. J. Milk Food Technol, **33**: 365-372, 1970.

Egan A.F. Lactic acid bacteria of meat and meat products. Antonie van Leeuwenhoek. Int. J. Gen. Molec. Microbiol., **49**: 327-336, 1983.

El Soda M., Bergere J. L. and Desmazeaud M. J. Detection and localization of peptide hydrolases in *Lactobacillus casei*. J. Dairy Res., **45**: 519-527, 1978.

Farrell H. M. Jr., Wickham E. D., Unruh J. J., Qi P. X. And Hoagland P. D. Secondary structural studies of bovine caseins: temperature dependence of β -casein structure as analyzed by circular dichroism and FTIR spectroscopy and correlation with micellization. Food Hydrocolloids, 15: 341- 354, 2001.

Fiat A. M., Migliore-Samour D., Jolles P., Drouet I., Bal Dit Soitier C. and Caen J. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. J. Dairy Sci., **76**: 301-310, 1993.

Foulquié Moreno M., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. Int. J. Food Microbiol., **106**: 1 - 24, 2006.

Fox P. F., Rehman S and Mc. Sweeney P. L. Protocol for the manufacture of miniature cheese. Protocol of fabrication of mini- fromages. *Le lait*, **78**: 607-620, 1998.

Galesloot T. E., Hassing F. and Verenga H.A. Symbiosis in yoghurt. Stimulation of *L. bulgaricus* a factor produced by *S. thermophilus*. *Neth. Milk Dairy J.*, **22**: 50-62, 1968.

Gasser F. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull. Inst. Pasteur*, **92**: 45-67, 1994.

Gilliland S. Bacterial starter cultures for foods. Ed. CRC pres.: 42-52., 2000.

Ginger M. and Grigor M. Comparative aspects of milk caseins. *Comp. Biochem. Physiol.*, **B 124**: 133-145, 1999.

Gobbetti M., Ferranti P., Smacchi E., Goffredi F. and Addeo F. Production of angiotensin-I-Converting-enzyme- inhibitory peptides in fermented milk started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. *Appl. Environ. Microbiol.*, 3894- 3904, 2000.

Groves M. L., Gordon W. G., Kalan E. B. and Jones S. B. TS -A₂, TS-B, R y S caseins; their isolation composition and relation ship to the β and γ casein polymorphs A₂ and B. *J. Dairy Sci.*, **56**: 558-568, 1973.

Guinane C. M., Cotter P.D., Hill C. and Ross R. P. Microbial solutions to microbial problems: lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J Appl. Microbiol.*, **98**: 1316-1325, 2005.

Hoagland P. D., Unruh J. J., Wickham E. D. and Farrell H. M. Jr. Secondary structure of bovine α 2-casein: Theoretical and experimental approaches. *J. Dairy Sci.*, **84**: 1944-1949, 2001.

Horne D. Casein structure, self-assembly and gelation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **7**: 456-461, 2002.

Jelen P. and Lutz S. Functional milk and dairy products. In *Funcional Foods: Biochemical and Processing Aspects*. (FG Mazza, editor). Lancaster: Technomic Publ. Co., Inc.; 357-380, 1998.

Jolles P. Comparative structural features between the blood and milk clotting process. In: *L'évolution des protéines*. G. Hervé, ed. *Collect. Biol. Evolut.*, Masson, Paris, **8** :137-146, 1983.

Kalchayanand N., Hanlin M. B. and Ray B. Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. *Lett. Appl. Microbiol.*, **15**: 239-243, 1992.

Kalchayanand N., Sikes A., Dunne C. P. and Ray B. Interaction of hydrostatic pressure, time, and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. J. Food Prot., **61**: 425-431, 1998.

Kanasaki M., Breheny S., Hillier A. and Jago G. Effect of temperature on the growth and acid production of lactic acid bacteria. Aust. J. Dairy Technol., 142-144, 1975.

Kang J. H. and Lee M. S. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. J Appl. Microbiol., **98**: 1169-1176, 2005.

.

Kitts D.D. and Yuan Y. V. Caseinophosphopeptides and calcium bioavailability. Food Sci. Technol., **3**: 31, 1992.

Klaenhammer, T.R. Bacteriocins of acid lactic bacteria. Biochem. J., **70**: 337-349, 1988.

Koninsky J. Colicins and other bactericins with established modes of action. Rev. Microbiol., **36**: 125-144, 1982.

Kumosinski T. F., Brown E. M. And Farrell M. Jr. Three- Dimensional molecular modelling of bovine caseins: α_{s1} -casein. Departament of Agriculture Eastern Regional Research Service(600 East Mermald Lane. Philadeelphia, PA 19118).

Lash B., Mysliwiec T. and Gourama H. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (Atcc 8014) Food Microbiol., **22**: 199 - 204, 2005.

Laukova A., Marekova M., Javorsky P. Detection and antimicrobial spectrum of a bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM 4231. Lett. Appl. Microbiol., **16**: 257-260, 1993.

Leroy F., Verluiten J. And De Vuyst L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation Food Microbiol., **106**: 270 - 285, 2006.

Loucheux-Lefevre M. H., Aubert J.P. et Jolles P. Prediction of the conformation of the cow and sheep κ -caseins. Biophys. J., **23**: 323-336, 1978.

Malik R. K.,Kumar N., Nageswara Rao K.and Mathur D. K. Bactriocins – antibacterial proteins of lactic acid bacteria: a review. Microbiol. Alim. Nutr., **12**: 117-132, 1994.

Marshall R. T. (Ed.) Standart Methods for the examination of dairy products (16th edition). APHA (Washington, USA), 274-277, 1992.

Martinez Magro M. I., Martinez Corbacho J. M., Herranz Sorribes C., Suárez Gea A. M., Rodríguez Gómez J. M. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas. Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. Alimentaria, **52**: 59-74, 2000.

Maruyama S. and Suzuki H. A peptide inhibitor of angiotensin I-converting enzyme inhibitor in the tryptic hydrolysates of casein. *Agric. Biol. Chem.*, **46**: 1393-1399, 1982.

Maruyama S., Nakagomi K., Tomizuka N. and Suzuki H. Angiotensin-converting enzyme inhibitor derived and enzymatic hydrolysate of casein II. Isolation and bradykinin-potentiating activity on uterus and ileum of rat. *Agric. Biol. Chem.*, **51**: 1581-1591, 1985.

Maubois J. L. and Leonil J. Peptides du lait a activite biologique. *Lait*, **69**: 245-263, 1989.

Medigan M.T., Martinko J.M., Parker J. *Biología de los microorganismos*. Brock. Pearson Educación. Madrid, **6**: 142-148, 2004.

Meisel H. and Schlimme E. Milk protein: precursors of bioactive peptides. *Trends Food Sci. Technol.*, **1**: 42-43, 1990.

Mercier J.C. Phosphorylation of caseins, present evidence for an aminoacid triplet code post translationally recognized by specific kinases. *Biochimie*, **63**: 1-17, 1981.

Miccino J. La utilización de cultivos iniciadores en la producción de embutidos estacionado. *Noticiteca*, **13**: 147-151, 1983.

Minervini F., Algaron F., Rizzello C. G., Fox P. F., Monnet V. and Gobbetti M. Angiotensin I- Converting-Enzyme Inhibitory and antibacterial paptides from Lactobacillus helbeticus PR4 proteinase- hydrolyzed casein of milk from six species. Appl. Environ. Microbiol., 5297-5305, 2003.

Montville T J. and Winkowski K. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. Food Microbiol. Fundam. Front. (Washington D. C. USA), 557-576, 1997.

Moon N. J. and Reinbold G. W. Comensalism and competition in mixed cultures of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*. J. Milk Food Technol., **39**: 337-349, 1976.

Moragues L., Rozeck C., Simonetta A. Caracterización preliminar de sustancias tipo bacteriocinas producidas por cepas de enterococos. Rev. Arg. Lactol., **22**: 21-32, 2003.

Monsan P. Influence of the conditions of trypsin immobilization onto spherosil on coupling efficiency. Eur. J. App. Microbiol. Biotech., **5**: 1-11, 1978.

Mullan W.M.A., 2001. Microbiology of starter cultures. [On-line] UK: Available: <file:///D:/MICROBIOLOGY%20OF%20STARTER%20CULTURES.htm>., 2007.

Muller D., Carrasco M., Simonetta A., Tonarelli G. Peptides: The Wave of the Future. Section C: Biologically Active Peptides; "Bioactive peptides produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*. Characterization and partial purification". American Peptide Society and Kluwer Academic Publishers, San Diego, California, USA., 2001.

Müller D. Tesis Doctoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Univ. Nac. del Litoral, 2007

Naito H., Kawakami A. and Imamura T. In vivo formation of phosphopeptide with calcium-binding property in the small intestinal tract of the rat fed on casein. Agric. Biol. Chem., **36**: 409- 415, 1972.

Neviani E., Mucchetti G., Carini S. Ruolo degli enterococchi nei formaggi italiani. I – Loro presenza in formaggi di monte ed impiego in un innesto selezionato. Latte, **7**: 722-728, 1982.

Neviani E., Mucchetti G. Ruolo degli enterococchi nei formaggi italiani. III – Loro sviluppo ed attività in formaggi a media maturazione. Il Latte, **7**: 902-907, 1982.

Okereke A. and Montville T. J. Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria. J. Food Protect., **55**: 349-353, 1991.

Parker F., Magliore-Samour D., Floch F., Zerial A., Werner G. H., Jolles J., Casaretto M., Zahn H. and Jolles P. Immunostimulating hexapeptide from human casein: aminoacid sequence, synthesis, and biological properties. Eur. J. Biochem., **145**: 677-692, 1984.

Peake S. E. and Stanley G. Partial characterization of a bacteriophage of *Lactobacillus bulgaricus* isolated from yoghurt. J Appl. Bacteriol., **44**: 321, 1978.

Pette J. W. and Lolkema H., Yoghurt. I. Symbiosis and antibiosis in mixed cultures of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*. Neth. Milk Dairy J., **4**: 197-202, 1950.

Rajagopal S., Sandine W. Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. J. Dairy Sci., **73**: 894-899, 1990.

Rivadeau-Dumas B. Actualités dans le domaine de la connaissance de la structure et des propriétés biochimiques des protéines laitières. Rev. Lait. Franc., **400**: 17-32, 1981.

Robinson R.K. Microbiología Lactológica, Volumen II. 105 – 145. Ed. Acribia S.A., Zaragoza, España. 1987.

Salminen S. And von Wright A. Lactic acid bacteria. Marcel Dekker, Inc. New York (USA) 1993.

Salveti J. L., Perín J. C. Y Tonarelli G. Tripsina inmovilizada sobre soportes inorgánicos de bajo costo. Revista Internacional de Información Tecnológica. Chile, **10** (2): 163-168.,1999.

Salvucci E., Saavedra L. and Sesma F. Short peptides derived from the NH₂-terminus of subclass IIa bacteriocin CRL35 show antimicrobial activity. J. Antimic. Chem. **59**: 1102-1108., 2007.

Sandine W. Lactic starter culture technology, in Pfizer Cheese Monographs, vol. VI, 21-25, Pfizer Inc (New York), 1979.

Sarantinopoulos P., Andrighetto C., Georgalaki M., Rea M., Lombardi A., Cogan T., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. Int. Dairy J., **11**: 621-647, 2001.

Scarinci H., Carrasco M., Bainotti A., Favale M., Simonetta A. Growth yield of *Enterococcus faecalis* for lactic starter cultures. Microbiol. Alim. Nutr., **12**: 43-48, 1994.

Scarinci H., Carrasco M. and Simonetta A. Growth yield of lactic acid bacteria strains for concentrated starter cultures. Microbiol. Alim. Nutr., **15**: 253-260, 1997.

Scarinci H., Carrasco M. and Simonetta A. Technological properties of strains of lactic acid bacteria for cheese starters: acidifying activity and redox potential control. *Microbiol. Alim. Nutr.*, **12**: 437-442, 1994.

Schmidt J.L., Lenoir J. Contribution à l'étude des entérocoques et de leurs aptitudes technologiques. *Lait*, **52**: 536-557, 664-683, 1972.

Shah N. P. Effects of milk-derived bioactives: an overview. *Brit. J. of Nutr.*, **84**., Suppl. I, S3-S10, 2000.

Simonetta A., Frisón L. and Moragues de Velasco L. Antibacterial activity of bacteriocin-like substances produced by enterococci strains. *Microbiol. Alim. Nutr.*, **16**: 281-288, 1998.

Simonetta A., Moragues de Velasco L. and Frisón L. Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **24**: 139-143, 1997.

Smith J.L. and Haas M.J. Lipolytic microorganisms. In: Vanderzant C. and Splittstoesser D. (Eds), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food*, 3^{ed} Edition, 183-191, APHA, (Washington D. C.), 1991.

Soncini G. Frigerio R., Provera D., Cantoni C. Micrococchi e lattobacilli di insacati crudi stagionati. *Industrie Alimentari*, 473-476, 1982.

Stadhouders J. The control of cheese starter activity. Neth. Milk Dairy J., **40**: 155-173, 1986.

Stetter K. O. Evidence for frequent lysogeny in lactobacilli: temperate bacteriophage within the subgenus Streptobacterium. J. Virol., **24**: 685-694, 1978.

Sütas Y., Soppi E., Korhonen H., Syväoja E. L., Saxelin M., Rokka T. and Isolani E. Suppression of lymphocyte proliferation in by bovine caseins hydrolized with *Lactoballus casei* GG-derived enzymes. J. Allergy Clin Immunol., **1**: 216- 224, 1996.

Suzzi G., Caruso M., Gardini F., Lombardi A., Vannini L., Guerzoni M., Andrighetto C., Lanorte M. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). J. Appl. Microbiol., **89**: 267-274, 2000.

Sverdberg J. De Haas J., Leimenstoll G., Paul F. and Teschemacher H. Demonstration of β -casomorphin immunoreactive materials in *in vivo* digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans. Peptides, **6**: 625-643, 1985.

Swaisgood H. Symposium: genetic perspectives on milk proteins: comparative studies and nomenclature. J Dairy Sci., **76**: 3054-3061,1993.

Tagg J. R., Dajani A. S. and Wannamaker L. W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacterial. Rev.*, **40**: 722-756, 1976.

Tavaria F., Dahl S., Carballo F. and Malcata F. Amino acid catabolism and generation of volatiles by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, **85**: 2462-2470, 2002.

Thomas T.D. Role of lactic acid bacteria and their improvement for production of better fermented animal products. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, **20**: 1-5, 1985.

Thomas T. D. and Mills O. E. Proteolytic enzymes of starter bacteria., *Neth. Milk Dairy J.*, **35**: 255-269, 1981.

Thomas T. and Turner K. Preparation of skim milk to allow harvesting of starter cells from milk cultures. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.*, **12**: 15-21, 1977.

Thompson M.P. and Gyuricsek D.M. Manufacture of yogurt, buttermilk, and cottage cheese from hydrolyzed lactosa miles. *J. Dairy Sci.*, **57**: 584-596, 1974.

Tirelli A., De Noni I. and Resmini P. Bioactive peptides in milk products. *Ital. J. Food Sci.*, **9**: 91-98, 1997.

Vaughan F. E., Caplice E., Looney R., O'Rourke N., Coveney H., Daly C. and Fitzgerald G. F. Isolation from food sources of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. *J. Appl. Bacteriol.*, **76**: 118-123, 1994.

Vijayalakshmi M. A. Pseudobiospecific ligand affinity chromatography. Trends biotechnology. Vol 7, 3: 71-75,1989.

Watanabe K. and Takasue S. The requirement of calcium in infection with Lactobacillus phage. J. Gen. Virol., **17**: 19-27, 1972.

Weetal H. H. Preparation of immobilized protein covalently coupled through silane coupling agents to inorganic supports. App. Bioch. Biotech. **41**: 157- 188, 1993.

Whitaker J. R. Principles of enzymology for the food sciences. Food Sci., Vol 2. Ed. M. Dekker Inc. New York. USA, 1972.

Yamamoto N. Antihypertensive peptides derived from food proteins. Biopolymers. **43**: 129-134, 1997.

Yamanuchi K. Biologically functional protein of milk and peptides derived from milk proteins. Bolletin of Internacional Dairy Federation, **272**: 51-58, 1992.

Yen S.S.C., Quingley M. E., Reid R. L., Ropert J. F. and Cetei N. S. Neuroendocrinology of opioid peptides and their role in the control of gonadotrophin and prolactin secretion. Am. J. Obstet. Gynecol., **152**: 485-494, 1985.

Yokokura T., Kodaira S., Ishiwa H. and Sakurai T. Lysogeny in lactobacilli. J. Gen. Microbiol., **84**: 277-289, 1974.

Zaika L., Kissinger J. Effects of some spices on acid production by starter cultures. J. Food Prot., **42** (7): 572-576, 1979.

Zelezetsky I., Pacor S., pag U., Papo N., Srai Y., Sahl H. and Tossi A. Controlled alteration of the shape and conformational stability of α -helical cell-lytic peptides: effect on mode of action and specificity. Biochem J., **390**: 177-188, 2005.

Bibliografía de consulta general

Accolas J., Heme D., Desmazeaud M., Vassal L., Bouillane C., Veaux M. Les levains lactiques thermophiles: propriétés et comportement en technologie laitière. Lait, **60**: 487-524, 1980.

Ali A.E., Andrews A.T. and Cheeseman G.C. Influence of storage of milk on casein distribution between the micellar and soluble phases and its relation ship to chesse-making parameters. J.Dairy Res., **47**: 371-382, 1980.

Bainotti A., Simonetta A., Basílico J. Optimización de un medio de cultivo destinado al desarrollo de lactobacilos para starters cárnicos. La Industria Cárnica Latinoamericana, **13** (66): 41-44, 1986.

Belford D.A., Rogers M.L., Regester G.O., Francis G.L., Smithers G.W., Liepe I.J., Priebe I.K.and Ballard F.J. Milk-derived growth factors as serum supplements for the growth of fibroblast and epithelial cells. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim., **31**: 752-760, 1995.

Bergère J. Production massive de cellules de *Streptocoques lactiques*. Lait, **48**: 1-11, 1968.

Burroughs Tencza S., Creighton D., Yuan T., Vogel H., Montelaro R. and Mietzner T. Lentivirus-derived antimicrobial peptides: increased potency by sequence engineering and dimerization. *J. Antimicrob. Chemother.*, **44**: 33-41, 1999.

Carrasco M., Garat M., Simonetta A. Estudios de sistemas de cultivo para la producción masiva de *Streptococcus lactis*. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, **28** (3): 191-284, 1986.

Carrasco M., Meinardi C. Simonetta A. Actividad caseinolítica exocelular de enterococos para starters lácticos. *Rev. Arg. Lactol.*, **2**: 27-37, 1989.

Elliker P., Anderson W., Hannesson G. An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. *J. Dairy Sci.*, **39**: 1611-1612, 1956.

Ferkovich S. M. and Oberlander H. Growth factors in invertebrate in vitro culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **27**: 483-486, 1991.

Flambard B., Helinck S., Richard J. and Juillard V. The contribution of casein to the amino acid supply for *Lactococcus lactis* depends on the type of cell envelope proteinase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 1991-1996, 1998.

Garat M., Carrasco M., Simonetta A. Optimización de condiciones para la producción masiva de células de *Streptococcus lactis* a ser utilizadas como fermento en la industria. *Rev. Fac. Ing. Qca. – UNL*, **45** (2): 29-33, 1983.

Garat M., Meinardi C., Carrasco M., Simonetta A. Ensayos de elaboración de quesos con fermentos bacterianos concentrados. Rev. Arg. Microbiol., **16** (2): 67-74, 1984.

Gardini F., Martuscelli M., Caruso M., Galgano F., Crudele A., Favati F., Guerzoni M. and Suzzi G. Effects of pH, temperature and ClNa concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*., Int. J. Food Microbiol., **64**: 105-117, 2001.

Gilliland S. Preparation and storage of concentrated cultures of lactic streptococci. J. Dairy Sci., **60**: 805-809, 1977.

Hayakawa Y., Ohnishi A. Cell growth activity of growth-blocking peptide. Biochem. Biophys. Res. Commun., **250**: 194-199, 1998.

Juillard V., Guillot A., Le Bars D., Gripon J. Specificity of milk peptide utilization by *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol., **64**: 1230-1236, 1998.

Juillard V., Le Bars D., Kunyi E., Konings W., Gripon J., Richard J., Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. Appl. Environ. Microbiol., **61**: 3024-3030, 1995.

Kunji E., Hangting A., De Vries C., Juillard V., Haandrikman A., Poolman B., Konings W. Transport of β -casein-derived peptides by the oligopeptide transport system is the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc., **270**: 1569-1574, 1995.

Mercier J.C., Grosclaude F. and Ribadeau-Dumas B. Structure primaire de la caséine α_{s1} B bovine. Séquence complète. Eur. J. Biochem., **23** : 41-51, 1971.

Mucchetti G., Neviani E., Todesco R., Lodi R. Ruolo degli enterococchi nei formaggi italiani. II – Attività caseinolitica e lipolitica Il Latte, **7**: 821-831, 1982.

Normandie A. Lactic acid bacteria. Presses Universitaires de Caen. Págs : 245-255, 364-365, 1995.

Passer F. Safety of lactic acid bacteria and occurrence in human clinical infections. Bull. Inst. Pasteur, **92**: 45-67, 1994.

Peebles M., Gilliland S., Speck M. Preparation of concentrated lactic streptococcus starters". Appl. Microbiol., **17**: 805-810, 1969.

Peral de Portillo, M., Amoroso M., Oliver G. Culture medium for the differential enumeration of lactic acid bacteria. Milchwissenschaft, **43**: 490-491, 1988.

Perín J.C. Tesis de Doctorado. Comunicación personal. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Santa Fe. Argentina., 2000.

Rato M. A., Vega Cl., Garrido T. Control microbiológico de leche y productos lácteos- Métodos Recomendados-Lima. Perú-, 78-81, 206-207,1983.

Richardson G., Cheng C., Young R. Lactic bulk culture system utilizing a whey-based bacteriophage inhibitory medium and pH control. J. Dairy Sci., **60**: 378-386, 1977.

Richardson G., Hong G., Ernstrom C. USU lactic culture system. Utah Sci., **40**: 94-99, 1979.

Rohm H., Tschager E. and Jaros D. Determination of proteolysis in swiss cheese: comparison of the Kjendahl method and a spectrophotometric OPA assay. Lebensm.-Wiss. U.-Technol., **29**: 191-194, 1996.

Schlimme E. and Meisel H. Bioactive peptides: structural physiological and analytical aspects. Newsletter of the IDF, **139**: 57-71, 1993.

Stadhouders J. and Leenders G. J. M. Spontaneously developed mixed-strain cheese starters. Their behaviour towards phages and their use in the Dutch cheese industry. Neth. Milk Dairy J., **38**: 157- 158, 1984.

Susani T., Neviani E., Carminati D. and Jirafa G. Inibizione in latte di *Clostridium tyrobutyricum* e *Propionibacterium spp.* Da batteriocine prodotte da enterococchi. L'industria del Latte, **31**: 3-13, 1995.

Taticek R., Lee C. and Shuler M. Large-scale insect and plant cell culture. Curr. Opin. Biotechnol., **5**: 165-174, 1994.

Verheul A., Rombouts F. and Abee T. Utilization of oligopeptides by *Listeria monocytogenes* Scott A. Appl. Environ. Microbiol., **64**: 1059-1065, 1998.

Villani F., Coppola S. Selection of enterococcal strains for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. Ann. Microbiol. Enzimol., **44**: 97-105, 1994.

Vrije Universiteit Brussel – Research Group of Industrial Microbiology, 2007.

[OnLine]Available: <file:///D:/Vrije%20Universiteit%20Brussel%20Research%20Group%20of%20Industrial%20Microbiology.htm>.

Wright S., Richardson G. Optimization of whey-based or nonfat dry milk-based media for production of pH controlled bulk lactic cultures. J. Dairy Sci., **65**: 1882-1889, 1982.

Wu J. and Lee K.D. Growth promotion by yeastolate and related components on insect cells. Biotech. Tech., **12**: 67-70, 1998.

