

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA (UdelaR)
FACULTAD DE CIENCIAS

LICENCIATURA EN BIOQUIMICA

TESIS DE LICENCIATURA



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

“Caracterización de bacterias de *Streptococcus thermophilus* aisladas de leche cruda bovina, ovina y caprina”

AUTOR: **Patricia Blanco Güerchia**

TUTORA: Stella Reginensi Ph.D.

CO-TUTOR: Jorge Bermúdez MSc.

LABORATORIO: Unidad Tecnológica de Alimentos – Facultad de Agronomía (UdelaR).

24 Septiembre 2015



INDICE

<i>Agradecimientos</i>	4
Resumen	5
Introducción.....	6
Revisión bibliográfica	6
Generalidades de leche fermentada.....	6
Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	8
Características de las bacterias ácido lácticas.....	8
Aplicaciones de las bacterias ácido lácticas en la industria láctea	9
Cultivos iniciadores	9
Generalidades de <i>Streptococcus thermophilus</i>	11
Producción de exopolisacáridos	12
Acidificación y proteólisis.....	13
Producción de ácido láctico	15
OBJETIVOS	15
Objetivos específicos	15
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Muestras	15
Aislamientos de bacterias ácido lácticas.....	16
Identificación de cepas <i>Streptococcus thermophilus</i>	16
Caracterización genotípica.....	17
Extracción de DNA genómico.....	17
Análisis por PCR especie específica <i>Streptococcus thermophilus (lacZ)</i>	17
Identificación por ARDRA	18
Análisis de la secuencia del gen 16S rDNA.....	18
Evaluación de propiedades de interés tecnológico	18
Acidificación	19
Determinación de variantes rápidas y lentas	19
Producción de exopolisacárido (EPS) (filancia)	20

RESULTADOS Y DISCUSION	20
Identificación fenotípicas y bioquímicas de cepas de <i>Streptococcus</i>	20
Identificación genética de cepas de <i>Streptococcus thermophilus</i>	22
Análisis por PCR especie específica <i>Streptococcus thermophilus</i> (<i>lacZ</i>).....	¡Error! Marcador no definido.
Identificación de los aislamientos seleccionados por ARDRA.....	23
Identificación de los aislamientos mediante análisis de la secuencia 16S rADN de los aislamientos	24
Análisis de propiedades de interés tecnológico	24
Determinación Variantes rápidas y lentas	24
Actividad acidificante y acidez titulable.....	25
Producción de exopolisacárido (filancia)	26
Conclusiones.....	27
ANEXO 1. COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVO.....	28
BIBLIOGRAFIA.....	29

Agradecimientos

Primero y antes que nadie agradezco a mi papá Ángel y a mi mamá Adriana, devotos e increíbles padres a quienes les debo todo, y más aún les agradezco la motivación y el aliento constante para seguir adelante con mis sueños, y haciendo posible uno de ellos como lo es este trabajo.

Agradezco a Stella Reginensi, Jorge Bermúdez, Jorge Olivera, Marcela González, Nancy Scarone y a Tere, quienes hicieron de la U.T.A un hermoso y cálido lugar en donde desarrolle este trabajo y muchas de las herramientas que aplico día a día, gracias por su ayuda y por su generosidad, gracias Stella por estar siempre.

A Damian por acompañarme y alentarme.

A Andrea, querida amiga, que siempre estuvo ahí.

Resumen

La fermentación de los alimentos por medio de las bacterias ácido lácticas (BAL) es una práctica que se lleva a cabo desde la antigüedad, estas bacterias son microorganismos ampliamente utilizados en la industria alimentaria por sus diversas características y propiedades tecnológicas. En la industria láctea las BAL son utilizadas como cultivos iniciadores. *Streptococcus thermophilus* forma parte de estos cultivos de casi todos los fermentos con los cuales se elaboran quesos y yogures, por lo que en el presente trabajo se buscó aislar dicho microorganismo de fuentes autóctonas para la posterior evaluación de sus propiedades tecnológicas. Para este estudio se procesaron 42 muestras de leche de vaca, cabra y oveja obtenidas de establecimientos diferentes, las cuales se inocularon en medio agar-leche-trifeniltetrazolio. Las colonias características de BAL se aislaron en agar MRS y M17. A estos aislamientos se les realizó tinción de Gram, determinación de actividad catalasa, oxidasa, tolerancia a la sal, producción de gas y fermentación de trece diferentes azúcares con el fin de identificar a las cepas de *Streptococcus thermophilus*. La caracterización fenotípica y bioquímica se complementó con la caracterización genotípica de las cepas seleccionadas, al amplificar por PCR el gen *lac Z* usando primers especie específicos y mediante la determinación del perfil de digestión con enzimas de restricción del gen 16S rARN (ARDRA). Las propiedades tecnológicas evaluadas fueron la capacidad acidificadora, determinando el carácter de variante rápida o lenta mediante crecimiento en medio FSDA; acidez titulable en grados Dornic; producción de exopolisacáridos (EPS), determinando la producción de mucílago a partir del crecimiento en un medio sólido como el MRS agar. De todas las cepas aisladas sólo 14 se como presumibles *Streptococcus thermophilus*, trece cepa fermentan glucosa (52, 53, 56, 57, 80-STH, 84, 86, 92, 93, 94, 101, 102, control), seis cepas no utilizan la sacarosa (52, 56, 86, 92, 95, 102), la lactosa es fermentada por todos los aislamientos y la fructosa es fermentada por diez aislamientos (52, 53, 57, 80, 84, 86, 94, 101, 102, control). De acuerdo a lo esperado éstas cepas no producen gas debido a que esta especie es homofermentativa. De las catorce bacterias seleccionadas, sólo 4 cepas pueden fermentar galactosa, es importante señalar que las especies de *Streptococcus thermophilus* no fermentan en su mayoría a este azúcar y es importante su utilización en productos lácteos para disminuir la presencia de este carbohidrato. La identificación de las cepas seleccionadas se realizó luego de analizar los productos de PCR generados al emplear primers específicos de especie para el gen *lac Z*. El producto de la amplificación de éste gen tiene un tamaño de 968 pb para las cepas 53, 57, STH (80) el cual era el esperado ya que ese es el tamaño de la cepa de referencia de *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258 (cepa 986). Mediante el empleo de ARDRA se observa que las cepas 53, 57 y STH (80) tienen el mismo perfil de restricción similares al correspondiente a la cepa de referencia ATCC. Es importante resaltar que los aislamientos de cepas de *Streptococcus thermophilus* nativas de la cadena láctea es baja y en el presente trabajo representó 21% a partir de la caracterización fenotípica y bioquímica, si bien finalmente se confirmaron sólo tres cepas como *Streptococcus thermophilus* por secuenciación del 16S rDNA con similitud mayor a 98%.

Introducción

El sector lácteo en Uruguay es de importancia desde el punto de vista nacional e internacional. La producción de leche comercial durante el año 2012 en el país fue de 2.177 millones de litros (DIEA 2013), representando un incremento de importancia en la última década. El otro flujo industrial de leche es la elaboración de diversos productos, que totalizó 1.779 millones de litros. Los principales productos elaborados son grasas, quesos, leches en polvo y leches larga vida, los cuales continúan siendo los productos de mayor relevancia por las cantidades obtenidas. Dentro de los restantes productos que tienen como principal destino el mercado interno, se destacan por su crecimiento los yogures que alcanzaron 35 millones de litros -4% encima del dato anterior y 1.3 veces más alto que en el 2008. Dentro de estos cambios, hay casos como las leches en polvo y los quesos con aumentos de más del doble, mostrando una tendencia de crecimiento sostenido en el transcurso de los años, al igual que el yogur y el dulce de leche (DIEA 2013).

Revisión bibliográfica

Generalidades de leche fermentada

Son varios los animales de los cuales su leche es consumida a nivel mundial por los seres humanos, entre éstos animales se encuentran cabra, búfala, yegua, camello y oveja siendo la más importante y común la leche de vaca. Su composición y su pH (cerca de la neutralidad) hacen que la leche sea un buen medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos y la fermentación de la misma por parte de éstos (Adams, 2008; A. Hernández et al 2003, Law, B.A. 1997).

La fermentación de la leche es una práctica antiquísima que originalmente se realizaba para obtener leche con mejor sabor, aroma y consistencia, lo que implicaba la conservación de la misma por períodos prolongados de leche cruda sin tratamientos previos.

La conservación de la leche fue descubierta accidentalmente al almacenar leche en recipientes en los cuales luego de unos días, al abrirlas, se encontraba un producto con sabor ácido y separado en dos fases, una líquida y otra semi sólida, esta última grumosa y de sabor agradable. Esta separación se debe a la fermentación láctica. A partir de ésta observación se comenzaron a desarrollar productos lácteos fermentados. Se supone que las primeras leches fermentadas se obtuvieron de leche de cabra y oveja, ya que fueron los primeros animales en ser domesticados alrededor del año 9000 AC. Luego la vaca fue domesticada alrededor del año 6100-5800 AC en Turquía o Macedonia, de donde provienen otros varios productos fermentados. Se supone que el yogur se comenzó a elaborar en Mesopotamia hace aproximadamente unos 7000 años y el queso se elabora desde el año 6000 AC siendo hoy en día uno de los productos lácteos más diversos que se elaboran a partir de leche de vaca, cabra y oveja; en la actualidad es uno de los productos más diversos que existen (Adams, 2008, Hernandez et al 2003, Hui, Y.H. 2007 y Law, B.A. 1997)

Metchnikoff (1908) en su tratado de "La Prolongación de la Vida", sugiere que la longevidad de los búlgaros es causada, en parte, por la ingestión en grandes cantidades de leche fermentada conteniendo lactobacilos. Esta observación ha llevado al esclarecimiento del papel de las bacterias del ácido láctico (BAL) y productos lácteos cultivados en la mitigación de trastornos en la salud humana y animal. Alrededor de la mitad del siglo pasado, una amplia investigación impulsada por diferentes industrias se ha llevado a cabo con el objetivo de revelar todos los beneficios relacionados con este producto (Vasiljevic, 2007). El yogur comenzó a ser considerado

como una parte importante de una dieta saludable con el fin de mejorar el bienestar general humano. Es uno entre los alimentos recomendados para bebés y niños pequeños para mejorar la salud y el hábito de comer en los EE.UU (Fox et al., 2004).

En los comienzos del siglo 20 los investigadores Orla-Jensen, definen a las bacterias ácido lácticas como los organismos "acidificadores de la leche". En 1919-1920 la clasificación de las BAL realizada por Orla-Jensen se basó en sus características bioquímicas, diferenciando dos grandes grupos en base a su metabolismo: las homofermentativas y las heterofermentativas. Además en su monografía desarrollan las bases para la clasificación que usamos hoy en día. Los géneros reconocidos por ellos eran: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, aunque el manejo de herramientas modernas como las técnicas moleculares para la clasificación taxonómica han aumentado los números de géneros de bacterias ácido lácticas. La mayoría de las especies con características determinadas que las hacen aplicables a la industria pertenecen a los géneros *Lactobacillus* (leche, vegetales, carne y cereales), *Leuconostoc* (leche y vegetales), *Pediococcus* (vegetales y carne), *Streptococcus* (leche), *Lactococcus* (leche) y *Oenococcus* (vino) (Cabeza Herrera, E. A. C. 2006; Lahtinen, S. 2012; FAO 1999; R. J. Siezen, et. al. 2002).

Los beneficios para la salud del consumo de yogur se asociaron inicialmente con microorganismos implicados en el proceso de fermentación, y / o su productos de fermentación. Sin embargo, más recientemente, muchos otros beneficios fisiológicos han sido reconocidos que se originarían a partir de otros componentes del yogur. Dos especies bacterianas se encuentran implicadas como cultivos iniciadores en la producción de yogur: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, y *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*). El consumo de yogur también presenta una forma de administración de microorganismos vivos al tracto gastrointestinal. Al sobrevivir en un ambiente con alto nivel de acidez y presencia de bilis ácido, estas bacterias pueden llegar al intestino, donde existe una comunidad nativa de microflora establecida. Entre las ventajas reconocidas con efecto en la salud producidas por el consumo de yogur se destaca la capacidad de éstas bacterias de fermentar lactosa lo que hacen a este alimento accesible para las personas con intolerancia a éste disacárido (Guarner et al., 2005).

En varios países incluyendo Australia, el yogur se define como un producto de leche fermentada producido por los microorganismos ácido láctico (FSANZ, 2003). Esta microflora le imparte textura deseable al yogur, debido a la producción de exopolisacáridos (EPS) (Hassan et al., 1997). La presencia de EPS en los productos fermentados influye en varios sentidos y propiedades, como lo son el brillo, corte limpio, viscosidad y cremosidad (Folkenberg et al., 2005). Debido a la discrepancia en las regulaciones en todo el mundo, los productos producidos a partir de una base de yogur y fermentados por una sola cepa del fermento mixto o cualquier otra bacteria del ácido láctico son generalmente denominados "leches fermentadas". Los cultivos iniciadores de yogur pueden presentar un efecto probiótico, aunque más débil que las otras especies probióticas, basado en la resistencia al jugo gástrico y ácido biliar, actividad β - galactosidasa, y la hidrofobicidad (Vinderola et al., 2005).

Las cepas bacterianas de *S. thermophilus* presentaron efecto probiótico menor en comparación con *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* (Vinderola et al., 2006). Sin embargo, el *S. thermophilus* puede proporcionar ciertos beneficios a la salud a través de la producción de exopolisacáridos (EPS), son esenciales para la producción de yogur impartiendo textura. Existen también cepas de *L. delbrueckii* subsp *bulgaricus* productoras de EPS (Welman, 2003). Los exopolisacáridos pueden aparecer en dos formas: como capsular o viscoso (exopolisacáridos extracelulares) (Wicken et al., 1983). El EPS capsular es la capa más gruesa y externa unido covalentemente a la pared celular, mientras que la capa de EPS 'viscosa' se excreta al medio. Sin embargo, algunas cepas pueden tener ambos tipos de EPS con diferentes proporciones entre los dos (Zisu y Shah, 2005, 2007).

Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Características de las bacterias ácido lácticas

Las BAL son microorganismos diversos aislados de diferentes entornos, como vegetales (maíz, repollo, cebada), carne, leche, plantas verdes, y también se han aislado del tracto digestivo y vagina de mamíferos. Se usan como cultivos iniciadores en la manufactura de productos lácteos como leches acidificadas, yogur y quesos; también son aplicadas comercialmente en el procesamiento de bebidas alcohólicas (vino y cerveza), carnes, vegetales, encurtidos, ensilajes y embutidos. Desde hace mucho tiempo, las BAL son usadas por la industria alimentaria por su capacidad de producir compuestos aromáticos y saborizantes. Por ejemplo, el tipo y cantidad de ácido láctico formado durante la fermentación es fundamental para la manufactura de alimentos y tiene también un rol importante en la clasificación taxonómica de las BAL. Una línea de investigación actual muy importante se basa en las propiedades probióticas de las BAL las cuales pueden promover el crecimiento de una flora intestinal que compita con potenciales microorganismos patógenos, previniendo así el establecimiento de microorganismos patógenos, además de producir compuestos y péptidos beneficiosos para la salud (Carr F.J, Chill D., & Maida, N. 2002; Ramirez Ramirez J. 2011; D'Mello J.P.F. 2004)

Las BAL fueron primeramente definidas por Orla-Jensen, como bacterias Gram positivas, generalmente inmóviles, no esporuladas, con forma de cocos o bastones, catalasa y oxidasa negativas. La mayoría, anaerobias o aerotolerantes ya que carecen de citocromos y porfirina (Adams, 2008; Parra Huertas R. A. 2010; Ramírez M^a del S 2005)

En cuanto a la temperatura de crecimiento, las BAL son mesófilas en su mayoría y también hay cepas termófilas, aunque algunas crecen a temperaturas tan bajas como 5° C, pero generalmente su temperatura óptima de crecimiento está entre 25 y 30° C. En cuanto al pH, la mayoría crece a pH 4-4.5, aunque pueden hacerlo a pH 3.2 o 9.6. (Ramirez J. 2011)

De acuerdo a la fermentación de la glucosa y del producto de la misma se clasifican como homofermentativas o heterofermentativas. Otra clasificación surge del tipo de ácido láctico producido, el cual puede ser D (-), L (+) o una mezcla racémica de los dos isómeros (Ramírez M^a del S., 2005)

Al momento de clasificar las BAL según rasgos fenotípicos clásicos se encuentran algunas inconsistencias. Por ejemplo, la habilidad de crecer en un medio con bilis, la fermentación de azúcares, la resistencia a antibióticos y el rango de temperatura de crecimiento de las bacterias pertenecientes al género *Streptococcus* y *Enterococcus*, son muy similares, por lo cual se hacen indistinguibles mediante identificación fenotípica (Botina, et. al. 2007.)

Las BAL son consideradas microorganismos GRAS (de la sigla en inglés: Generally Recognised As Safe), por lo cual son usadas en la manufactura de muchos alimentos funcionales debido a que su empleo en la industria está autorizado y reglamentado. Los alimentos funcionales son aquellos que proporcionan efectos fisiológicos no nutricionales beneficiosos para la salud del consumidor. La biopreservación consiste en el uso de cultivos de estos microorganismos o los metabolitos producidos por ellos (Ciencia y tecnología de los alimentos Vol. 19 N°3, Cuba, 2009)

Son varias las características de las BAL que les confieren actividad antimicrobiana, por ejemplo, la producción de ácidos y el respectivo descenso del pH convierte a los ácidos orgánicos en liposolubles por lo que adquieren la capacidad de difundir a través de las membranas citoplasmáticas hasta el interior de la célula bacteriana. Además, las BAL producen acetaldehído,

peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, polisacáridos y bacteriocinas, productos éstos con propiedades antimicrobianas (Beasley, S. 2004).

Por lo tanto, varios son los usos de las bacterias ácido lácticas en la industria alimentaria debido a su capacidad de producir dextranos, ácido láctico y a su tolerancia a pH inferiores a 7, entre otras cosas, características que las hacen útiles para la elaboración y conservación de los alimentos y para la mejora tecnológica de los mismos. Así es que las BAL, además han sido utilizadas por siglos como agentes saborizantes y texturizantes, siendo adicionadas como cultivos iniciadores (Herrera, E. A. C. 2006; Alais, C. 1985)

La industria alimentaria en la que las BAL son ampliamente utilizadas es la industria láctea, ya que la fermentación de la leche por las mismas tiene como consecuencia un producto final con características bien definidas, es así, que las leches fermentadas constituyen el principal vehículo para el consumo de cepas BAL con propiedades probióticas (Damián J y Reginensi, 2001; Baqueiro, I. 2004; Esquivel, I. Guerrero, R 2004; Quirós, A. et al. 2005.)

Aplicaciones de las bacterias ácido lácticas en la industria láctea

Cultivos iniciadores

Un cultivo iniciador es un cultivo de una o varias cepas de BAL vivas y activas metabólicamente que se adicionan a los alimentos, en los que deben ser capaces de multiplicarse, para hacer uso de su metabolismo (fermentación), el cual produce la rápida acidificación del medio promoviendo la coagulación. Además produce compuestos que mejoran la textura, el sabor, y mejoran la digestibilidad y aspecto de los alimentos. Todas estas propiedades son buscadas en las bacterias BAL, las cuales deben estar bien caracterizadas y ser bien definidas para poder ser utilizados en la industria (MS Ramírez Cuenca, 2005; Alais, C. 1985; Esquivel, I. Guerrero, R 2004).

También se buscan BAL con propiedades de bioprotección para a los alimentos frente a los patógenos potenciales presentes en la materia prima, extendiendo la vida útil de los mismos. Son varios los productos en los que se aplica el uso de estos cultivos, como por ejemplo la elaboración de productos lácteos (leches fermentadas como yogur, kefir y quesos), embutidos, bebidas alcohólicas, encurtidos, conservas, entre otros. En consecuencia, los cultivos iniciadores tienen varias funciones generales: aumentar la sinéresis en la leche, reducir el contenido de lactosa, desarrollar compuestos aromáticos y en algunos casos producción de gases. Todas estas características colaboran en la elaboración de productos con determinadas propiedades funcionales. Además, estos cultivos pueden estar constituidos por cepas con propiedades probióticas, rasgo importante y de gran explotación comercial. Las cepas de BAL más usadas en los cultivos iniciadores pertenecen a los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, y la elección de unas u otras determina el sabor, el aroma y la textura del producto final seleccionado para su industrialización (Alvarado Rivas, C., et al.2007; Herrera, E. A. C. 2006; De Vuyst, L. 2000; Guerrero, 1997; Esquivel, I. Guerrero, R 2004).

Los “starters” son fermentos utilizados en la industria láctea para la manufactura de productos fermentados tales como yogur, leche acidófila, quesos, kefir, koumiss, entre otros. Pueden ser usados mediante la utilización de una pequeña cantidad de un producto previamente fermentado o puede adquirirse un cultivo preparado comercialmente. Los primeros cultivos en comercializarse fueron preparados por Ch. Hansen Laboratory en Dinamarca a finales del siglo XIX, los cuales consistían en mezclas de cepas no determinadas provenientes de la leche cruda (Early, Ralph, ed. Technology of dairy products, 1998; Esquivel, I. Guerrero, R 2004; Fellows, P., & Hampton, A. 1992).

En relación a la temperatura de crecimiento las BAL, éstas pueden ser mesófilas o termófilas (metabólicamente activos a temperaturas de mayores a 45 °C), por lo tanto se adicionan para

producir la acidificación del medio de forma controlada a altas temperaturas de fabricación del producto; sin embargo, pueden usarse cultivos iniciadores termofílicos en procesos en donde las temperaturas no llegan a ser tan altas (Early, Ralph, ed. 1998).

Dentro de los fermentos mesofílicos encontramos al género *Lactococcus*, el cual es ampliamente aplicado para la producción de quesos de pasta blanda, semidura y dura. Los iniciadores termofílicos son usados para la producción de yogur y de quesos pasta dura (Auclair, J., & Accolas, J. P. 1983; Barry, AL. A. Y. Tamine, 2010; B. A. Law 1978).

La acidificación producida por la adición de los cultivos iniciadores consiste en el descenso del pH de la leche, lo que permite frenar el desarrollo de otros microorganismos indeseables, además de estimular la actividad coagulante del cuajo. La leche de la cual se parte debe estar libre de antibióticos u otros inhibidores del crecimiento de las bacterias iniciadoras. Se identifican y caracterizan cada vez más cepas para ser utilizadas como “starters” (sean estos primarios o secundarios), con el fin de mejorar las características del producto fermentado ya que con el uso de fermentos bien conocidos se pueden evitar problemas en la producción causados por ejemplo, por el ataque de bacteriófagos (Herrera, E. A. C. 2006; M° del S. Ramirez Cuenca 2005; Vadeboncoeur, C. 2004).

Los iniciadores pueden ser de una sólo cepa o de una mezcla de dos o mas cepas, y la elección de un tipo u otro va determinar el sabor, la textura y las propiedades reológicas del producto final. Los “starters” de una sola cepa son más sensibles al ataque por parte de fagos por lo que la calidad del producto final puede verse afectada, mientras que los “starters” conformados por más de una cepa presentan resistencia al ataque de fagos, ya que si los fagos atacan a una cepa las demás presentes en el cultivo continuarán con las funciones realizadas por la cepa atacada (Esquivel, I. Guerrero, R 2004).

Las aplicaciones más comunes de estos cultivos, especialmente los termofílicos, son en la manufactura de sub-productos fermentados como yogur, quesos, y otras leches acidificadas (como el koumiss y el kefir). Los cultivos termofílicos están formados por *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y especies de *Lactobacillus*, estos, producen ácido a altas temperaturas más rápidamente juntos que en monocultivo debido a la relación simbiótica que existe entre estos dos tipos de cepas que se detallará más adelante (Herrera, E. A. C. 2006).

El producto principal de la fermentación es el ácido láctico, sin embargo los productos minoritarios, son determinantes para las características y la calidad del producto final. Por ejemplo, la producción de EPS es determinante en la formación de la matriz en la elaboración del kefir; la producción de CO₂ por parte de las cepas heterofermentativas es la que da la característica “efervescentes” en bebidas alcohólicas como el koumiss, por todo esto y lo antes mencionado cuando hablamos de metabolismo, son varias las ventajas del uso de las BAL en cultivos iniciadores para la elaboración de productos fermentados: aumentan el tiempo de preservación de los alimentos, aumentan el valor nutricional del alimento del cual se parte en la fermentación, los convierten además en alimentos funcionales, cambian y mejoran sus propiedades organolépticas, aumentan su valor económico además de convertir a los alimentos en un producto único dependiendo de qué cepa o cuales cepas sean las encargadas de la fermentación (Hutkins, R.W. 2006 UK; Law, B. A. 1997).

En la elección del tipo de cultivo a utilizar en la producción de lácteos fermentados se deben tener en cuenta varios parámetros para la obtención de un producto con las características esperadas. En primer lugar el cultivo debe ser capaz de multiplicarse óptimamente en el medio lácteo (leche, suero de la leche, etc.) además de tener en cuenta el desfase que existe entre la producción máxima de ácido láctico y la multiplicación de las BAL, ya que estas están en fase estacionaria o comenzando a morir cuando se da la máxima concentración de ácido láctico (Alais, C. 1985).

En resumen, las siguientes variables son importantes a la hora de elegir un buen cultivo iniciador, como lo son: una producción suficiente de ácido láctico para obtener el producto de las características deseadas; la producción que debe ser continua durante todos los rangos de temperatura en el proceso de manufactura de los productos fermentados; los cultivos iniciadores deben producir sabor, aroma, consistencia y texturas deseadas para el producto final; deben ser resistentes a antibióticos u otros inhibidores y a los bacteriófagos; así como ser activos en presencia de residuos de sanitizantes, detergentes; no deben producir: bacteriocinas, compuestos antimicrobianos que puedan inhibir el desarrollo del cultivo iniciador.

Generalidades de *Streptococcus thermophilus*

Esta cepa pertenece al grupo de las BAL y es una de las más usadas en la industria láctea para la producción de queso y yogur, y es un microorganismo calificado como GRAS (Advanced Dairy Chemistry. Vol. 3: Lactose, Water, Salts and minor constituent). Debido a que es una cepa termófila (T óptima de crecimiento 42-45 °C) es muy utilizada para la manufactura de quesos como el suizo o italiano, los cuales tienen etapas de altas temperaturas en el proceso de elaboración (Vadeboncoeur, C. 2004; Romero del Castillo Shelly, R. 2004)

Streptococcus thermophilus pertenece al grupo de BAL homofermentativas que tienen como hábitats naturales la mucosa mamaria bovina y la leche, por lo tanto también se encuentran en productos derivados de la leche. Al gram se observan cocos dispuestos en pares o cadenas de 0.7 a 0.9 un de diámetro, características que varían según el medio de cultivo y la temperatura de crecimiento, usan la ruta EMP (glicólisis) para la fermentación de la lactosa a ácido láctico produciendo un 0.7-.08% de ácido láctico y algunas cepas alcanzan a producir hasta un 1%. Los streptococos se clasifican primariamente en su género basado en su morfología de acuerdo a la tinción de Gram (positiva), en la cantidad y tipo de ácido láctico formado (D, L, o DL), en su crecimiento en NaCl 6.5%, en la hidrólisis de arginina y la temperatura óptima de crecimiento (Carr, F. J. 2002; Romero del castillo, R. Mestres, J. 2004; Goh, Y. J. 2011).

Una de las características fenotípicas más importantes es la capacidad de algunas cepas de producir EPS (exopolisacárido), el cual es de gran importancia para la industria alimentaria debido a sus propiedades antes mencionadas (Mora, D., et al. 2002; Romero del Castillo, R. y Mestres, J. 2004).

Streptococcus thermophilus tiene una actividad proteolítica muy pobre en leche, y la poca cantidad de aminoácidos liberados por él son consumidos durante la fase logarítmica de crecimiento, además, es una cepa muy sensible a los inhibidores del crecimiento, muy especialmente a los antibióticos y a altas concentraciones de sal, lo cual lo diferencian de *Lactococcus* y *Enterococcus*, quienes son más resistentes a éstas condiciones (Romero del Castillo, R. y Mestres, J. 2004)

Trabajos enfocados en la genética de *Streptococcus thermophilus* indican que su genoma tiene una proporción de pseudogenes del 10%, lo que puede deberse a la pérdida de funciones o a eventos como recombinación o transferencia horizontal de genes (HGT), ya que el genoma de *Streptococcus thermophilus* alberga varios elementos genéticos móviles como secuencias de inserción, los cuales pueden ser consecuencia de evento de HGT. Estos elementos de inserción (IS) pueden haber sido adquiridos por transferencia desde el genoma de otras bacterias lácticas como por ejemplo *Lactococcus lactis*. Hay una región de 17 kb que contiene copias IS y un mosaico de fragmentos con más del 90% de identidad con el ADN de *Lactobacillus bulgaricus*. La

existencia de esta región puede evidenciar la ocurrencia de eventos de HGT entre cepas. El origen de estas interacciones se basa en que estas cepas de BAL viven en constante asociación con *Streptococcus thermophilus* en la manufactura de queso y yogur (Delorme, C. et al 2010).

Otra característica de este género es que son anaerobios facultativos, por lo que *Streptococcus thermophilus* debe contar con mecanismos que minimicen el poder tóxico que tienen altas concentraciones de oxígeno como por ejemplo las enzimas superóxido dismutasa, NADH oxidasa, peroxidasa y glutatión reductasa; además *Streptococcus thermophilus* tiene una respuesta para reducir los efectos adversos generados por los radicales libres de oxígeno producto de la reacción de Fenton, que tiene como reactivo el H₂O₂ generado por *Lactobacillus bulgaricus* cuando ambos son co-cultivados, esta respuesta está mediada por la acción de Dpr que es una proteína que se une al hierro intracelular libre.



(Fernandez, A. et al. 2004; Chang, S. 1997; Sieuwerts, S. et al. 2010; Siezen, R. 2002).

Producción de exopolisacáridos

En la industria alimentaria son importantes los potenciadores de la viscosidad y la textura, proviniendo éstos de fuentes vegetales, animales o bacterianas. Algunas cepas de BAL usadas industrialmente producen exopolisacáridos extracelulares, los cuales sirven como estabilizantes principalmente en la industria láctea, reemplazando así a otros estabilizantes comúnmente usados que causaban la sinéresis (separación de fases) en el producto, estos exopolisacáridos no la causan, además de ser seguros, por lo tanto su utilización tiene ventajas económicas y legales, ya que no es necesario la adición de estabilizantes en el proceso de elaboración ni otros aditivos texturizantes por ejemplo (Vaningelgem, F. et al. 2004).

Los EPS son biopolímeros que pueden encontrarse asociados a la superficie celular o pueden liberarse al medio de cultivo como exopolisacáridos (EPS). Estos EPS tienen diversas funciones como son la protección celular contra sustancias tóxicas, ambientes limitantes y otros antagonistas, secuestro de cationes esenciales, colonización y reconocimiento celular; además, debido a las propiedades del EPS para unirse fuertemente al agua, protege a la bacteria de ambientes con bajos niveles de humedad (Broadbent, J. R., et al. 2003).

Las cepas productoras de EPS se denominan cepas filantes y son ampliamente usadas en la elaboración de algunos productos lácteos. El EPS producido, mejora las propiedades reológicas del producto, como la textura, palatabilidad, adhesividad, entre otras propiedades. Este carácter filante, se debe al aumento de EPS en los productos fermentados, debido a interacciones de éste con la matriz proteica haciendo que el agua quede retenida en la matriz evitando así la sinéresis dando como resultado un producto más firme y adhesivo, mejorando estabilidad del mismo (Domínguez, J., et al.; Dominguez-Soberanes, J., et al. 2001; Hess, S. J., R. F. Roberts, and G. R. Ziegler, 1997).

La mayoría de los estudios con las cepas filantes se han llevado a cabo en yogur, obteniéndose ventajas como aumento en la viscosidad del producto terminado y la posibilidad de disminuir la cantidad de sólidos del mismo. Así es que la presencia de EPS en yogures batidos, hace al producto menos sensible al uso de máquinas bombeadoras, mezcladoras y llenadoras en el proceso de manufactura. Las cepas productoras de EPS también son muy útiles en el proceso de producción de otros productos lácteos; por ejemplo las cepas de *Streptococcus thermophilus*

modifican la calidad final del producto en cremas ácidas y leches fermentadas así como en quesos. Además, estas cepas filantes han sido utilizadas con el objetivo de disminuir la mortalidad de las BAL viables cuando son adicionadas en postres lácteos congelados (Broadbent, J. R., et al. 2003; Dominguez-Soberanes, J., et al. 2001; Hess, S. J. 1997).

En el caso de los quesos, hay trabajos que demuestran que durante la maduración del queso elaborado con cepas productoras de EPS de *Streptococcus thermophilus* hay una menor pérdida de peso, y por lo tanto un mayor rendimiento, ya que el EPS tiene mayor capacidad de ligarse al agua siendo ésta retenida en el producto final. Además, también aumenta la retención de grasa y proteínas debido a la interacción de los EPS con la matriz proteica. (Domínguez, J., et al.; Reinheimer, C. 2007).

Los EPS producidos por las BAL se dividen en dos grandes grupos i) los homopolisacáridos compuestos por un tipo de monosacárido y ii) los heteropolisacáridos, compuestos por unidades de dos o más monosacáridos distintos (α -D- glucanos, β -D- glucanos, β -D- fructanos y otros como poligalactanos). Los EPS homopolisacáridos incluyen dextranos y glucanos los cuales son producidos por *Leuconostoc mesenteroides* y *Streptococcus mutans* respectivamente. Por otro lado, los heteropolisacáridos son sintetizados por varias BAL como *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus spp.* de origen lácteo (Broadbent, J. R., et al. 2003).

La habilidad de producir EPS depende de la cepa que lo produce, y es significativamente afectada por el medio y condiciones de crecimiento. Todo esto indica, que la caracterización estructural y genética de las cepas que lo producen, permitirá a los productores lácteos seleccionar y construir cultivos productores de EPS que le confieran a sus productos propiedades únicas y predecibles. Esto es así en el caso del queso muzzarella, en el cual la mayor parte del agua está contenida en canales formados por la matriz proteica atrapados en glóbulos de grasa. Éstos, se hacen mucho más estrechos en los quesos con bajo contenido en grasa, teniendo menos espacio disponible para el agua, lo que da como resultado un queso con menor nivel de humedad, en consecuencia más duro, de textura gomosa; el uso de cepas productoras de EPS en la manufactura de muzzarella baja en grasas hacen que el agua quede mayormente retenida dando un producto con mejores características (Low, D. et al. 1998; Broadbent, J. R., et al. 2003; Reinheimer, C. Zalazar 2007)

Acidificación y proteólisis

La habilidad de las BAL para fermentar el azúcar de la leche (lactosa) y degradar las proteínas de la leche (proteólisis), son cualidades que permiten la adaptación al ambiente lácteo. Ya que pueden sintetizar aminoácidos de forma limitada, dependen de los aminoácidos presentes en el medio de cultivo o de los resultantes en la proteólisis de las proteínas de la leche. Análisis genómicos comparativos del sistema proteolítico de varias BAL han permitido encontrar genes codificadores de enzimas esenciales para el crecimiento en medios lácteos, como lo es la proteasa de la pared celular (PrpP), presente en el cromosoma de algunos *Lactobacillus*, *Streptococcus*; como en el plásmido de *Lactobacillus lactis* subesp. *cremoris*. Esta proteinasa asociada a la pared celular constituye un sistema de transporte específico de aminoácidos y péptidos, como de varias peptidasas citoplasmáticas (Moulay, M., et al. 2006;

La mayoría de las BAL en la industria alimentaria se utilizan formando parte de cultivos iniciadores (starters), debido a su capacidad de producir ácido láctico como principal producto final de la fermentación de la lactosa, producción de gran importancia económica, debido a que la acidificación inhibe el crecimiento de organismos de deterioro y patógenos, además de su producción a escala industrial para ser comercializados como inóculos bioprotectores y

acidificantes. La cantidad de ácido láctico producido por las diferentes cepas dependen de la especie a la que pertenezcan. La mayoría producen entre un 0.5% y un 1.5%, pero hay especies que llegan con mayor actividad fermentativa a una producción de 3% de ácido láctico (Serna-Cock, L. 2005).

La capacidad de producir ácido láctico es un rasgo importante para la industria, pero también, la rapidez con la cual es producido, que depende de la actividad enzimática de la cepa. Por lo tanto, esta característica es tomada en cuenta a la hora de seleccionar las cepas que van a formar parte de un cultivo iniciador. No solamente importa la rapidez, además debe tenerse en cuenta el tiempo en el cual alcanza el pH final y la estabilidad de producción de un cultivo a otro.

Es así que las BAL pueden clasificarse en rápidas o lentas según su velocidad de acidificación. Las cepas lentas son producto de mutaciones genéticas que han generado un mutante Lac⁻ o Prt⁻ o ambos. Estas mutaciones pueden deberse a la resistencia o sensibilidad de las cepas a los inhibidores presentes en la leche (lactoperoxidasa, inmunoglobulinas, antibióticos, desinfectantes, bacteriocinas, bacteriófagos), los cuales han modificado a las BAL debido a su uso en la industria y su consecuente cultivo reiterado en el laboratorio. Las cepas rápidas son aquellas que coagulan la leche descremada estéril en 16 horas a una temperatura de 21°C con un 1% de inóculo fresco (Guerrero, 1997; Romero del castillo, R. Mestres, J. 2004.; Huggins, A., Sandine, W. 1984)

El crecimiento y la acidificación de las BAL y por lo tanto, una fermentación óptima, están relacionadas con su sistema proteolítico ya que necesitan una fuente adicional de aminoácidos, además de la fermentación de la lactosa que las caracterizan. Estos aminoácidos que necesitan son producto de la hidrólisis de la caseína de la leche (Dandoy, D., et al 2011.; Y. H. Hui, 2007).

Las únicas proteasas capaces de comenzar el deterioro de la caseína presente en la leche se encuentran en la pared celular bacteriana, los oligopéptidos resultantes de esta ruptura ingresan al interior celular para ser hidrolizados por las proteasas intracelulares. *Streptococcus thermophilus* tiene en su pared una proteinasa llamada PrtS, que en monocultivo, es esencial para su crecimiento en leche, aunque ésta presenta poca actividad enzimática (Savijoki K., Ingmer H., Varmanen, P. 2006; Dandoy, D., et al 2011; Y. H. Hui, 2007; Fernandez-Espla, M. D., et al, 2000; Courtin P., Monnet V., Rul F. 2002).

Este genotipo, está siendo ampliamente usado por la industria láctea por poseer muy buenas aplicaciones. En primer lugar los péptidos, aminoácidos y sus derivados, le dan a las leches fermentadas textura y sabor característicos. Su sistema proteolítico también es importante en la producción de leche con alto contenido protéico; en la producción de quesos por la aceleración de su maduración. La producción de péptidos bioactivos (derivados de la proteólisis de leches fermentadas), son de interés industrial, los cuales dependerán del microorganismo fermentador seleccionado (Dandoy, D., et al 2011; Baqueiro Peña, I. 2004; González-Olivares, L. G., et al 2011; Guerrero, 1997; Savijoki K., Ingmer H., Varmanen, P. 2006; Stuknyté, M. 2012).

Estos péptidos bioactivos pueden tener varias actividades biológicas como por ejemplo, ser inmunomodulantes, anti-cancerígenos, antimicrobianos, antioxidantes y reguladores del sistema nervioso central y de la actividad intestinal. Al momento los más estudiados son los que tienen propiedades anti-hipertensivas (González-Olivares, L. G., et al 2011; Stuknyté, M. 2012).

Los sistemas proteolíticos de las BAL se relacionan entre sí, mediante un fenómeno llamado cooperación, en el cual dos cepas interactúan de manera beneficiosa para ambas. Dos

microorganismos que experimentan protooperación nutricional son las BAL que constituyen el cultivo iniciador a partir del cual se elabora yogur: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, siendo ésta menor que cuando se cultivan por separado (Dr Adnan Tamime, 2006; Romero del castillo, R. Mestres, J. 2004; Courtin P., Monnet V., Rul F. 2002)

Producción de ácido láctico

El ácido láctico está clasificado por la FDA como un compuesto GRAS y es ampliamente utilizado en la industria, especialmente en la industria química, farmacéutica y alimentaria, usándose como un compuesto acidificante, conservador, buffer, saborizante capaz de incrementar la actividad de algunas sustancias antioxidantes. Se aisló por primera vez de la leche agría en 1780. Es producido industrialmente por dos vías; la química y la biotecnológica, esta última consiste en la fermentación de carbohidratos por parte de bacterias u hongos. Al utilizar bacterias, estas deben cumplir ciertos requisitos, dentro de los cuales está la rápida fermentación y crecimiento a pH bajo, por estas propiedades y otras más descritas anteriormente, las BAL son indicadas para la producción industrial de ácido láctico dentro de las que se encuentra *Streptococcus thermophilus*. En la producción biotecnológica de ácido láctico se pueden utilizar como sustratos sacarosa de caña de azúcar, lactosa del lactosuero y dextrosa procedente de almidón hidrolizado (Serna-Cock, L. 2005; Narayanan, N., Roychoudhury, P. K., & Srivastava, A, 2004).

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo fue aislar identificar y determinar propiedades tecnológicas de cepas autóctonas de *Streptococcus thermophilus* aisladas de leche cruda de diferentes especies animales.

Objetivos específicos

- 1) caracterizar fenotípicamente y bioquímicamente las colonias aisladas de leche cruda a 42°C.
- 2) caracterizar genéticamente los aislamientos seleccionados (PCR primer específicos de especie, ARDRA).
- 3) determinar la actividad acidificante de los fermentos preparados con la cepas seleccionadas
- 4) evaluar la producción de polisacáridos extracelulares (EPS) producidos por las cepas seleccionadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se analizaron 42 muestras de leche de vaca, cabra y oveja, provenientes de 6 establecimientos. En todos los casos las muestras obtenidas fueron tomadas en condiciones de asepsia, antes del ingreso al tanque de frío.

El procesamiento de las muestras de leche fue llevado a cabo en el Laboratorio de la Unidad de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Agronomía.

Tabla 1. Número de los aislamientos a partir de leche de vaca, oveja y cabra

Nº aislamientos	Animal de procedencia	Tambo
1-68	vaca	1,2,3
69-90	oveja	4,5
90-102	cabra	6

Aislamientos de bacterias ácido lácticas

Las muestras de leche se homogenizaron a 40° C y vortex antes de ser procesadas, y luego se realizaron diluciones seriadas en solución salina fisiológica (0.85% NaCl). Se incorporaron 1 mL de la dilución 1/100 al medio agar-leche-trifeniltetrazolio. Se incubaron a 42°C en velobiosis por 48h. Las colonias que al gram se teñían positivas, presentaban morfología de cocos con la disposición característica, se sembraron en caldo MRS (Man Rogosa Sharpe, Oxoid) y luego se purificaron al sembrarlas en agar M17. Se conservaron cada bacteria aislada en condiciones crioscópicas con glicerol al 15% en freezer a - 80° C.

Identificación de cepas Streptococcus thermophilus

Luego de la realización de la tinción de Gram y de la determinación de la morfología bacteriana se procedió a realizar las pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, tolerancia a la sal, producción de gas y fermentación de azúcares.

La prueba de catalasa se realizó en un portaobjeto con una gota de peróxido de hidrógeno al 30% y se emulsionó con una colonia aislada de agar MRS (Man, Rogosa, Sharpe, Oxoid) tomada con un palillo estéril. La reacción es positiva si se observa la producción de burbujas. En la prueba de oxidasa se utilizaron discos comerciales (BBL Taxo N Discs, Becton, USA). La reacción será positiva para oxidasa si vira de rosa a violeta intenso y en segundos al color negro, en el lugar de inoculación con un aplicador de madera.

En el caso de la tolerancia a la sal se incubaron las cepas en tubos con 10 mL caldo MRS con 6.5% de NaCl, por 72 h a 42 °C. La prueba es positiva si se observan características macroscópicas de crecimiento (turbidez), también se incubaron de igual manera tubos con caldo MRS sin NaCl ni inóculo como control negativo.

En el caso de los ensayos de fermentación de azúcares se utilizó el medio de cultivo descrito a continuación (3 mL de medio de cultivo por tubo), el cual tendrá como variante el azúcar para determinar la fermentación, como indicador de cambio de pH se utilizó rojo fenol (positivo=amarillo; negativo=rojo). El medio se esterilizó a 121° C por 15 minutos en autoclave y se le agregó filtrado (0.22 µm) la solución del carbohidrato seleccionado luego que se enfrió el medio de cultivo.

Los azúcares que se testearon fueron: maltosa, manitol, sacarosa, sorbitol, glicerol, manosa, galactosa, lactosa, rafinosa, glucosa, fructosa, trehalosa, y melibiosa. También se evaluó la producción de gas a partir de la glucosa en los tubos con el medio descrito con campanas de Durham invertidas

Los medios con los diferentes azúcares se distribuyeron en tubos, los cuales se inocularon con una colonia aislada de agar M17, dejando un tubo sin inocular como control negativo para cada azúcar. Se incubaron todos los tubos a 42 °C durante 72 horas haciendo una observación cada 24 hs para determinar la producción o no de ácido en comparación con el tubo control.

Luego de realizados los análisis anteriores se seleccionaron las siguientes cepas para proseguir el estudio: 52, 53, 56, 57 (la leche de vaca), 80, 84, 86 (leche de oveja) y 91, 92, 93, 94, 95, 101, 102 (leche de cabra).

Caracterización genotípica

Extracción de DNA genómico

Se seleccionaron 14 cepas que compartían características fenotípicas y bioquímicas con *Streptococcus thermophilus*. Para seguir con la identificación, se extrajo el ADN de estas cepas. Para la extracción del ADN de las mismas se utilizó un Kit comercial de DNA genómico (Fermentas International Inc. USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir de este punto se seleccionaron las cepas 53, 57, 80 (STH), para poder proseguir con los estudios citados tomando como cepa de referencia la número 986 (ATCC 19258) de acuerdo a los resultados de la pruebas bioquímicas previas. Se inocularon tubos con caldo M17 las cepas seleccionadas a partir de aislamientos puros y se incubaron a 42° C durante 48h. Se cosecharon las células a 10.000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga Spectrofuge 7M (Labnet International Inc., USA). Se determinó la concentración del DNA extraído utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific Incorporation, Wilmington, DE, USA), se alicuotó y se utilizaron como molde para las reacciones de amplificación.

Análisis por amplificación del gen *lacZ*

La identificación de las cepas seleccionadas se realizó a partir de la amplificación por PCR del gen *lacZ* usando primers especie específicos de *Streptococcus thermophilus* (Lick et al. 1996).

DNA genómico extraído por la reacción en PCR especie-específico del *gen lac Z* descrito por

Los primers utilizados fueron:

- Primer Sth1 (*lacZ-ST* for): CAC TAT GCT CAG AAT ACA
- Primer Sth2 (*lacZ-ST* rev): CGA ACA GCA TTG ATG TTA

Componente de Reacción	Volumen (µl)
Buffer	13,75
dNTP	2,75
MgCl ₂	13,75
Primer R	6,875
Primer F	6,875
Taq Polimerasa	1,1
H ₂ O destilada	64,9
ADN muestra	5

La reacción de PCR se realizó en un termociclador Corbett cG1-96 thermal cycler (Corbett Research, UK) con el siguiente programa: desnaturalización a 94°C por 3 min; 30 ciclos cada uno de 94°C por 30 seg; 54° C por 30 segundos y 72 °C por 30 seg; y un paso de extensión final 72°C durante 10 minutos (Lick et al., 1996).

Los productos de PCR y el marcador de peso molecular GeneRuler 100pb PLUS DNA Ladder (Fermentas Life Sciences) fueron visualizados mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% conteniendo 0.5 µg/mL de Good View (SBS Genetech Co. Ltd). La corrida electroforética se

realizó a 10 V/cm utilizando buffer 0.5X TBE (45 mM Tris-HCl, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA, pH 8). La banda amplificada se visualizó y fotografió en un transiluminador UV.

Identificación por ARDRA

Los aislamientos también se caracterizaron mediante la técnica de ARDRA (Amplified rDNA restriction Analysis). ARDRA es una técnica de “fingerprint”, que permite analizar el perfil de restricción del gen 16S rARN (Conter et al, 2005). En este estudio se utilizaron los aislamientos que fueron previamente seleccionados por amplificación del gen *lacZ*.

Los amplicones de 16S rARN fueron digeridos por reacción con 2U de la enzima de restricción *HhaI* (Biolabs, New England) e incubados a 37°C por 12h. Los perfiles de restricción fueron analizados en un gel de agarosa al 2% con buffer 0.5X TBE y conteniendo 0.5 µg/mL de Good View, corrido a 5 V/cm durante dos horas. El marcador de peso molecular utilizado fue GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder (Fermentas International Inc., USA), se sembraron 20 µL del producto de digestión por carril de las muestras a analizar y la cepa de referencia (ATCC 19258=986) y se visualizaron en un transiluminador UV.

Análisis de la secuencia del gen 16S rDNA

Los aislamientos seleccionados mediante la identificación por ARDRA fueron identificados mediante análisis de secuencia del gen rARN 16S. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µl conteniendo: 1X Thermo buffer (Fermentas, USA), 2,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada dNTP (Fermentas, USA), 1U Taq polymerase (Fermentas, USA), 0,2 mM de cada

cebador (fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3')) (Weisburg et al., 1991) y 20 ng de ADN molde. Los cebadores se utilizaron para amplificar un fragmento de 1540 pares de bases del gen del rARN 16S (Weisburg et al., 1991) y los productos de amplificación fueron purificados y secuenciados por MacroGen Sequencing Service, Korea. Las secuencias de DNA se compararon con las depositadas en la base de datos NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para la identificación de los aislamientos basados en la similitud de secuencias.

Evaluación de propiedades de interés tecnológico

Debido a la biodiversidad de la microbiota nativa existente en el ambiente lácteo, para diseñar un fermento destinado a la fabricación de productos lácteos, es necesario seleccionar cepas que posean las mejores propiedades de interés tecnológico y puedan competir con otras presentes en los “starters” utilizados con estos fines.

Las características que presentan las diferentes bacterias utilizadas como fermentos lácteos son múltiples, por lo que se requiere conocer diferentes cualidades que presenten cada cepa para poder ser utilizadas en la elaboración de productos.

En general los estudios de selección de cepas se consideran algunas de las propiedades de interés tecnológico:

1. Temperatura de cultivo
2. Acidificación
3. Actividad proteolítica
4. Producción de aroma
5. Producción de exopolisacáridos
6. Resistencia a fagos

En el presente estudio se evaluaron variantes rápidas y lentas, acidificación, cinética de crecimiento, producción de exopolisacáridos (EPS) y actividad proteolítica.

Acidificación

La selección de cultivos iniciadores en la industria láctea debe considerar la capacidad de los microorganismos de producir ácido láctico en el menor tiempo posible. Los cultivos se denominan “rápidos” o “activos” cuando, inoculados al 1% e incubados a la temperatura óptima, son capaces de coagular la leche en un período de 24 horas. Los cultivos “lentos” son aquellos que requieren más tiempo para que ocurra tal fenómeno.

Para determinar en los fermentos esta propiedad, se utiliza la prueba de actividad de Horall-Elliker, que evalúa la capacidad productora de ácido láctico bajo condiciones controladas, similares a las empleadas en las tinas de fermentación.

La temperatura de incubación en este caso fue de 42° C de acuerdo a los requerimientos óptimos para el crecimiento de *Streptococcus thermophilus*.

Medio de crecimiento:

1. Leche descremada reconstituida al 10%

Los tubos fueron esterilizados e incubados a 42 °C y luego se inocularon con 3% de cada cepa en estudio provenientes de un cultivo en caldo MRS con una turbidez correspondiente al tubo 0.5 de la escala Mac Farland. Se incubaron a 42 °C, y para cada bacteria se determinó el pH (HANNA, Instruments, Padova, Italia) en cada una de las muestras tomadas de los medios a las 3, 5 y 24 horas, el control negativo se realizó caldo MRS sin inóculo bacteriano.

La acidez titulable (Grados Dornic) con soda Dornic 0.1 N y fenoftaleína alcohólica 0.1% como indicador de acidez. La acidez titulable se expresa en grados Dornic, los cuales se calculan multiplicando por 10 el gasto de NaOH 0.1N (expresado en mL) necesario para el viraje del indicador.

Se tomaron muestras de 10 ml de cada tubo correspondiente a la hora 0 y 3 hs, se transfirieron a un vaso de Bohemia y se dejaron llegar a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C). Las determinaciones se realizaron por duplicado sobre la misma muestra preparada. Se le agregaron 5 gotas de la solución de fenolftaleína.

La titulación se realizó agregando lentamente y con agitación, la solución 0,1 N de hidróxido de sodio, justamente hasta conseguir un color rosado persistente (fácilmente perceptible si se compara con una muestra de leche) que desaparece lentamente pero que persista durante 30 s.

A las mismas muestras se determinó el pH de cada uno de los crecimientos a las 0 y 3hs.

Determinación de variantes rápidas y lentas

La determinación de la cinética microbiana de las BAL es muy importante en la industria láctea, en especial en la producción de quesos tanto artesanal como a nivel industrial. Esto se debe, a que la disminución rápida del pH de la cuajada inhibe el desarrollo de los microorganismos indeseables y facilita el desuerado (Morais, 2004), permitiendo la obtención de un excelente producto desde el punto de vista microbiológico y organoléptico.

Para la industria, un rasgo importante en las cepas que conformarán un cultivo iniciador es la producción de ácido láctico, y que ésta sea rápida. Aquellas cepas que produzcan ácido láctico rápidamente serán llamadas variantes rápidas y las cepas que lo hagan lentamente serán las variantes lentas. Con tal fin se utilizó el medio FSDA (Fast Slow Differential Agar) modificado.

Para la diferenciación de las variantes rápidas y lentas se realizaron diluciones seriadas decimales en solución salina fisiológica (SSF) (0.85% NaCl), partiendo de 100 µl de los cultivos “overnight” en leche UHT descremada estéril, distribuidos en tubos de 9.9 mL de volumen. Se

incubaron a 42°C por 16 hs. De cada dilución se sembraron por la técnica de incorporación al medio de cultivo FSDA que se prepara a partir de tres componentes, A, B y C.

Medio FSDA modificado:

Componente A:

- Agar 15 g
- Púrpura de Bromocresol 50 mg
- Agua Destilada 400 mL

Componente B:

- Leche en Polvo 100 g
- Agua destilada 400 mL

Componente C:

- Trifosfato de magnesio 5 g
- Agua Destilada 200 mL

Los componentes A, B y C se esterilizan en autoclave por separado, luego se mezclan las 3 soluciones y la se sirvió en placas de Petri.

La selección de variantes rápidas y lentas se realizó sembrando en la superficie del medio de cultivo descrito y se incubaron en microaerofilia durante 24 h a 42 °C.

En este medio de cultivo las variantes rápidas crecen como colonias rodeadas de un halo amarillo en el agar y las variantes lentas no producen tal viraje del medio luego de la incubación (Huggins, 1984).

Producción de exopolisacárido (EPS) (filancia)

Se seleccionaron las cepas productoras de EPS, a partir de las colonias con mayor producción de mucílago a partir de un medio sólido (MRS agar). Se inocularon tubos de LDR 10% (5ml), con 100µl de los cultivos provenientes de caldo MRS correspondientes a las cepas 53 y 57, STH, 4 tubos (1 tubo control sin inoculación) se incuban a 37 °C y 4 tubos a 42 °C. Se toma con pipeta 1 ml del inóculo en ambas condiciones de incubación y se observa la existencia de filancia al ser tocadas con un palillo estéril a las 24, 48 y 72 horas de incubación. También se visualizó en 0.1 mL de los cultivos a diferentes tiempos de incubación la viscosidad presente por el deslizamiento en una superficie de vidrio inclinado.

RESULTADOS Y DISCUSION

Identificación fenotípica y bioquímica de cepas de Streptococcus

La tinción de Gram y el estudio de motilidad, indican que los aislamientos seleccionados corresponden a bacterias Gram positivas (cocos aislados, en pares, y cadenas cortas y largas) y motilidad negativa. En la Tabla 1. se detallan los resultados de diferentes pruebas bioquímicas citadas en materiales y métodos.

Las cepas seleccionadas como presuntas bacterias pertenecientes a *Streptococcus thermophilus* son todas catalasa negativa y son incapaces de crecer en medio de cultivo con 6.5% de NaCl. Esta última técnica nos permite diferenciar bacterias ácido lácticas termofílicas de las bacterias pertenecientes al género *Enterococcus* (Botina, et al., 2006). Los análisis de los resultados en

relación a la caracterización bioquímica de las cepas en estudio concuerdan con las bacterias pertenecientes a la especie *Streptococcus thermophilus*.

Los estudios de diversidad intraespecie de *Streptococcus thermophilus* a partir de las diferentes pruebas bioquímicas citadas, y sobre todo las relacionadas con la fermentación de azúcares, no nos permite establecer con exactitud la identificación de nuestros aislamientos como pertenecientes a esta especie bacteriana sin complementar la información obtenida con diferentes técnicas de caracterización genética.

En general *Streptococcus thermophilus* utiliza como fuente de carbono a lactosa, glucosa y sacarosa. La cepa control ATCC 19258 (986) fermenta lactosa, glucosa, sacarosa y fructosa. En la Tabla 1. se observa que la mayoría de las cepas (13 bacterias) en estudio fermentan glucosa (52, 53, 56, 57, 80-STH, 84, 86, 92, 93, 94, 101, 102, control), seis cepas no utilizan la sacarosa (52, 56, 86, 92, 95, 102), la lactosa es fermentada por todos los aislamientos y la fructosa es fermentada por diez bacterias (52, 53, 57, 80, 84, 86, 94, 101, 102, control).

Las cepas que fermentan maltosa son cuatro (52, 86, 91, 94), manosa son cinco (52, 56, 84, 86, 95), rafinosa son ocho (52, 56, 86, 91, 93, 94, 101, 102), trehalosa son tres (52, 86, 93) y ninguna fermenta manitol, sorbitol, glicerol, melibiosa.

No producen gas a partir de glucosa debido a que esta especie es homofermentativa.

Tabla1. Pruebas bioquímicas de los aislamientos presumiblemente pertenecientes al género *Streptococcus*.

Aislamiento	Catalasa	Crecimiento con 6.5 NaCl	Gas a partir de glucosa	Fermentación de maltosa	Fermentación de Manitol	Fermentación de D-sacarosa	Fermentación de sorbitol	Fermentación de glicerol	Fermentación de D-manosa	Fermentación de D-galactosa	Fermentación de Lactosa	Fermentación de D-rafinosa	Fermentación de glucosa	Fermentación de D-fructosa	Fermentación de trehalosa	Fermentación de melibiosa	Fermentación de la esculina
52	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
53	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-
80 STH	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
84	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
86	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-
91	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
92	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
93	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-

94	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
95	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
101	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
986 ATCC 19258	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-

De las catorce bacterias seleccionadas, sólo 4 cepas pueden fermentar galactosa, es importante señalar que las especies de *Streptococcus thermophilus* virtualmente no tienen actividad sobre esta azúcar. El exceso de galactosa en los productos lácteos pueden tener efectos adversos en la salud humana, especialmente en casos de galactosemia y pudiendo producir la reacción Maillard por el efecto térmico (Novelli et al., 2000).

La identificación basada en la fermentación de azúcares como fuente de carbono demuestra dificultades para determinar según este criterio la clasificación de los aislamientos como pertenecientes a la especie *Streptococcus thermophilus*. Se debe considerar la presencia de cepas atípicas y que puedan confundirse con otras bacterias ácido lácticas.

La fermentación de esculina es una de las pruebas más efectivas para identificar *Streptococcus thermophilus* (no fermenta esculina) diferenciándose de *Enterococcus* y otras especies relacionadas como *Streptococcus salivarius* que fermentan esculina (Facklam, R.R. 2002).

Identificación genética de cepas de *Streptococcus thermophilus*

Análisis por amplificación del gen *lacZ*

La identificación de las cepas seleccionadas mediante criterios bioquímicos, se realizó con la reacción en PCR especie-específico del gen *lacZ*. En la Figura 1, la banda de la amplificación del DNA con el cebador específico se observa a 968 pb para las cepas 53, 57, STH (80) lo cual coincide con la cepa de referencia de *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258 (cepa 986).

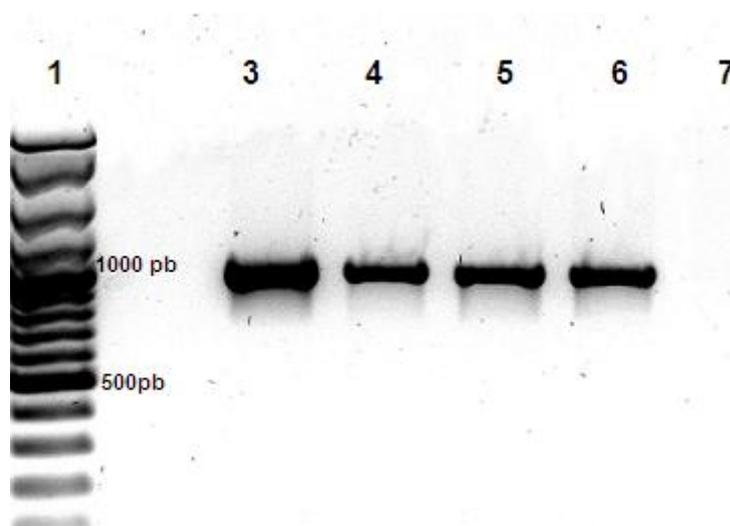


Figura 1. Amplicón obtenido utilizando cebadores *lacZ-STfor-lacZ-STrev*. Carriles: (1) marcador de peso molecular; (3) Cepa 53; (4) cepa 57; (5) cepa referencia *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* ATCC 19258; (6) cepa STH (80); (7) cepa 56.

De los 14 aislamientos, solo tres cepas nativas se lograron amplificar mediante PCR con primer específico del gen *lacZ* (provenientes de leche de vaca y oveja)

La utilización de este cebador como herramienta para la identificación de *Streptococcus thermophilus* de los aislamientos nativos de leche ha permitido realizar un “screening” rápido de las cepas presuntivas pertenecientes a esta especie luego de la seleccionadas de acuerdo a la caracterización bioquímica.

Identificación de los aislamientos seleccionados por ARDRA

En la Figura 2 se presentan los perfiles característicos de ARDRA para los aislamientos citados previamente obtenidos por los cebadores *lacZ-STfor-lacZ-STrev*. El gel de agarosa que se observa agrupa los perfiles de los aislamientos al compararse con la cepa de referencia *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258

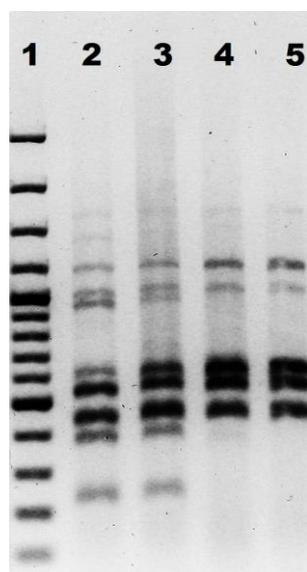


Figura 2. Perfiles de ARDRA con enzima *HhaI*. Carriles: (1) marcador de peso molecular; (2) Cepa referencia *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ATCC 19258; (3) cepa STH (80); (4) cepa 53; (5) cepa 57.

En el presente trabajo se procesaron 14 aislamientos de bacterias presuntamente pertenecientes a la especie *Streptococcus thermophilus* de las cuales sólo se confirman por las técnicas genéticas previamente descripta sólo 3 de los aislamientos. En la Figura 2 se observan 2 perfiles ARDRA pertenecientes a *Streptococcus thermophilus*, lo cual puede indicar la variabilidad dentro de la misma especie bacteriana. Las cepas denominadas como 53 y 57, se diferencian de la STH (80) y ATCC de acuerdo a la caracterización bioquímica que fermentan a la galactosa mientras que las dos últimas no la fermentan.

De acuerdo a los análisis de los datos hasta este punto, debemos citar que se partieron de 102 aislamientos de leche de diferentes especies animal con características de cocos Gram positivas, catalasa negativa y a partir de allí se comenzaron a discriminar para realizar la caracterización fenotípica y bioquímica de 14 aislamientos.

La caracterización genética permitió realizar la selección sólo de 3 aislamientos al comparar los perfiles de amplicones por diferentes técnicas moleculares. Es importante resaltar que el aislamiento de cepas de *Streptococcus thermophilus* nativas de la cadena láctea es baja y en el presente trabajo representó 21% a partir de la caracterización fenotípica y bioquímica.

Las técnicas de genética molecular son herramientas de gran apoyo para la microbiología, ya que las técnicas rutinarias de identificación para las BAL sólo por la caracterización fenotípica y bioquímica no permitió la discriminación certera de *Streptococcus thermophilus*.

Identificación de los aislamientos mediante análisis de la secuencia 16S rADN de los aislamientos

Los perfiles de amplificación citados previamente permitieron la identificación de aislamientos nativos de leche *Streptococcus thermophilus* las cepas 53, 57 y STH (80) los cuales fueron confirmados por análisis de secuencia del gen 16S rADN con similitud > 98%.

La identificación polifásica de las cepas de *Streptococcus thermophilus* provee mayor seguridad para determinar las especies de este género, lo cual ayuda a esclarecer la identificación de las mismas debido a los problemas inherentes a la variación genética de las cepas nativas a nivel genético.

Analisis de propiedades de interes Tecnologico

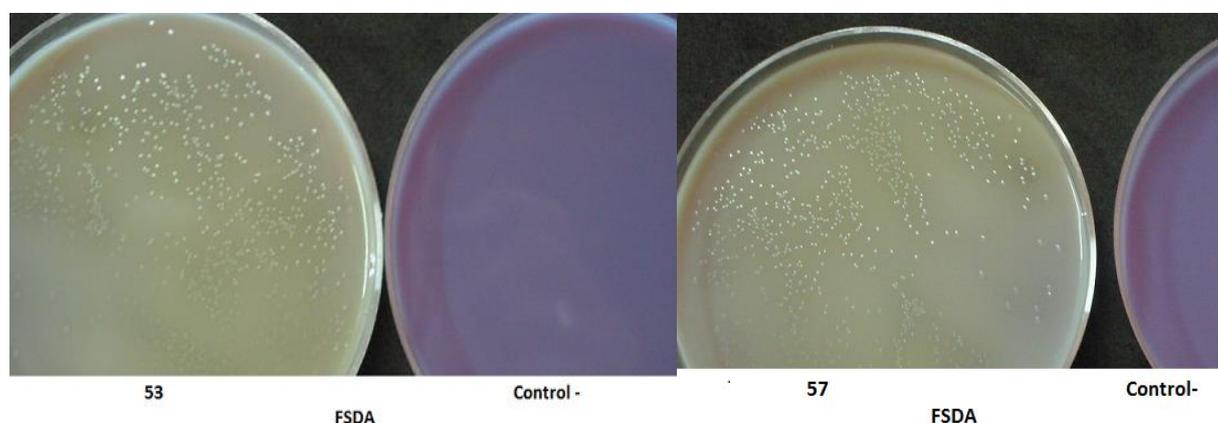
Determinación Variantes rápidas y lentas

El indicador del medio FSDA (púrpura de bromocresol) tiene un viraje entre 5.2 y 6.8 unidades de pH, virando al amarillo a pH más ácido y al púrpura al más básico. Las variantes rápidas presentan colonias con actividad proteolítica y crecen amarillas por el aumento de la acidez en el medio de cultivo, son grandes y opacas rodeadas de un halo amarillento; mientras que las variantes lentas forman colonias pequeñas, chatas y translúcidas. En la Tabla 2 se detallan los resultados para cada cepa en estudio.

Tabla 2. Resultados del test de variantes rápidas y lentas

CEPA	MORFOLOGÍA COLONIAS
53	Viraje del medio FSDA a amarillo
57	Viraje del medio FSDA a amarillo
STH	Viraje del medio FSDA (< amarillo)

En la Figura 3 se visualiza que después de la incubación de las cepas 53 y 57 se observa un viraje del indicador a ácido y las colonias presentan una morfología que se corresponde con el fenotipo de acidificación rápida, mientras que la cepa STH (80) es más lenta en la acidificación



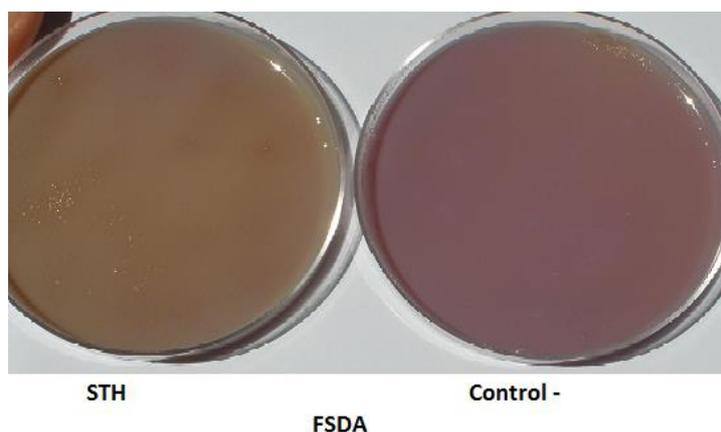


Figura 3. Determinación de variantes rápidas y lentas en medio de cultivo sólido FSDA con púrpura de bromocresol. Cambio de color a amarillo (cepas rápidas) 53 v 57. cepa lenta STH (80).

Actividad acidificante y acidez titulable

Las leches normales, tienen valores de acidez de 15 °D a 18°D , y conforme la leche sea acidificada el valor de la acidez titulable aumenta la acidez titulable también puede expresarse como porcentaje de ácido láctico producido, el cual se obtiene de la relación:

$$\% \text{ Acido Láctico} = \text{Acidez tit. } ^\circ\text{D}/100$$

En la Tabla 3. Se detallan las variaciones de pH de las cepas en estudio con el control y se observa una disminución en el pH para las mismas. A su vez se registra un aumento en la acidez titulable del inóculo al usar las cepas aisladas en relación al control no inoculada. La cepa STH (80) desarrolla menos acidez en 3 hs que las 53 y 57. En las tinas queseras esta propiedad es importante por el tiempo que demora la baja de pH durante la cuajada y antes del desuerado

Tabla3. Resultados de la actividad acidificante y acidez titulable en leche.

Cepa	pH Hora 0	Acidez titulable (°D) 0 Hs	% Ac. Láctico
53	6,66	16	0,16
57	6,68	16	0,16
STH	6,66	16	0,16
Control sin bacterias	6,68	15	0,15

Cepa	pH Hora 3	Acidez titulable 3 Hs	% Ac. Láctico
53	6,03	21	0,21
57	6,15	20	0,20
STH	6,29	19	0,19
Control sin bacterias	6,68	15	0,15

Producción de exopolisacárido (filancia)

Las cepas con mayor producción de EPS seleccionadas para el análisis fueron las denominadas como: 53, 57, STH (80).

En la Tabla 4 se observan los resultados de producción de exopolisacáridos (EPS) producidos en cultivos de 72 hs en LDR a 37° C y 42° C.

Tabla 4. Determinación de producción de exopolisacárido por filancia

CEPA	24hs	48hs	72hs	Temperatura °C
53	++	++	++	37
57	++	++	++	37
STH	+	+	+	37
Control sin bacterias	-	-	-	37
53	++	++	++	42
57	++	++	++	42
STH	+	+	+	42
Control sin bacterias	-	-	-	42

En la Figura 4. Se evidencia que a las 24 horas la presencia o producción de EPS lo suficientemente necesaria para volver viscosa a la leche inoculada con las cepas 53 y 57 a ambas temperaturas de incubación, lo que confirma los resultados que se visualizan en la Tabla 4.

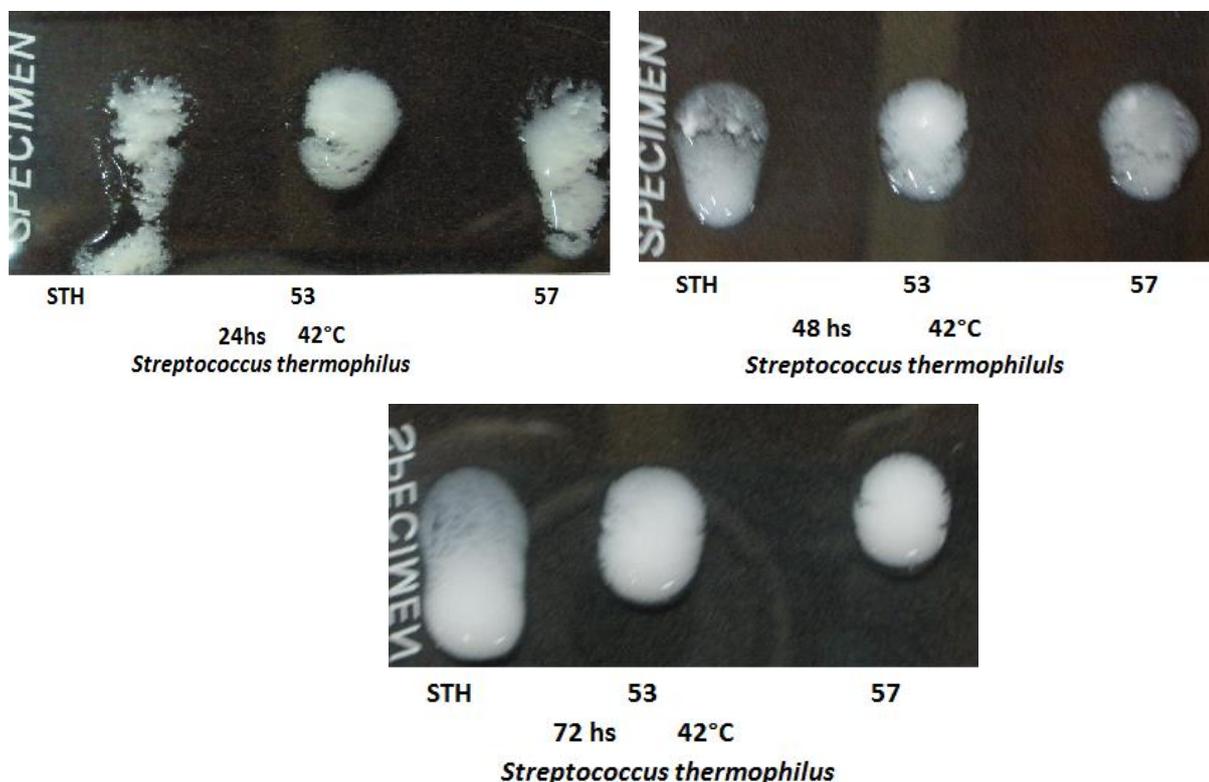


Figura 4. Determinación de viscosidad de los aislamientos 53, 57 y STH (80) crecidas en LDR 10% en 0.1 mL de muestra por deslizamiento en vidrioopor 72 hs a 42° C.

La industria láctea busca cepas de *Streptococcus thermophilus* productoras de EPS, las cepas comerciales son seleccionadas por esta propiedad ya que se utilizan para la producción de yogures con texturas más cremosas y con menor sinéresis por la presencia del EPS.

Conclusiones

Las cepas seleccionadas aisladas de leche de vaca, oveja y cabra, como presuntas bacterias pertenecientes a *Streptococcus thermophilus* presentan al gram morfología de cocos, dispuestos cadenas, que se tiñen positivamente, catalasa negativa e incapaces de crecer en medio de cultivo con 6.5% de NaCl. Esta última técnica nos permite diferenciar bacterias ácido lácticas termofílicas de las bacterias pertenecientes al género *Enterococcus*.

En general *Streptococcus thermophilus* utiliza como fuente de carbono a lactosa, glucosa y sacarosa. La cepa control ATCC 19258 (986) fermenta lactosa, glucosa, sacarosa y fructosa.

La mayoría de las cepas (14 bacterias) en estudio fermentan glucosa (52, 53, 56, 57, 80-STH, 84, 86, 92, 93, 94, 101, 102, control), seis cepas no utilizan la sacarosa (52, 56, 86, 92, 95, 102), la lactosa es fermentada por todos los aislamientos y la fructosa es fermentada por diez bacterias (52, 53, 57, 80, 84, 86, 94, 101, 102, control).

No producen gas a partir de glucosa debido a que esta especie es homofermentativa.

De las catorce bacterias seleccionadas, sólo 4 cepas pueden fermentar galactosa, es importante señalar que las especies de *Streptococcus thermophilus* no la fermentan en su mayoría y es una alternativa tecnológica en la elaboración de productos lácteos para evitar la presencia de galactosa.

La identificación de las cepas seleccionadas es realizada mediante la amplificación por PCR del gen lacZ. La banda de amplificación del ADN con el cebador específico se observa a 968 pb para las cepas 53, 57, STH (80) que coinciden con la cepa de referencia de *Streptococcus thermophilus* ATCC 19258 (cepa 986).

La utilización de este cebador como herramienta para la identificación de *Streptococcus thermophilus* de los aislamientos nativos de leche ha permitido realizar un "screening" rápido de las cepas presuntivas pertenecientes a esta especie luego de la seleccionadas de acuerdo a la caracterización bioquímica.

La técnica ARDRA permitió detectar de los aislamientos amplificados por PCR de bacterias presuntivas *Streptococcus thermophilus*, 3 (53, 57, 80) de los aislamientos que presentan perfiles similares a la cepa de referencia ATCC 19258.

La caracterización genética permitió realizar la selección sólo de 3 aislamientos al comparar los perfiles de amplicones por diferentes técnicas moleculares, es importante resaltar que el aislamiento de cepas de *Streptococcus thermophilus* nativas de la cadena láctea es baja y en el presente trabajo representó 21% a partir de la caracterización fenotípica y bioquímica. Se confirmaron las 3 cepas como pertenecientes al género buscado por secuenciación del 16S rDNA.

Las cepas que fueron seleccionadas como variantes rápidas en FSDA fueron las 53 y 57 que produjeron viraje en el indicador de pH a ácido en 24 horas incubadas a 42° C.

En relación a la acidez titulable y cambio de pH, la cepa STH (80) desarrolla menos acidez en 3 hs que las 53 y 57 en LDR. En las tinas queseras esta propiedad es importante por el tiempo que demora la baja de pH durante la cuajada y antes del desuerado.

La producción de exopolisacáridos se determinó a las 24 horas en los tubos LDR para las cepas 53 y 57 a ambas temperaturas de incubación.

Existe una gran variabilidad fenotípica y sería importante buscar cepas de este género productoras de EPS y también fermentadoras de galactosa. En este trabajo se han aislado dos cepas de *Streptococcus thermophilus* 53 y 57 nativas de leche con estas especificaciones, lo cual pueden ser cepas prometedoras para realizar estudios más profundos en el área y ser utilizadas como fermentos o “starters” en la elaboración de productos lácteos.

ANEXO 1. COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVO

MRS caldo (g/L)	
Peptona	10
Extracto de carne	8
Monoleato de sorbitán	1mL
Extracto de levadura	4
Glucosa	20
Fosfato dipotásico	2
Acetato de sodio	5
Citrato de amonio	2
Sulfato de magnesio	0,2
Sulfato de manganeso	0,05

M17 Agar (g/L)	
Digerido pancreatico de caseina	5
Peptona de Soja	5
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	2,5
Acido ascórbico	0,5
Sulfato de magnesio	0,25
β -glicerofosfato disodico	0,25
Agar	11

Medio Prueba Azucares (g/L)	
Triptona	10
NaCl	5
Rojo Fenol	0,018
Azúcar en estudio	0,5-1%

BIBLIOGRAFIA

1. Adams, M. R., O moss, M. (2007). Food microbiology. Cambridge, UK: RSC publishing
2. Alais, Ch.. (2003). Ciencia de la leche. Principios de la técnica lechera. Barcelona, España: Reverté S.A. Pág. 337,346-347, 393
3. Alvarado Rivas, C., Chacón Rueda, Z., Otoniel Rojas, J., Guerrero Cárdenas, B., & López Corcuera, G. (2007). Aislamiento, Identificación y Caracterización de Bacterias Ácido Lácticas de un Queso Venezolano Ahumado Andino Artesanal. Su Uso Como Cultivo Iniciador. *Revista Científica*, 17(3), 301-308.
4. Auclair, J., & Accolas, J. P. (1983). Use of thermophilic lactic starters in the dairy industry. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49(3), 313-326.
5. Baqueiro Peña, I. I. (2004) Determinación de la actividad proteolítica de bacterias utilizadas como probióticos presentes en leches fermentadas especiales. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Mexico.
6. Battcock, M. Azam-Ali, S. (1998). Fermented Fruits and Vegetables. A Global Perspective. *FAO Agricultural Services Bulletin* , 134, 1010-1365.
7. Beasley, S. (2004). Isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota (Doctoral dissertation, University of Helsinki).
8. Bedolla, S., Dueñas, C. (2004). Introducción a la tecnología de los alimentos. Mexico: Limusa Noriega Editores.
9. Botina, S. G., Trenina, M. A., Tsygankov, Y. D., & Sukhodolets, V. V. (2007). Comparison of genotypic and biochemical characteristics of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from sour milk products. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43(6), 598-603.
10. Broadbent, J. R., McMahon, D. J., Welker, D. L., Oberg, C. J., & Moineau, S. (2003). Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review. *Journal of dairy science*, 86(2), 407-423.
11. Brennan, E., & Reginensi, S. (2001). Aislamiento, identificación y estudio de características de interés tecnológico de bacterias ácido lácticas nativas de leche pertenecientes a la familia Streptococcaceae. *F. Agro., U. delaR.*
12. Bylund, G. (2003). *Manual de industrias lácteas*. Madrid, España. Mundi Prensa Libros SA.
13. Carr, FJ, Chill, D., y Maida, N. (2002). Las bacterias de ácido láctico.: Una encuesta literatura *comentarios críticos en microbiología* , 28 (4), 281-370
14. Chang, S. K., & Hassan, H. M. (1997). Characterization of superoxide dismutase in *Streptococcus thermophilus*. *Applied and environmental microbiology*, 63(9), 3732-3735.
15. Cock, L. S., & de Stouvenel, A. R. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte. *Ciencia y tecnología alimentaria: Revista de la Asociación de Licenciados en Ciencia y Tecnología de los Alimentos de Galicia*, 5(1), 54-65.
16. Courtin, P., Monnet, V., & Rul, F. (2002). Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus*/*Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology*, 148(11), 3413-3421.
17. Dandoy, D., Fremaux, C., de Frahan, M. H., Horvath, P., Boyaval, P., Hols, P., & Fontaine, L. (2011). The fast milk acidifying phenotype of *Streptococcus thermophilus* can be acquired by natural transformation of the genomic island encoding the cell-envelope proteinase PrtS. *Microb Cell Fact*, 10(Suppl 1), S21.
18. Delorme, C., Bartholini, C., Bolotine, A., Ehrlich, S. D., & Renault, P. (2010). Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population. *Applied and environmental microbiology*, 76(2), 451-460.
19. De Vuyst, L. (2000). Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technology and Biotechnology*, 38(2), 105-112.

20. DIEA Anuario Estadístico Agropecuario 2013. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Uruguay
21. D'Mello, J. P. G. (2004). Microbiology of Animal Feeds . FAO Animal Production and Health, 160, 89-105.
22. Domínguez, J., Martínez, L. P., Rivera, P., Rodríguez, G., & García-Garibay, M. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DEL EXOPOLISACÁRIDO PRODUCIDO POR *Lb. delbrueckii* ss. *bulgaricus* NCFB 2772 SOBRE PROPIEDADES REOLÓGICAS DE PRODUCTOS LACTEOS. Mexico.
23. Domínguez - Soberanes, J., García - Garibay, M., Casas - Alencáster, N. B., & Martínez - Padilla, L. P. (2001). Instrumental texture of set and stirred fermented milk. Effect of a ropy strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and an enriched substrate. *Journal of texture studies*, 32(3), 205-217.
24. Early, R.. (1998). Technology of Dairy Products. London, UK.: Blackie Academic & professional
25. Fellows, P., & Hampton, A. (1992). Small-scale food processing: a guide to appropriate equipment. Intermediate Technology Publications.
26. Fernandez-Espla, M. D., Garault, P., Monnet, V., & Rul, F. (2000). Streptococcus thermophilus cell wall-anchored proteinase: release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Applied and environmental microbiology*, 66(11), 4772-4778.
27. Folkenberg, D. M., P. Dejmek, A. Skriver, and R. Ipsen. 2005. Relation between sensory texture properties and exopolysaccharide distribution in set and in stirred yoghurts produced with different starter cultures. *Journal of Texture Studies* 36(2):174-189.
28. Fox, M. K., S. Pac, B. Devaney, and L. Jankowski. 2004. Feeding infants and toddlers study: what foods are infants and toddlers eating? *Journal of the American Dietetic Association* 104(Supplement 1):22-30.
29. Fox, P. F. (2000). *Fundamentals of cheese science*. Springer Science & Business Media. Pág. 83, 344.
30. FSANZ. 2003. Australia New Zealand Food Standards Code. Vol. Standard 2.5.3. C. O. Australia, ed. Food Standards Australia and New Zealand.
31. García Garibay, M. Quintero Ramírez, R. López-Munguía Canales, A.. (1993). Biotecnología Alimentaria. Mexico: Limusa Noriega Editores.
32. Goh, Y. J., Goin, C., O'Flaherty, S., Altermann, E., & Hutkins, R. (2011). Specialized adaptation of a lactic acid bacterium to the milk environment: the comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* LMD-9. *Microb Cell Fact*, 10(Suppl 1), S22.
33. González-Olivares, L. G., Jiménez-Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., & García-Garibay, M. (2011). Liberación de péptidos bioactivos por bacterias lácticas en leches fermentadas comerciales. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(2), 179-188
34. Guerrero, L., Muset, G., & Pacheco, L. (1997). Evaluación de las actividades enzimáticas de cultivos comerciales usados para la elaboración de quesos. *Revista Científica*, 7(3).
35. Guarner, F., G. Perdigon, G. Corthier, S. Salminen, B. Koletzko, and L. Morelli. 2005. Should yoghurt cultures be considered probiotic? *British Journal of Nutrition* 93(6):783-786.
36. Hassan, A. N., Frank, J. F., Schmidt, K. A., & Shalabi, S. I. (1996). Rheological properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. *Journal of Dairy Science*, 79(12), 2091-2097.
37. Hernández, A. et al. (2003). Microbiología Industrial. San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia.

38. Herrera, E. A. C. (2006) Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica.
39. Hess y col. 1997
40. Huggins, A. R., & Sandine, W. E. (1984). Differentiation of fast and slow milk-coagulating isolates in strains of lactic streptococci. *Journal of Dairy Science*, 67(8), 1674-1679.
41. Hui, Y. H. (2012). Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology. NY, USA: CRC Press.
42. Hutkins, R.W.. (2006). Microbiology and Technology of Fermented Foods. Oxford, UK: Blackwell Publishing.
43. Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S., & von Wright, A. (Eds.). (2011). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. CRC Press.
44. Law, B. A. (1997). Microbiology and Biochemistry of cheese and fermented milk. Tullamore, Ireland: Blackie Academic & Professional.
45. Law, B. A., Tamime, T. Y. (2010). Technology of Cheesemacking. Londres, UK: Wiley-Blackwell
46. Low, D., Ahlgren, J. A., Horne, D., McMahon, D. J., Oberg, C. J., & Broadbent, J. R. (1998). Role of Streptococcus thermophilus MR-1C capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(6), 2147-2151.
47. Mora, D., et al. Genetic diversity and technological properties of Streptococcus thermophilus strains isolated from dairy products. *Journal of applied microbiology*, 2002, vol. 93, no 2, p. 278-287.
48. Moulay, M., Aggad, H., Benmechernene, Z., Guessas, B., Henni, D. E., & Kihal, M. (2006). Cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and their proteolytic activity. *World J. Dairy & Food Sci*, 1, 12-18.
49. Narayanan, N., Roychoudhury, P. K., & Srivastava, A. (2004). L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic journal of Biotechnology*, 7(2), 167-178.
50. Parra Huertas, R. A. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93-105.
51. Quirós, A., Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Amigo, L., & Recio, I. (2005). Angiotensin-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from caprine kefir. *Journal of dairy science*, 88(10), 3480-3487.
52. Ramírez, J., Ulloa, P. R., Velázquez, M. Y., González, J. A. U., & Romero, F. A. (2011). Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente Año*, 2(7).
53. Ramírez, M. (2005). *Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos* (Doctoral dissertation, Tesis Licenciado Químico en Alimentos).[Pachuca de Soto, México] Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo).
54. Reinheimer, J., & Zalazar, C. (2006). Avances en microbiología, bioquímica y tecnología de quesos. pág .245. *Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe. Argentina*.
55. Romero del Castillo, R., Mestres Lagarriga, J. (2004). Productos Lácteos. Tecnología. Ediciones UPC: Univ. Politèc. de Catalunya, España.
56. Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4), 394-406.
57. Sieuwerts, S., Molenaar, D., van Hijum, S. A., Beerthuyzen, M., Stevens, M. J., Janssen, P. W., ... & van Hylckama Vlieg, J. E. (2010). Mixed-culture transcriptome analysis reveals the molecular basis of mixed-culture growth in Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus. *Applied and environmental microbiology*, 76(23), 7775-7784.

58. Siezen, R. J., Kok, J., Abee, T. and Schaafsma, G. (2002). Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications. Foundation Antoine van Leeuwenhock, 82, 1.
59. Sweeney, P. L. H; Fox, P. F. (2010). Advanced Dairy Chemistry: Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents, Volumen 3. NY, USA: Springer
60. Tamime, A. Y.. (2006). Fermentes Milks. Oxford, UK: John Wiley & Sons.
61. Vadeboncoeur, C., & Moineau, S. (2004). The relevance of genetic analysis to dairy bacteria: building upon our heritage. *Microbial cell factories*, 3(1), 15.
62. Vaningelgem, F., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Vancanneyt, M., Swings, J., & De Vuyst, L. (2004). Biodiversity of exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* strains is reflected in their production and their molecular and functional characteristics. *Applied and environmental microbiology*, 70(2), 900-912.
63. Vasiljevic, T. and N. P. Shah. 2007. Fermented milk - Health Benefits Beyond Probiotic Effect. Pages 99-116 in Handbook of Food Products Manufacturing. Vol. 2. Y. H. Hui, ed. John Wiley & Sons.
64. Vinderola, C. G., J. Duarte, D. thangavel, G. Perdigon, E. Farnworth, and C. Matar. 2005. Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research* 72 (2): 195-202
65. Welman, A. D. and I. S. Maddox. 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and callenges. *Trends in Biotechnology* 21(6):269-274
66. Wicken, A. J., A. Ayres, L. K. Campbell, and K. W. Knox. 1983a. Effect of growth condition on production of rahnose-containing cell wall and capsular polysaccharides by strains of *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus* *Journal of bacteriology* 153:84-92.
67. Zisu, B. and N. P. Shah. 2005b. Textural and functional changes in low-fat Mozzarella cheeses in relation to proteolysis and microstrucure as influenced by the use of fat replacers, pre-acidification and EPS starter. *International Dairy Journal* 15 (6-9): 957-972.
68. Ciencia y tecnologia de los alimentos. Vol. 19, N° 3, 2009. Instituto de Investigaciones para la Industria Alimentaria, Ciudad de La Habana, Cuba