





Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas

Lactobacillus bulgaricus
en fermentos para yogur

Analía Graciela Abraham

Tesis

1992

El presente trabajo de tesis, para optar al grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas, fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas, bajo la dirección de las Dras. Graciela De Antoni y María Cristina Añón.

*La nube ignora
por qué se desplaza
en una determinada dirección, y a una
velocidad específica,*

*Siente un impulso... ése es
el rumbo del momento.*
*Pero el cielo conoce
las razones y las configuraciones
que hay detrás de todas las nubes,
y tú también las conocerás
cuando te eleves a la altura indispensable
para ver más allá de
los horizontes.*

Richard Bach.

*a Fernando,
a Leandro y Agustina,
a mis padres*

Mi agradecimiento

a la Facultad de Ciencias Exactas por la formación básica que me brindó,

a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por haberme otorgado las becas que me permitieron emprender y desarrollar este trabajo,

a las Dras. Graciela De Antoni y María Cristina Añón por su dedicación, estímulo y apoyo constante durante la realización de esta tesis,

a la Sra. Lucía Brandi por su apoyo técnico,

a la Dra. Alicia Chaves por su asesoramiento en el tratamiento estadístico de los datos,

al Ing. Néstor Serena y a José Luis Alonso del Laboratorio de Electrónica del CIDCA por su eficiencia en la reparación y diseño de equipos,

al Dr. Pablo Pérez por su amistad y colaboración en la discusión de resultados,

al Sr. Arturo Colavita por su colaboración en la realización de las fotografías,

al CERELA por facilitarme sus cepas y el acceso a su biblioteca,

a Unión Gandarense SACIA por proveerme de la leche para la realización de los experimentos,

a la Calculista Cecilia Mazuca por su paciente asesoramiento en el área de informática,

al Dr. Aníbal Disalvo por la lectura crítica de los manuscritos de los trabajos publicados,

a la Sra. Silvia A. Moya por su dedicación y esmero en el mecanografiado de esta tesis,

a mis familiares y amigos que me alentaron durante este período,

a todos mis compañeros de trabajo que de alguna manera contribuyeron a la realización de esta tesis.

INDICE

	Página
1. INTRODUCCION	
1.1. Leche. Materia prima para la elaboración de yogur	1
1.2. Yogur: una alternativa para conservar la leche	2
1.3. Aspectos nutricionales del yogur	4
1.4. Microbiología del yogur	5
1.4.1. Características morfológicas y metabólicas de <i>Streptococcus salivarius</i> subespecie <i>thermophilus</i>	7
1.4.2. Características morfológicas y metabólicas de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subespecie <i>bulgaricus</i>	7
1.5. Actividad proteolítica de fermentos lácticos	10
1.6. Actividad proteolítica de bacterias del yogur.	12
1.7. Conservación de microorganismos	14
 OBJETIVOS	 18
 2. MATERIALES Y METODOS	
2.1. Cepas	19
2.2. Medios de cultivo	19
2.3. Coloraciones	23
2.4. Aislamiento de cepas de <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	24
2.5. Tipificación de las colonias aisladas	24
2.6. Cinéticas de crecimiento en medio de cultivo	25
2.7. Cinéticas de crecimiento en leche	26
2.8. Determinación del crecimiento bacteriano en leche por medida de A_{480nm}	26
2.9. Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC/ml)	26
2.10. Determinación de acidez	27
2.11. Test de actividad	27
2.12. Determinación de la actividad proteolítica	27
2.12.1. Dosaje del incremento de tirosina TCA soluble de cultivos en leche	27
2.12.2. Determinación de la actividad proteolítica específica	28
2.12.2.1. Extracción de las bacterias del cultivo en leche	28
2.12.2.2. Determinación de la actividad proteolítica por medida de nitrógeno TCA soluble	29
2.12.2.3. Análisis de la actividad proteolítica de distintas fracciones caseínicas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida	29
2.12.2.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida Descripción del gel y soluciones empleadas	30
2.13. Estudio de la actividad proteolítica durante distintas fases y condiciones de crecimiento	34
2.14. Congelación de bacterias	35
2.15. Tratamiento estadístico	36

3-5. RESULTADOS Y DISCUSION	
3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS DE <i>Lactobacillus bulgaricus</i> . ESTUDIO DEL DESARROLLO EN MEDIO Y EN LECHE	
3.1. Consideraciones generales	37
3.2. Aislamiento e identificación de <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	38
3.3. Caracterización de las cepas aisladas	40
3.4. Características de crecimiento de las cepas aisladas	45
3.4.1. Cinéticas de acidificación en leche	50
3.4.2. Crecimiento de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> en leche	54
3.4.3. Cinéticas de crecimiento en medio de cultivo	54
3.5. Actividad proteolítica	60
4. ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	
4.1. Consideraciones generales	64
4.2. Evaluación de la actividad proteolítica de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> LBB por incremento de tirosina durante el crecimiento bacteriano	66
4.2.1. Cinéticas de crecimiento, acidificación y producción de tirosina en leche	66
4.2.2. Influencia de la temperatura de incubación en el desarrollo y actividad metabólicas de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> LBB	69
4.3. Determinación de la actividad proteolítica específica	78
4.3.1. Puesta a punto del método de obtención de bacterias	78
4.3.2. Puesta a punto del ensayo enzimático	79
4.3.3. Influencia del tratamiento con Na ₂ EDTA pH 12 sobre la actividad proteolítica	80
4.3.4. Reproducibilidad del método	83
4.3.5. Evaluación de la actividad proteolítica de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> LBB durante el crecimiento a 37 y 42°C	85
4.3.6. Influencia de la concentración de aminoácidos y péptidos solubles sobre la actividad proteolítica de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> LBB	88
4.3.7. Influencia de la concentración de aminoácidos TCA solubles sobre el ensayo enzimático	94
4.3.8. Evaluación del efecto de la temperatura de crecimiento sobre la actividad proteolítica bacteriana	96
4.3.9. Influencia de la temperatura sobre la actividad de la enzima	98
4.4. Estudio comparativo del efecto del medio de crecimiento sobre la actividad proteolítica de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> LBA, LBB y LBR	100
4.4.1. Evaluación de la actividad proteolítica de bacterias desarrolladas en leche y medio de cultivo por incremento de nitrógeno TCA soluble	100
4.4.2. Evaluación de la actividad proteolítica bacteriana por degradación de fracciones caseínicas	105
4.5. Discusión	113

5. CONSERVACION DE <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	
5.1. Consideraciones generales	118
5.2. Estudio de distintas condiciones de conservación para <i>Lactobacillus bulgaricus</i> LBA, LBB y LBR	119
5.3. Efecto de crioprotectores en la congelación de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> . Influencia de la concentración del crioprotector	120
5.4. Evaluación de la trehalosa como crioprotector de <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	125
5.5. Estudio comparativo de la capacidad crioprotectora de distintos azúcares	131
5.6. Influencia del calcio en el medio de crecimiento en la congelación de <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	136
5.7. Discusión	149
6. CONCLUSIONES	152
7. BIBLIOGRAFIA	154

INTRODUCCION

1.1. Leche. Materia prima para la elaboración de yogur

La leche es uno de los alimentos más importantes en la dieta del hombre y es el único alimento del recién nacido. La leche de vaca tiene un pH de 6,6-6,7 y está compuesta por 85,4 a 87,7% de agua, 3 a 4% de proteínas, 3 a 5% de lípidos, 4,9 a 5% de lactosa, vitaminas y minerales (Cheftel y Cheftel, 1976).

La composición varía en función de la alimentación, período de lactancia, raza, etc. El componente de mayor variación es la fracción lipídica y los más estables son lactosa y sales.

El componente mayoritario de la leche es el agua, en ella están disueltos la lactosa, sales y proteínas solubles dentro de las cuales se encuentran la β -lactoglobulina, α -lactoalbúmina, seroalbúmina, inmunoglobulinas y enzimas (Swaisgood, 1985).

Por otro lado, la leche presenta partículas coloidales en suspensión, las micelas proteicas, formadas por la interacción entre caseínas y otras proteínas (Cheftel y Cheftel, 1976; Jenness, 1988). El grupo denominado caseínas consiste en 4 clases de proteínas, α_{s1} , α_{s2} , β y κ y la γ caseína que proviene de proteólisis posterior de la β caseína (Whitney, 1988).

Las micelas caseínicas presentan un tamaño variable (40 a 300 nm) y están formadas por la asociación de submicelas cuyo diámetro oscila entre 15 y 20 nm. Las submicelas no son todas iguales, están compuestas por α_{s1} , α_{s2} ($\beta + \gamma$) y κ -caseína en distintas proporciones. La κ -caseína se encuentra predominantemente en la parte externa de la micela con la porción hidrofílica hacia el exterior. Las submicelas se unen entre sí mediante interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y por medio de fosfato de calcio coloidal (Walstra, 1990). La estabilidad de esta micela cambia con el pH debido a la solubilización del fosfato de calcio coloidal, o también por acción de enzimas proteolíticas como la renina. Estas propiedades se utilizan

en la elaboración de subproductos tales como queso y leches fermentadas (Walstra, 1990).

La fracción lipídica está representada por los glóbulos grasos que presentan una estructura característica. La fase grasa constituida principalmente por triglicéridos se encuentra rodeada de una membrana de naturaleza lipoproteica, semejante a la membrana plasmática, rica en lípidos polares. Además, en la leche se encuentran presentes vitaminas del grupo B, ácido ascórbico (C) y vitaminas liposolubles (A, D, E, K). Las sales y los minerales están representados por potasio, sodio, calcio, fósforo (como fosfato tricálcico en su mayor proporción), citrato, carbonato, cloruro, magnesio y hierro.

1.2. Yogur: una alternativa para conservar la leche

En la mayoría de los países gran parte de la leche ordeñada se consume pasteurizada y otra parte se utiliza para obtener subproductos como manteca, queso, yogur, etc.

La elaboración de leches fermentadas resultó una solución para el problema de conservación de la leche dado que el medio ácido impide la proliferación de microorganismos y aumenta el tiempo de conservación.

De las leches fermentadas, una de las más difundidas en nuestro país y en el mundo es el yogur. Su origen es remoto, ya se menciona en la Biblia y en escritos del Imperio Romano. Algunos autores afirman que el yogur se originó en las tribus nómades de Turquía, otros en cambio opinan que proviene de los Balcanes. El hecho es que estas tribus estandarizaron el proceso de elaboración calentando la leche para concentrarla y obtener un coágulo final con una viscosidad atractiva, como consecuencia modificaban las propiedades de las caseínas y proteínas del suero, erradicaban los

microorganismos patógenos presentes en la leche y luego realizaban la fermentación a temperaturas suficientemente elevadas para permitir que las bacterias lácticas termófilas fueran las dominantes.

Con el tiempo el método de elaboración no ha cambiado, pero sí se han mejorado las condiciones y tecnología y se conocen con mayor detalle los procesos de la fermentación de la leche por bacterias lácticas. Los principales pasos del proceso de elaboración de leches fermentadas se pueden puntualizar de la siguiente forma:

- Aumentar el nivel de sólidos de leche a 12 o 14%,
- Realizar a la leche un tratamiento térmico esterilizante apropiado,
- Inocular la leche con un cultivo de *Streptococcus salivarius* subespecie *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*,
- Incubar la leche en condiciones determinadas para obtener un buen coágulo, aroma, sabor, etc.,
- Adicionar frutas u otros ingredientes,
- Envasar.

Es importante destacar que el producto final debe mantener la población de bacterias lácticas viables. Sin embargo, en ciertos casos, el yogur es sometido a un tratamiento esterilizante a fin de prolongar su tiempo de conservación. Este producto, que no posee las bacterias viables, se conoce como yogur "pasteurizado" o "esterilizado", según el tratamiento térmico aplicado (Tamime y Deeth, 1980).

Nuestra legislación alimentaria, Código Alimentario Argentino (CAA) en su artículo 576, Resolución 879, 5/6/85, define al yogur de la siguiente manera: "Se entiende por yogur al producto obtenido por la acidificación biológica de la leche, de la leche reconstituída (con crema, entera, parcialmente descremada o descremada) previamente pasteurizada, hervida o esterilizada, por acción de bacterias lácticas específicas fundamentalmente

Lactobacillus bulgaricus y *Streptococcus thermophilus* a las que en forma subsidiaria pueden acompañar otras bacterias ácido lácticas que por su actividad contribuyen a la determinación de las características del producto terminado".

1.3. Aspectos nutricionales del yogur

La composición química del yogur es semejante a la de la leche de la cual se origina con los cambios producidos por la fermentación que aumentan su digestibilidad.

Los cambios químicos más importantes que ocurren en la leche durante la elaboración del yogur son una reducción del nivel de lactosa, con el consiguiente aumento de ácido láctico y un incremento de aminoácidos y péptidos, como también de ácidos grasos libres.

El consumo de lactosa por la fermentación bacteriana es sólo un 20% del contenido total. Si bien no es un valor elevado, se ha comprobado que aquellos individuos que presentan intolerancia a la lactosa pueden ingerir yogur pero no leche debido a la actividad lactásica bacteriana que actúa a nivel intestinal hidrolizando este azúcar (Rasik y Kurman, 1978).

Por otra parte, el incremento de ácido láctico presenta un gran número de ventajas ya que prolonga la vida media del producto con respecto a la leche, contribuye a su sabor, evita el desarrollo de microorganismos contaminantes, mejora la digestibilidad de las proteínas de la leche, optimiza la captación de iones calcio, fósforo y hierro y estimula la secreción de jugo gástrico.

La fermentación bacteriana de la leche también produce cambios a nivel de las proteínas aumentando su valor nutritivo. Las proteínas de la

leche se hidrolizan por la acción de enzimas bacterianas. El grado de hidrólisis, que depende de la cepa utilizada, incrementa la digestibilidad.

Además, el coágulo formado en el yogur es de estructura laxa, permitiendo la acción de las enzimas digestivas sobre las caseínas (Tamime y Robinson, 1985). En las leches fermentadas se produce un pequeño incremento de los ácidos grasos libres y de la disponibilidad de vitaminas y iones. Por otra parte, algunas cepas producen sustancias capaces de inhibir el desarrollo de bacterias contaminantes como bacteriocinas y H_2O_2 (Tamime y Robinson, 1985; Abdel Bar y col., 1987; Muriana y Klaenhammer, 1987), incrementando la vida útil del producto.

1.4. Microbiología del yogur

La microflora original del yogur está compuesta predominantemente por *Streptococcus salivarius* subespecie *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, ambas bacterias termófilas y homofermentativas (Auclair y Accolas, 1983). En algunas ocasiones es posible encontrar en una menor proporción otras bacterias lácticas como *Lactobacillus acidophilus* capaces de implantarse a nivel intestinal (Rasic y Kurman, 1978).

En la elaboración del yogur, se tienen en cuenta ciertas aptitudes metabólicas de las bacterias, importantes durante el desarrollo del fermento mixto. Entre ellas se puede mencionar la capacidad acidificante (Bouillanne y Desmazeaud, 1981), la producción de aromas (Wilkins y col., 1986), de polisacáridos extracelulares (Cerning y col., 1986) y la actividad proteolítica (Thomas y Mills, 1981; Law y Kolstad, 1983; Marshall y Law, 1984; Tamime y Robinson, 1985).

El crecimiento conjunto de *Streptococcus salivarius* subespecie *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* determina tiempos de coagulación de la leche menores que cuando ambas cepas crecen por separado. Esto indica que, si bien ambas bacterias son capaces de crecer en leche, el crecimiento conjunto estimula el desarrollo de ambas. Esta mutua estimulación, conocida comúnmente como simbiosis, es en realidad protocooperativa, debido a que no es una relación obligatoria (Marshall y Law, 1984).

Se ha observado que *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* estimula el crecimiento del estreptococo por liberación de aminoácidos a partir de caseínas (Higashio y col., 1977a). Esta estimulación fue comprobada posteriormente por Hemme y col. (1981) agregando sobrenadantes de bacilos termofílicos a cultivos de estreptococos. El nivel de aminoácidos de la leche no es suficiente para el óptimo desarrollo de *Streptococcus salivarius* subespecie *thermophilus* (Mills y Thomas, 1981); se ha demostrado que la adición de aminoácidos incrementa su velocidad de crecimiento (Thomas y Mills, 1981).

Por otro lado, *Streptococcus salivarius* subespecie *thermophilus* estimula a *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* mediante la producción de ácido fórmico (Higashio y col., 1977b). Este ácido no es el único compuesto que estimula al lactobacilo, también lo estimula el CO₂ y otros ácidos tales como láctico y pirúvico (Marshall y Law, 1984). Asimismo, la adición de 40 ppm de ácido fórmico a cultivos con relación coco-bacilo baja, mejora el tiempo de coagulación de la leche (Larsen y col., 1986). La estimulación del lactobacilo mediante el agregado de ácido fórmico se ha estudiado con detalle. El ácido fórmico es un precursor de las bases púricas y estimula la síntesis de ADN y ARN (Suzuki y col., 1986 a y b).

Las dos etapas de la simbiosis se pueden resumir como una primera estimulación del estreptococo debido a los aminoácidos y péptidos liberados

por el lactobacilo y una segunda etapa donde *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* se ve estimulado por ácido fórmico producido por el estreptococo.

1.4.1. Características morfológicas y metabólicas de *Streptococcus salivarius* subespecie *thermophilus*.

Es un coco de 0,7 a 0,9 micrones de diámetro, Gram positivo, catalasa negativo y aerobio facultativo (Bergey's Manual, 1986). Crece en forma de pares o cadenas. La composición del medio de cultivo influye en su morfología, en leche crece en diplos y a pH bajos forma cadenas más largas.

En medio sólido, forma colonias pequeñas de bordes lisos. Crece a temperaturas entre 20 y 50°C, siendo su temperatura óptima 40 a 45°C.

Pertenece al grupo de bacterias lácticas homofermentativas produciendo ácido láctico. En algunas condiciones de crecimiento produce, en menor proporción, CO₂, etanol, ácido fórmico y acético (Rasic y Kurman, 1978). La concentración de fórmico depende de la cepa y del medio de cultivo y es máxima en la fase de crecimiento exponencial (Pérez y col., 1990; 1991). Esta bacteria presenta escasa actividad proteolítica representada por peptidasas intracelulares (Meyer y col., 1989).

1.4.2. Características morfológicas y metabólicas de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*.

Es un bacilo no esporulado, cuyo tamaño oscila entre 0,8 a 1 micrones de ancho por 4 a 6 micrones de largo, Gram positivo, catalasa negativo y aerobio facultativo (Bergey's Manual, 1986). Se presenta como bacilo aislado,

de a pares y en forma de cadenas de hasta 15 a 30 micrones de largo. En ocasiones presenta en su interior gránulos metacromáticos de polifosfafo (gránulos de volutina).

Su actual denominación *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* (Weiss y col., 1983) se debe a su similitud fenotípica y genotípica con *L. delbrueckii* y *L. lactis*. Todos ellos son capaces de crecer a 45°C y no a 15°C (Marshall, 1987).

Lactobacillus delbrueckii subespecie *bulgaricus* pertenece al grupo de bacterias lácticas homofermentativas, utiliza los azúcares mediante la vía glicolítica produciendo ácido láctico (Kandler, 1983). En determinadas condiciones de cultivo como a pHs extremos o concentraciones de glucosa limitante produce acetato, etanol o formiato, además de lactato (Rhee y Pack, 1980).

El catabolismo de lactosa tiene lugar en el interior de la célula y el paso inicial es su transporte a través de la membrana. Este transporte puede ser dependiente del sistema fosfoenol piruvato fosfotransferasa obteniéndose lactosa fosforilada en el interior de la célula. La lactosa fosfato es hidrolizada por la enzima fosfo- β -galactosidasa dando galactosa fosfato y glucosa. Esta última se metaboliza por la vía Embden-Meyerhof. Otra vía de transporte de lactosa es mediante la galactósido permeasa. En este caso la lactosa es hidrolizada por la β -galactosidasa (Marshall y Law, 1984; Tamime y Robinson, 1985).

Las características fermentativas de lactobacilos homofermentativos, dentro de los cuales se encuentra *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, se describen en la Tabla 1 donde se observa que el 99% de las cepas de esta especie fermenta glucosa, lactosa y fructosa y un 25% fermenta además galactosa y manosa.

Tabla 1: Fermentación de azúcares por *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* (extraída de la tabla de identificación del sistema API 50 CHI)

Código API	Azúcar	Porcentaje de cepas positivas
0	Control	0
1	Glicerol	0
2	Eritritol	0
3	D-Arabinosa	0
4	L-Arabinosa	0
5	Ribosa	0
6	D-Xilosa	0
7	L-Xilosa	0
8	Adonitol	0
9	β -Metil-xilósido	0
10	Galactosa	25
11	D-Glucosa	99
12	D-Fructosa	99
13	D-Manosa	25
14	L-Sorbosa	0
15	Ramnosa	0
16	Dulcitol	0
17	Inositol	0
18	Manitol	0
19	Sorbitol	0
20	α -Metil-D-manósido	0
21	α -Metil-D-glucósido	0
22	N-Acetil-glucosamina	0
23	Amigdalina	0
24	Arbutina	0
25	Esculina	0
26	Salicina	0
27	Celobiosa	0
28	Maltosa	0
29	Lactosa	99
30	Melibiosa	0
31	Sacarosa	0
32	Trehalosa	1
33	Inulina	0
34	Melezitosa	0
35	D-Rafinosa	0
36	Almidón	0
37	Glucógeno	0
38	Xilitol	0
39	β -Gentiobiosa	0
40	D-Turanosa	0
41	D-Lixosa	0
42	D-Tagatosa	0
43	D-Fucosa	0
44	L-Fucosa	0
45	D-Arabitol	0
46	L-Arabitol	0
47	Gluconato	1
48	2 ceto-gluconato	0
49	5 ceto-gluconato	0

Los valores indican porcentaje de cepas positivas

1.5. Actividad proteolítica de fermentos lácticos

Las bacterias lácticas son débilmente proteolíticas comparadas con otros grupos de bacterias como *Bacillus*, *Proteus*, etc. Sin embargo, es un sistema de interés para muchos investigadores, no sólo por su importancia en la elaboración de productos fermentados, sino también por la variedad y distinta localización de las enzimas que lo componen.

Muchas bacterias lácticas, entre ellas *Streptococcus salivarius* subespecie *thermophilus*, poseen requerimientos nutricionales estrictos y el contenido de aminoácidos solubles de la leche no permite su óptimo desarrollo (Higashio y col., 1977a; Rasic y Kurman, 1978; Mills y Thomas, 1981; Thomas y Mills, 1981). Las fuentes potenciales de nitrógeno de la leche son las caseínas, proteínas del suero y péptidos de menor peso molecular. Las bacterias no proteolíticas mejoran su crecimiento si a la leche se le agrega extracto de levadura o si crecen junto a otras bacterias que presentan proteasas y/o peptidasas (Tamime y Deeth, 1980). La clasificación en proteinasas y peptidasas está de acuerdo con la naturaleza del sustrato.

La hidrólisis de proteínas se puede dividir en dos etapas:



En la primera etapa, las proteasas o proteinasas localizadas en la pared celular hidrolizan las proteínas liberando polipéptidos de menor peso molecular que son hidrolizados por peptidasas intracelulares para dar aminoácidos. La función del sistema proteolítico es suplir de aminoácidos a la célula para su desarrollo en medios con bajo contenido de nitrógeno soluble como la leche (Mills y Thomas, 1981). Por otra parte, los productos de

proteólisis otorgan características de aroma y sabor específicos a los productos fermentados (Fox, 1989; Khalid y Marth, 1990).

La mayoría de los estudios sobre enzimas proteolíticas se realizaron con estreptococos mesófilos. En estas bacterias se han descrito proteasas con distinta localización celular. En *Streptococcus cremoris* las proteasas se encuentran asociadas a pared (Exterkate, 1975; 1976 a y b; 1985) y se liberan al medio cuando la pared celular se digiere con lisozima (Exterkate 1975). En algunas condiciones de crecimiento *S. cremoris* AM1 es capaz de secretar una proteasa al medio (Exterkate, 1979a).

Proteasas asociadas a pared también se han descrito en *Streptococcus lactis* (Thomas y col., 1984), *L. helveticus* (Ezzat y col., 1985), *L. casei* y *L. plantarum* (Khalid y col., 1991): Estas proteasas hidrolizan las proteínas de la leche (Thomas y Mills, 1981) actuando sobre las distintas fracciones caseínicas (Exterkate y de Veer, 1985; Visser y col., 1986; 1988).

Estas enzimas presentan un sistema de regulación de su síntesis complejo donde intervienen péptidos, aminoácidos e iones de calcio. Alta concentración de calcio (5 mM) y baja concentración de aminoácidos son las condiciones óptimas para la expresión de las proteasas en *S. cremoris* (Exterkate, 1979a).

Los iones calcio también están involucrados en la unión de las proteasas a la pared celular (Mills y Thomas, 1978; Laan y Konning, 1989) pues se liberan al medio cuando las células se suspenden en buffer sin calcio, en determinadas condiciones de pH y temperatura. En *S. cremoris* el ion calcio actúa manteniendo a la enzima en una configuración activa (Exterkate, 1979a).

Algunas bacterias lácticas como *Lactococcus lactis* y *S. cremoris* poseen proteasas en el interior de la célula (Exterkate, 1975; 1984; Musset y col., 1989).

Otro grupo de enzimas proteolíticas son las peptidasas. Estas enzimas, a diferencia de las proteinasas, se encuentran en el interior celular. Dentro de los estreptococos se han descrito peptidasas intracelulares en *S. lactis*, *S. lactis* subespecie *diacetylactis* y *S. salivarius* subespecie *thermophilus* (Kamaly y Marth, 1989). En *S. cremoris* se han encontrado peptidasas asociadas a membrana celular (Exterkate, 1979b; 1984).

Dentro del género *Lactobacillus* se han aislado y caracterizado diferentes peptidasas. *Lactobacillus lactis* posee aminopeptidasa con actividad sobre di y tripéptidos (Eggiman y Bachmann, 1980). *Lactobacillus helveticus*, *L. lactis*, *L. bulgaricus* y *L. casei* también presentan actividad peptidásica (Hickey y col., 1983; Frey y col., 1986), algunas de las cuales se inactivan por la presencia de EDTA y 1-10 σ -fenantrolina (El Soda y col., 1978 a y b; Ezzat y col., 1986).

La actividad proteolítica de bacterias mesófilas ha sido y sigue siendo un tema de interés para muchos investigadores dado que el conocimiento de este sistema es importante sobre todo por su aplicación en la industria de productos fermentados. Sin embargo, son escasos los estudios acerca de la proteólisis por bacterias termófilas utilizadas en los fermentos para yogur, leches fermentadas y algunos quesos.

1.6. Actividad proteolítica de bacterias del yogur

La actividad proteolítica de los fermentos para yogur es una aptitud metabólica a ser considerada dado que la liberación de aminoácidos de las caseínas produce cambios que afectan la estructura del coágulo (Tamime y Robinson, 1985). Estos aminoácidos son esenciales para el crecimiento de *Streptococcus salivarius* subespecie *thermophilus* (Higashio y col., 1977b; Hemme y col., 1981; Mills y Thomas, 1981) y a su vez son precursores de

compuestos, como acetaldehído, responsables del aroma del producto obtenido (Wilkins y col., 1986).

Los estudios sobre la actividad proteolítica de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* subespecie *thermophilus* indican que estos microorganismos poseen proteasas y peptidasas que difieren en su localización celular y su especificidad por el sustrato. *Streptococcus salivarius* subespecie *thermophilus* tiene mayor actividad peptidásica que *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* y escasa actividad proteásica (Meyer y col., 1989). En cambio este último presenta una mayor actividad proteinásica localizada en la pared celular. Durante la fermentación láctica en la elaboración del yogur las proteasas de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* hidrolizan las caseínas para dar péptidos que sirven de sustrato a las peptidasas de *Streptococcus salivarius* subespecie *thermophilus* que liberan aminoácidos al medio (Tamime y Deeth, 1980).

Lactobacillus delbrueckii subespecie *bulgaricus* presenta un sistema proteolítico complejo compuesto por peptidasas y proteasas con diferentes localizaciones celulares. Durante su desarrollo en un medio rico como el caldo MRS (Man y col., 1960) no se detecta actividad proteolítica extracelular sino asociada a la pared (Argyle y col., 1976; Ezzat y col., 1985).

Las proteasas asociadas a pared son las responsables de la degradación de las caseínas durante los procesos de fermentación (Thomas y Mills, 1981). La especificidad de estas proteasas sobre caseínas es un tema discutido y depende, entre otros factores, de la cepa en estudio, configuración de la micela caseínica y presencia de sales (Chandan y col., 1982). Las proteasas de pared de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* NCDO 1489 resultan más activas sobre caseinato que sobre caseína nativa, hidrolizando preferentemente la β -caseína (Chandan y col., 1982). En cambio *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* ATCC 12278 y CNRZ 369

hidrolizan las fracciones α y β sin preferencia (El Soda y Desmazeaud, 1982; Khalid y col., 1991) y cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* sometidas a radiación γ muestran preferencia por la κ caseína (Singh y col., 1978).

Los péptidos liberados por las proteasas asociadas a pared celular son hidrolizados por peptidasas en el interior de la célula, de esta forma los péptidos son transformados en aminoácidos a partir de los cuales la célula sintetiza proteínas y/u otras sustancias aromatizantes.

Lactobacillus delbrueckii subespecie *bulgaricus*, como *L. helveticus*, *L. acidophilus* y *L. lactis*, poseen enzimas con actividad aminopeptidasa y dipeptidasa (El Soda y Desmazeaud, 1982). Estas actividades dependen de la temperatura de crecimiento y del estadio fisiológico de las células (Ezzat y col., 1982). Algunas de estas enzimas son inhibidas por agentes quelantes (Ezzat y col., 1986). Esta bacteria posee dipeptidasas, aminopeptidasas y proteasas intracelulares (Frey y col., 1986) pero no actividad carboxipeptidásica (Hickey y col., 1983).

Estudios recientes demostraron la existencia de más de tres aminopeptidasas con distinta localización en *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* CNRZ 369. API y APIII están localizadas en el citoplasma mientras que APII está asociada a pared celular (Atlan y col., 1989). Esta proteasa se detecta cuando la bacteria crece en medio de cultivo y en mayor cantidad cuando crece en leche (Laloi y col., 1991).

1.7. Conservación de microorganismos

Los métodos de conservación de bacterias más difundidos son la congelación, la liofilización y la conservación en cultivos líquidos con alta

concentración de células (Heckly, 1978; Porubcan y Sellars, 1979; Barbour y Priest, 1986; Valdez y col., 1986).

La congelación de bacterias es un método de conservación muy difundido, es además simple, accesible y se obtiene un buen número de células viables luego de la congelación-descongelación (Barbour y Priest, 1986).

Durante este proceso la célula sufre daño, ya sea durante la congelación-descongelación y/o durante su almacenamiento a bajas temperaturas.

Durante la congelación a baja velocidad de enfriamiento el agua cristaliza en el exterior celular debido a que la concentración de solutos es menor que en su interior. De esta manera se forman los primeros núcleos de cristalización que crecen a expensas del agua extracelular, esto lleva a un aumento de la concentración de solutos extracelulares. Para igualar las presiones osmóticas se produce una salida del agua del interior de la célula y en consecuencia una deshidratación que ocasiona un incremento de la concentración intracelular de solutos, este fenómeno es conocido como "efecto de solución" (Mazur, 1966; 1970; Merriman, 1966). En general si la membrana resiste al proceso de congelación-descongelación, la célula sobrevive (Steponkus, 1981).

Velocidades de congelación extremadamente rápidas (superiores a 1000°C/min) son convenientes para la sobrevivencia de las células dado que se obtienen cristales muy pequeños intra y extracelulares. Las células congeladas de esta manera sobreviven a la congelación si se almacenan a temperaturas inferiores a -50°C (Gazeau y Dereuddre, 1986).

A velocidades intermedias se produce un gran cristal intracelular y numerosos cristales extracelulares. La presencia de cristales grandes intracelulares produce un daño irreversible de las células (Fujikawa, 1980).

Además del efecto de la velocidad de congelación-descongelación es importante la temperatura de almacenamiento de las células congeladas. Durante el almacenamiento se produce un reordenamiento cristalino con un

aumento del tamaño promedio de los cristales. La velocidad de recristalización es más lenta a temperaturas de almacenamiento más bajas, por lo tanto el daño celular será menor.

Durante la congelación-descongelación la célula sufre alteraciones a nivel de membrana debido a cambios en la fluidez de sus lípidos y modificación de las proteínas estructurales y las involucradas en el transporte activo (Gazeau y Dereuddre, 1986). Por otra parte, el incremento de la concentración de solutos en el interior celular determina modificaciones de las proteínas citoplasmáticas que pueden alterar en mayor o menor grado la funcionalidad celular (Gazeau y Dereuddre, 1986).

La sensibilidad de las células a la congelación-descongelación está determinada por distintas variables. Entre ellas se pueden mencionar el tipo de microorganismo, la fase de crecimiento, la composición del medio de crecimiento y medio de recuperación, la concentración de células y pH del cultivo (Smittle y col., 1972; 1974; Heckly, 1978; Sharp, 1984; Valdez y col., 1986; Gilliland y Rich, 1990).

El uso de sustancias crioprotectoras incrementa la viabilidad de bacterias sometidas al proceso de congelación-descongelación, entre ellas se pueden mencionar alcoholes, azúcares, aminoácidos, leche, etc. (Valdez y col., 1983; Crowe y col., 1984). Estas sustancias son capaces de formar uniones hidrógeno con moléculas de agua, proteínas y grupos polares de los fosfolípidos. Además, aumentan la viscosidad, disminuyen la capacidad de nucleación, la temperatura de congelación y la cantidad de hielo formado a una temperatura dada.

Las sustancias crioprotectoras pueden o no penetrar en la célula ejerciendo su efecto crioprotector a distintos niveles.

Los crioprotectores que penetran en la célula disminuyen el gradiente osmótico entre el interior celular y el medio de congelación, evitando una

concentración elevada de electrolitos en el interior celular. Estos crioprotectores se utilizan en concentraciones suficientemente altas como para ejercer un efecto significativo en la temperatura de congelación del sistema (Gazeau y Dereuddre, 1986). Además, evitan la concentración de solutos limitando el descenso del volumen celular lo cual permite que las células recuperen su volumen inicial al descongelarse (efecto coligativo).

Los crioprotectores de masa molecular elevada que no pueden penetrar en la célula, ejercen su efecto crioprotector por su aptitud de formar puentes de hidrógeno con las principales moléculas de la célula (efecto no coligativo) o bien produciendo una deshidratación osmótica (efecto coligativo).

Por otro lado, las sustancias crioprotectoras, penetren o no en la célula ejercen su efecto directa o indirectamente sobre las membranas. Por ejemplo, azúcares no reductores como la trehalosa, interactúan con los fosfolípidos de la membrana (Anchordoguy y col., 1987) y algunos alcoholes como sorbitol estabilizan las proteínas de la misma (Crowe y col., 1984). Generalmente, una sustancia ejerce su efecto crioprotector por uno o más de los mecanismos propuestos. Finalmente el efecto predominante dependerá de la sustancia crioprotectora y las características de la célula.

OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivos:

- Aislar y tipificar cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* a partir de fermentos industriales y yogures comerciales. Estudiar sus características metabólicas en leche y medio de cultivo.
- Determinar su actividad proteolítica en leche. Analizar la influencia de la concentración de aminoácidos solubles y la temperatura de desarrollo sobre esta actividad metabólica.
- Optimizar las condiciones de conservación a fin de mantener las aptitudes metabólicas de interés en la elaboración de productos fermentados: viabilidad celular y capacidad acidificante.

**MATERIALES
Y
METODOS**

2.1. Cepas

En este trabajo se utilizaron las siguientes cepas:

- *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* LBA, LBB y LBR aisladas en el CIDCA a partir de un fermento líquido para yogur provisto por una industria láctea local (Unión Gandarense SACIA).
- *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* ATCC 11842, provista por el CERELA.

NOTA: En este trabajo a *Streptococcus salivarius* subespecie *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* se denominarán *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* siguiendo la nomenclatura tradicional.

2.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados fueron:

Caldo 1.1.1.	g/l
Triptona	10
Extracto de levadura	10
Lactosa	10
pH 7,0	
Esterilizado en autoclave a 120°C durante 15 min.	

Agar 1.1.1.

Caldo 1.1.1. + 15 g/l de agar

Esterilizado en autoclave a 120°C durante 15 min.

2. MATERIALES Y METODOS

Caldo MRS (Man y col., 1960)	g/l
Peptona universal	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
Glucosa	20
Tween 80	1
K_2HPO_4	2
Citrato de amonio dibásico	2
Acetato de sodio	5
$MgSO_4$	0,1
$MnSO_4$	0,05
pH 7,4	

Esterilizado en autoclave a 120°C durante 15 min.

Caldo MRS base	g/l
Peptona universal	10
Extracto de carne	5
Extracto de levadura	5
K_2HPO_4	2
Citrato de amonio dibásico	2
Acetato de sodio	5
$MgSO_4$	0,1
$MnSO_4$	0,05
pH 7,4	

Esterilizado en autoclave a 120°C durante 15 min.

Agar MRS

Caldo MRS + 12 g/l de agar

2. MATERIALES Y METODOS

Agar Lee (Lee y col., 1974)	g/l
Triptona	10
Extracto de levadura	10
Lactosa	5
Sacarosa	5
CaCO ₃	3
K ₂ HPO ₄	0,5
BCP (púrpura de bromo cresol)	0,02
Agar	18
pH 7,0	
Esterilizado en autoclave a 120°C durante 15 min.	

Agar Lee lactosa	g/l
Triptona	10
Extracto de levadura	10
Lactosa	10
K ₂ HPO ₄	0,5
BCP (púrpura de bromo cresol)	0,02
Agar	18
pH 7,0	

Medio base para fermentación de azúcares API 50 CHL

	g/l
Polipeptona	10
Extracto de levadura	5
Tween 80	1
K_2HPO_4	2
Citrato de amonio dibásico	2
Acetato de sodio dihidratado	5
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,2
$MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	0,05
BCP (púrpura de bromo cresol)	0,17

pH 6,7 - 7,0

Esterilizado en autoclave a 120°C durante 15 min.

LPR (leche en polvo reconstituída)

Leche en polvo reconstituída al 12% p/v en agua destilada, esterilizada por tindalización (3 tratamientos de 30 min a 100°C). La leche reconstituída se filtró por papel antes de tindalizar. Para las experiencias de congelación se utilizó leche 0,1, 6, 12 y 24% p/v según se especifica en cada caso.

Diluyente

- Triptona 1 g/l autoclavado a 120°C durante 15 min.

2.3. Coloraciones

Coloración de Gram

Colorantes

Soluciones madre: 1. Cristal violeta 10% p/v en etanol.

2. Safranina 10% p/v en etanol.

Soluciones diluídas

- Las soluciones madre de cristal violeta y safranina se diluyeron 1/10 en agua destilada y se filtraron.
- La solución diluída de safranina se diluyó 1/10 para obtener la solución de trabajo.
- Lugol 10 gr I₂ y 20 gr KI en 1 litro de agua destilada.
- Decolorante: etanol 70%, acetona 30%.

Protocolo

Colorante	Tiempo de exposición (seg)
Cristal violeta	120
Lugol	30
Lugol	30
Lavado con agua	
Alcohol-acetona	10
Lavado con agua	
Safranina	120

Coloración azul de metileno

Colorante: azul de metileno 0,3% p/v en etanol-H₂O (30:70). El colorante se dejó 3 o 4 minutos y se lavó con agua destilada.

2.4. Aislamiento de cepas de *Lactobacillus bulgaricus*

Los aislamientos se realizaron a partir de fermentos comerciales mediante tres pasajes sucesivos por colonia aislada.

El primer aislamiento diferencial se realizó por agotamiento en medio de Lee; el segundo se realizó en agar MRS y el tercero en agar MRS o Lee lactosa.

En todos los aislamientos se controló la pureza del cultivo mediante la observación microscópica de extendidos coloreados con Gram.

Una vez aisladas las cepas se conservaron en leche a -80°C. Antes de cada experimento las bacterias se reactivaron sembrando una ansada de cultivo congelado en leche.

2.5. Tipificación de las colonias aisladas

Los cultivos se caracterizaron mediante:

- a) Morfología microscópica de extendidos coloreados con Gram y azul de metileno.
- b) Desarrollo en caldo MRS a 20, 37 y 42°C.
- c) Fermentación de azúcares.

Para evaluar la fermentación de azúcares se utilizó el sistema API 50 CHL.

Las bacterias se desarrollaron en caldo 1.1.1. hasta obtener un cultivo abundante. Las células se centrifugaron (10.000 x g, 10 minutos a 10°C), se lavaron dos veces con agua estéril y el precipitado obtenido se resuspendió en agua destilada estéril. Estas células se diluyeron en un volumen igual de medio base para fermentación de azúcares API 50 CHL y se sembraron en las microcubetas que contenían los distintos azúcares fermentables. Luego de incubar durante 24 o 48 hs a 37°C se realizaron las lecturas de fermentación de los diferentes azúcares por viraje del colorante a amarillo debido a la acidez producida por las bacterias. En el caso de esculina la reacción positiva se manifiesta por la aparición de color negro.

2.6. Cinéticas de crecimiento en medio de cultivo

El medio se inoculó al 5% con un cultivo en fase estacionaria temprana. Las cinéticas de crecimiento se llevaron a cabo en caldo 1.1.1. a 37°C. El crecimiento microbiano se siguió por lectura de la absorbancia a 550 nm.

Las cinéticas de crecimiento en presencia y ausencia de Tween 80 (concentración final del 1% p/v) se llevaron a cabo en medio MRS base adicionado con 1% p/v de glucosa.

Para evaluar las condiciones de congelación se realizaron cinéticas de crecimiento a 37°C sembrando el cultivo al 5% en caldo 1.1.1.. Se emplearon cultivos sin congelar y cultivos congelados a -80°C y descongelados por inmersión en baño de agua a 37°C.

2.7. Cinéticas de crecimiento en leche

Para evaluar el crecimiento de las bacterias en leche se usó leche en polvo descremada reconstituída al 12% p/v (LPR 12%).

Para realizar las cinéticas de crecimiento o acidificación, la leche se sembró al 5% con un cultivo reactivado en leche, se homogeneizó y se fraccionó en alícuotas. Los cultivos se incubaron a 37, 40 o 42°C según se indica en cada experiencia. A distintos tiempos se determinó acidez y desarrollo bacteriano por lectura de la absorbancia a 480 nm y recuento de bacterias viables.

2.8. Determinación del crecimiento bacteriano en leche por medida de A_{480nm}

La concentración de bacterias en leche se determinó a distintos tiempos de incubación por lectura de la absorbancia a 480 nm de las muestras diluídas 1/10 en Na_2EDTA (etilendiamintetraacetato disódico) alcalino (pH 12) al 2% p/v según la técnica de Kanasaki y col. (1975). Con este tratamiento se disuelve el coágulo de caseínas lo que permite determinar la turbidez debida a las bacterias presentes.

2.9. Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC/ml)

El recuento de células viables se determinó por siembra de distintas diluciones de la muestra en agar 1.1.1.. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Las bacterias se diluyeron en agua triptona 0,1%.

2.10. Determinación de acidez

La determinación de acidez de los cultivos se realizó por:

- a) Titulación de una alícuota con NaOH 0,1N hasta viraje del indicador (fenolftaleína 0,5% p/v en etanol). Los resultados se expresaron en mg de ácido láctico por 100 ml de muestra.
- b) Medida de pH con electrodo combinado de Calomel (Cole-Palmer).

2.11. Test de actividad

Para la realización del test de actividad se sembraron diferentes porcentajes de un mismo cultivo en LPR 12% p/v. Después de incubar durante 4 hs a 42°C se determinó el pH alcanzado. Se graficó el ΔpH ($\text{pH}_{\text{inicial}} - \text{pH}_{\text{final}}$) en función de los porcentajes de inóculo.

2.12. Determinación de la actividad proteolítica

2.12.1. Dosaje del incremento de tirosina TCA soluble de cultivos en leche

La actividad proteolítica de *L. bulgaricus* se determinó por dosaje del contenido de tirosina en la fracción soluble luego de precipitar las muestras con ácido tricloroacético (TCA) al 12% p/v según el método de Hull (1947) modificado por Citti y col. (1963).

A 2,5 ml de leche o leche fermentada por *L. bulgaricus* se le adicionó 0,5 ml de agua destilada y 5 ml de TCA 12% p/v. Se agitó vigorosamente con vortex y luego de 10 min en reposo se filtró. Posteriormente a 0,5 ml de filtrado se le adicionó 1 ml de solución Na_2CO_3 al 15% p/v y hexametafosfato de sodio ($\text{Na}_2(\text{Na}_4(\text{PO}_3)_6)$) al 2% p/v termostatizado a 42°C y 0,3 ml de reactivo

de Folin Ciocalteu diluido 1:3. Después de 5 min se leyó la absorbancia a 650 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 150-02 de doble haz.

En cada experimento se realizó una curva de calibración con solución patrón de tirosina. Los resultados se expresaron en μg de tirosina/ml de muestra.

2.12.2. Determinación de la actividad proteolítica específica

2.12.2.1. Extracción de las bacterias del cultivo en leche

Para determinar la actividad proteolítica, *L. bulgaricus* se creció en leche o leche suplementada con hidrolizado de caseína (Oxoid) hasta alcanzar pH 5 (fase estacionaria temprana). A estos cultivos se les adicionó Na_2EDTA 2% p/v pH 12 hasta neutralizar (pH 6,5-7,0) (Lin y col., 1989). Este tratamiento permite la disolución del coágulo formado por la acidificación de la leche durante el crecimiento bacteriano. Luego se centrifugó a $5.000 \times g$ 10 min a 10°C para separar las células y el precipitado se lavó con agua destilada estéril y se resuspendió en un volumen de agua estéril diez veces menor que el inicial.

De cada suspensión bacteriana se realizaron recuentos de células viables y se determinó su actividad proteolítica. Las cinéticas de actividad proteolítica se realizaron siguiendo la técnica descrita, con cultivos en distintos estadios de crecimiento.

2.12.2.2. Determinación de la actividad proteolítica por medida de nitrógeno TCA soluble

Para la determinación de la actividad enzimática se utilizó 2,5 mg/ml de caseína (Hammarsten) disuelta en buffer K_2HPO_4 0,1 M pH 7. A 2 ml de esta suspensión se le adicionó 0,5 ml de la suspensión bacteriana obtenida como se describió anteriormente. Se incubó a 42°C y la reacción se detuvo a diferentes tiempos con 5 ml de TCA 12% p/v. La mezcla de reacción se filtró a través de papel Whatman N°1 y en el filtrado se determinó el contenido de nitrógeno soluble mediante una reacción colorimétrica según la técnica de Hull (1947) y Citti y col. (1963). Posteriormente se leyó la absorbancia a 650 nm en un espectrofotómetro Shimadzu de doble haz UV 150-02. Se graficó el incremento de absorbancia (ΔA_{650nm}) definido como la diferencia entre la absorbancia a cada tiempo de reacción y la absorbancia inicial.

De la pendiente al origen se calcularon las unidades de actividad proteolítica definidas como la cantidad de enzima que produce un ΔA_{650nm} de 0,01 en 60 min a 42°C y pH 7. La actividad específica (uAP/UFC) se expresó como el cociente de las unidades de actividad proteolíticas (uAP) y las unidades formadoras de colonia (UFC).

2.12.2.3. Análisis de la actividad proteolítica de distintas fracciones caseínicas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida

La determinación de la acción de las proteasas bacterianas sobre las distintas fracciones de caseína se realizó a partir de 0,5 ml de la suspensión bacteriana extraída del coágulo y 2 ml de caseína (2,5 mg/ml) en buffer K_2HPO_4 0,1 M pH 7. Se incubó a 42°C y a distintos tiempos se detuvo la reacción por congelación de la muestra a -80°C. Esta muestra se analizó

mediante electroforesis en geles de poliacrilamida según la técnica de Laemmli (1970).

2.12.2.3.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Descripción del gel y soluciones empleadas

La electroforesis se realizó a pH 8,9 en placas verticales de acuerdo al sistema de buffer discontinuo de Laemmli (1970). El gel se realizó a una concentración de acrilamida del 10 o 12,8% p/v en el gel separador y 5,3% p/v en el stacking (gel apilador). En cada calle se sembró 100 μ g de proteína.

Soluciones empleadas

- Solución madre de acrilamida bis acrilamida (N-N'metilen-bis-acrilamida).

Acrilamida	30 % p/v
Bis acrilamida	0,8% p/v

- Solución buffer para preparar gel apilador (stacking)

Tris (tris hidroximetil aminometano)	0,5 M
SDS (dodecil sulfato disódico)	0,4% p/v
TEMED (NNN'N'tetrametil etilendiamina)	0,4% p/v
Llevar a pH 6,8 con HCl 1N.	

2. MATERIALES Y METODOS

- Solución buffer para preparar gel separador:

Tris	1,5 M
SDS	0,4% p/v
TEMED	0,4% p/v
Llevar a pH 8,8 con HCl 1N.	

- Solución buffer de corrida:

Tris	0,05 M
Glicina	0,384 M
SDS	0,1% p/v
Llevar a pH 8,3 con HCl 1N.	

- Solución buffer de muestra

Tris	0,01 M
EDTA	0,001 M
SDS	1% p/v
Azul de bromo fenol	0,1% p/v
Glicerol	10%
Llevar a pH 8 con HCl 1N	

- Solución colorante y fijadora

Coomassie Brilliant Blue R-250 al 0,1% p/v en ácido acético : isopropanol :
agua 2,5:10:6,5

- Solución decolorante

Metanol	25% v/v
Acido acético	10% v/v
H ₂ O	65% v/v

Preparación de gel separador

Para preparar dos placas se requieren los siguientes volúmenes:

	Concentración de acrilamida	
	10%	12,8%
Buffer separador	10 ml	10 ml
Solución madre		
Acrilamida-bis-acrilamida	13,3 ml	17,06 ml
Agua destilada	16,76 ml	13,0 ml
Persulfato de amonio 2% p/v	0,64 ml	0,64 ml

La solución acuosa de persulfato de amonio se prepara en el momento de ser utilizada.

Preparación de gel apilador

Los volúmenes requeridos para dos placas son los siguientes:

Buffer de gel apilador	5,0 ml
Solución acrilamida-bis-acrilamida	2,6 ml
Glicerol:agua 1:1	11,8 ml
Persulfato de amonio 2% p/v	0,6 ml

Patrones marcadores de peso molecular

Para evaluar el peso molecular de las especies proteicas obtenidas en las diferentes muestras se sembró en cada gel una mezcla de proteínas de peso molecular (PM) conocido. Para ello se emplearon patrones Sigma (29.000 a 66.000 Da) y Pharmacia (14.400 a 99.000 Da).

2. MATERIALES Y METODOS

Proteína	PM KDa	Proteína	PM KDa
Albumina de plasma	66	Fosforilasa B	94
Ovoalbumina	45	Albumina	67
Anhidrasa carbónica	29	Ovoalbumina	43
		Anhidrasa carbónica	30
		Inhibidor de tripsina	20,1
		α lactoalbumina	14,4

Preparación de las muestras

A las muestras se les agregó buffer de muestra en una relación 1:1. Antes de sembrar se calentaron a baño María durante 2 min a 100°C.

Equipo y condiciones de corrida

Se utilizó un equipo para electroforesis vertical SE600 Hoefer Scientific Instrument. La electroforesis se realizó a intensidad de corriente constante (15 mA por placa).

Coloración de las especies proteicas

Los geles se sumergieron en solución colorante y fijadora durante 16 hs y luego se colocaron en solución decolorante hasta aclarar completamente el fondo.

Análisis densitométrico

A los geles coloreados se les realizó un análisis densitométrico en un equipo Shimadzu de doble longitud de onda TLC Scanner CS-910. Las longitudes de onda seleccionadas para la muestra y la referencia fueron 570 nm y 395 nm, respectivamente.

Lectura de áreas

Las áreas obtenidas del análisis densitométrico se integraron en un analizador de imágenes semiautomático Morphomat 30 de Zeiss.

2.13. Estudio de la actividad proteolítica durante distintas fases y condiciones de crecimiento.

Para el estudio de la actividad proteolítica las células se desarrollaron en leche 12% p/v con una concentración de aminoácidos libres expresado como tirosina de 75 $\mu\text{g/ml}$. A esta leche se le adicionó hidrolizado de caseína (Oxoid) hasta obtener una concentración de tirosina de 125, 155 y

220 $\mu\text{g/ml}$ y se dosó la concentración final por el método de Hull (1947) y Citti y col. (1963).

En algunos experimentos el crecimiento de las células se realizó en caldo 1.1.1. que posee un contenido de tirosina TCA soluble de 310 $\mu\text{g/ml}$.

El medio de crecimiento se sembró con inóculo fresco al 5% y se incubó a distintas temperaturas según la experiencia. A diferentes tiempos se dosó la producción de ácido láctico, tirosina y el desarrollo bacteriano por medida de turbidez o recuento de bacterias viables.

En otras experiencias las muestras se incubaron a diferentes temperaturas hasta llegar a pH 5. Después de la incubación se determinó el pH alcanzado, desarrollo celular por lectura de $A_{480\text{nm}}$ y tirosina soluble en el medio de crecimiento. Luego se extrañeron las células del coágulo de leche según se describió anteriormente y a las suspensiones celulares se le determinó la actividad proteolítica específica (uAP/UFC).

2.14. Congelación de bacterias

Las bacterias se crecieron durante 8 hs (fase estacionaria temprana) o 16 hs (fase estacionaria tardía) en caldo 1.1.1. o caldo 1.1.1. adicionado de CaCl_2 0,0045 M. Las células se cosecharon por centrifugación en centrífuga Sorvall a 10.000 x g durante 8 min a 10°C. Los precipitados se lavaron y se resuspendieron en agua estéril. Posteriormente, las células se resuspendieron en caldo 1.1.1., leche 12% p/v y/o crioprotectores. Los crioprotectores se utilizaron en las siguientes concentraciones finales: glicerol 1 y 2 M, lactosa 0,15 y 0,3 M, sacarosa 0,15 y 0,3 M, trehalosa 0,15 y 0,3 M y LPR 0,1, 6, 12 y 24% p/v.

Seguidamente cada suspensión bacteriana, en el correspondiente crioprotector, se fraccionó en alícuotas de 1,2 ml cada una en tubos de poli-

propileno de 1,5 ml. Las suspensiones fraccionadas se congelaron a -80°C por inmersión en alcohol y se almacenaron a esa temperatura como stock para futuros experimentos.

En cada ensayo de congelación las células se sometieron a diferentes tiempos de almacenamiento congelado o a ciclos de congelación-descongelación.

Los ciclos de congelación-descongelación se realizaron descongelando los cultivos por inmersión en agua a 37°C . Los cultivos se mantuvieron a esa temperatura 5 min, luego fueron congelados a -80°C y mantenidos a esa temperatura 15 min antes de realizar el ciclo siguiente.

Antes y después de congelar se evaluó la eficiencia crioprotectora mediante recuento de bacterias viables, cinéticas de crecimiento en caldo 1.1.1., cinéticas de acidificación, producción de ácido a un tiempo fijo en leche (4 hs) y test de actividad.

2.15. Tratamiento estadístico

Se realizó un análisis de varianza de dos factores para un límite de confianza del 0,5%.

Las medias calculadas para cada condición de crecimiento se compararon por medio de un test LSD (mínima diferencia significativa) para un nivel de significación α de 0,05.

Las rectas se ajustaron por cuadrados mínimos y se analizaron los residuos para corroborar la linealidad (Pimentel Gómez, 1978).

**RESULTADOS
Y
DISCUSION**

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE
CEPAS DE *Lactobacillus bulgaricus*.
ESTUDIO DEL DESARROLLO EN
MEDIO Y EN LECHE

3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS DE *Lactobacillus bulgaricus*. ESTUDIO DEL DESARROLLO EN MEDIO Y EN LECHE

Esta sección describe los estudios realizados para obtener las cepas de trabajo y conocer algunas de sus propiedades metabólicas durante su desarrollo en leche y medios de cultivo.

3.1. Consideraciones generales

Comparando la composición de la leche y el yogur se distinguen entre ambas diferencias debidas a la acción de las bacterias sobre sus componentes fundamentales. Una de ellas es el aumento del nivel de ácido láctico producido por fermentación de la lactosa. La determinación de la capacidad acidificante nos permite diferenciar cepas con distinta capacidad fermentadora, parámetro a tener en cuenta para la elección de un buen fermento. Otra diferencia es el cambio que se produce a nivel de las proteínas. Si bien las bacterias lácticas son débilmente proteolíticas es importante destacar la acción de *L. bulgaricus* sobre las caseínas de leche (Rasic y Kurman, 1978; Tamime y Deeth, 1980; Tamime y Robinson, 1985; Marshall y Law, 1984).

En este primer capítulo se estudiaron las características de crecimiento, acidificación y actividad proteolítica de cepas de *L. bulgaricus* aisladas a partir de fermentos industriales.

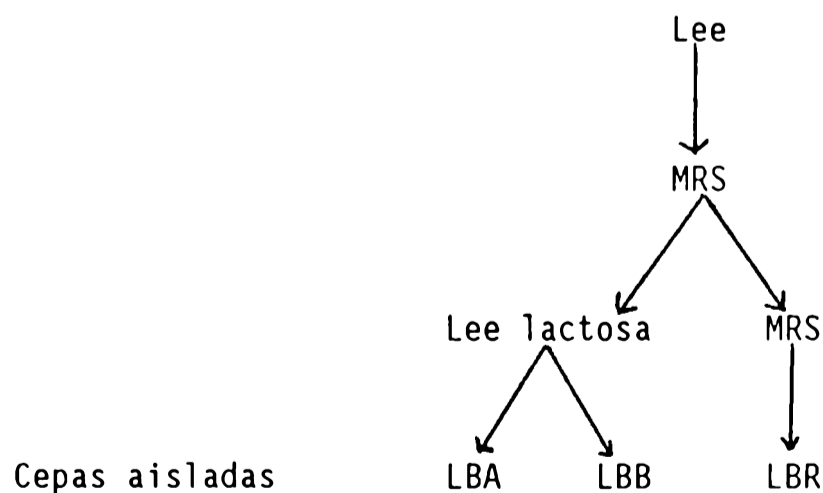
3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION

3.2. Aislamiento e identificación de *Lactobacillus bulgaricus*

Las bacterias utilizadas en este trabajo se aislaron a partir de un fermento líquido provisto por una industria láctea local. Dicho fermento se sembró en leche y se incubó a 37°C. Del coágulo obtenido se aislaron tres cepas de *L. bulgaricus* mediante tres pasajes sucesivos por colonia aislada en medio de Lee (Lee y col., 1974), MRS (Man y col., 1960) y Lee lactosa. Todas las incubaciones se realizaron a 37°C previo sellado de las cajas en bolsas de baja permeabilidad al oxígeno, con lo cual se logró un mejor desarrollo de los lactobacilos. Después de cada aislamiento se confirmó la pureza del cultivo mediante observaciones microscópicas de extendidos coloreados con Gram y con azul de metileno. En la Figura 1 podemos observar una tinción de Gram correspondiente a un fermento mixto de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* a partir del cual se realizaron los aislamientos según se detalla en el siguiente esquema.

Esquema de aislamiento de bacterias

fermento → repique en leche → agotamiento en agar:



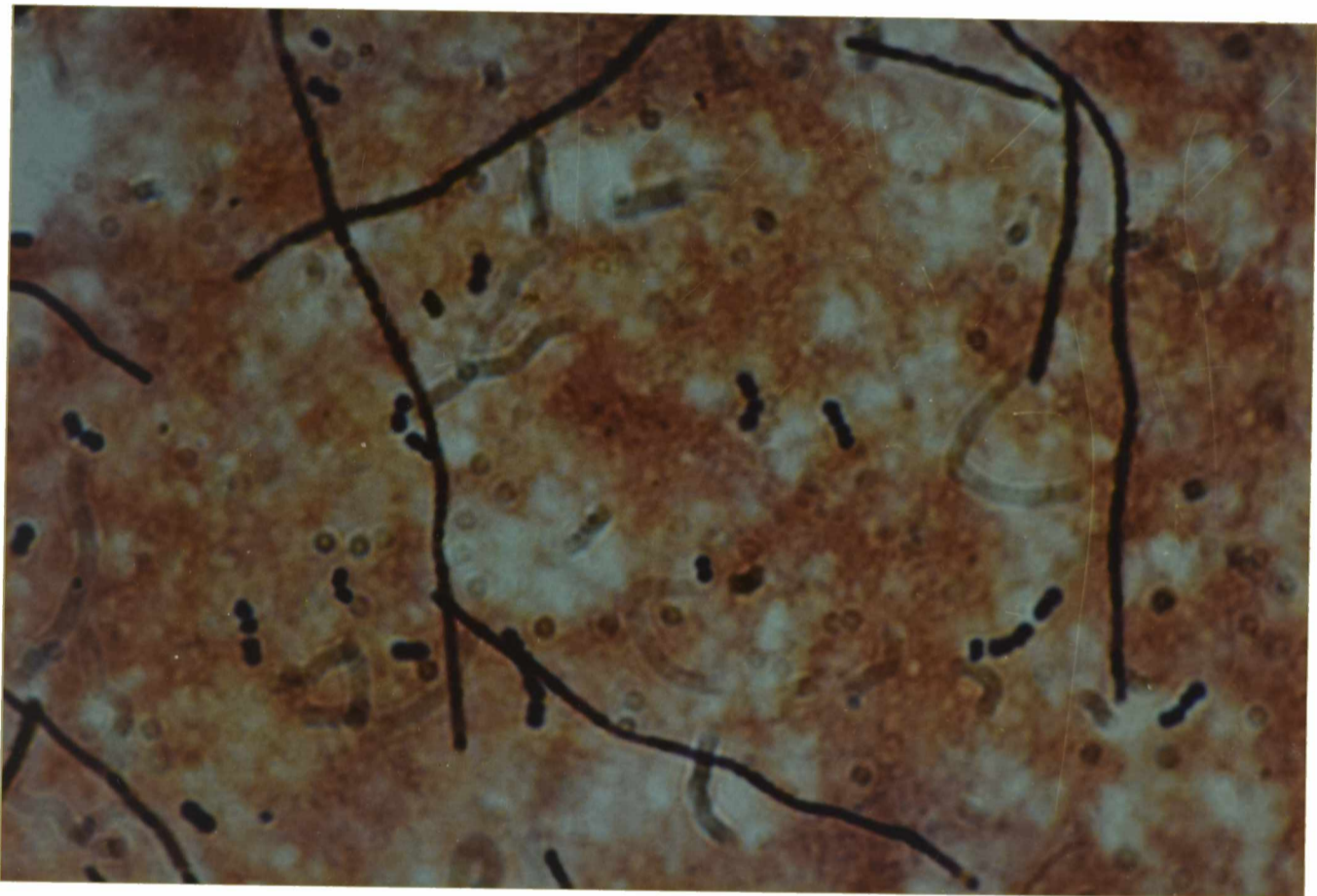


Figura 1: Micrografía de un extendido de fermento para yogur con tinción de Gram (Aumento utilizado: 1.200x).

3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION

El primer agotamiento se realizó en medio de Lee. En este medio las colonias de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* se diferencian por su capacidad fermentativa. *S. thermophilus* es capaz de utilizar lactosa y sacarosa produciendo un nivel de acidez tal que vira el indicador púrpura de bromo creosol del medio y forma colonias amarillas (Figura 2). *L. bulgaricus* en cambio, sólo fermenta lactosa y produce, en el mismo medio, colonias blancas (Figura 2).

Las colonias de ambas bacterias, además de diferenciarse por el color, presentan una morfología diferente. Las colonias del lactobacilo son rugosas, de bordes irregulares, en tanto que las de *S. thermophilus* son lisas y de bordes definidos.

El segundo aislamiento se realizó en agar MRS, que es el medio recomendado para el desarrollo de lactobacilos donde se obtuvieron colonias rugosas (Figura 3). Estos lactobacilos también presentan colonias rugosas en agar 1.1.1. (Figura 4).

El tercer aislamiento se realizó en agar MRS del cual se aisló la cepa LBR, o en agar Lee lactosa del cual se aislaron las cepas LBA y LBB.

3.3. Caracterización de las cepas aisladas

Los criterios seguidos para la identificación de bacterias fueron el estudio de la morfología microscópica por medio de coloración con Gram o azul de metileno, desarrollo en caldo a distintas temperaturas y pruebas de fermentación de azúcares (Sistema API).

Los extendidos de las tres cepas coloreados con Gram presentan bacilos Gram positivos con morfología y agrupación característica. En los preparados teñidos con azul de metileno se observan bacilos cortos o largos dependiendo de la condición de crecimiento (Figura 5).

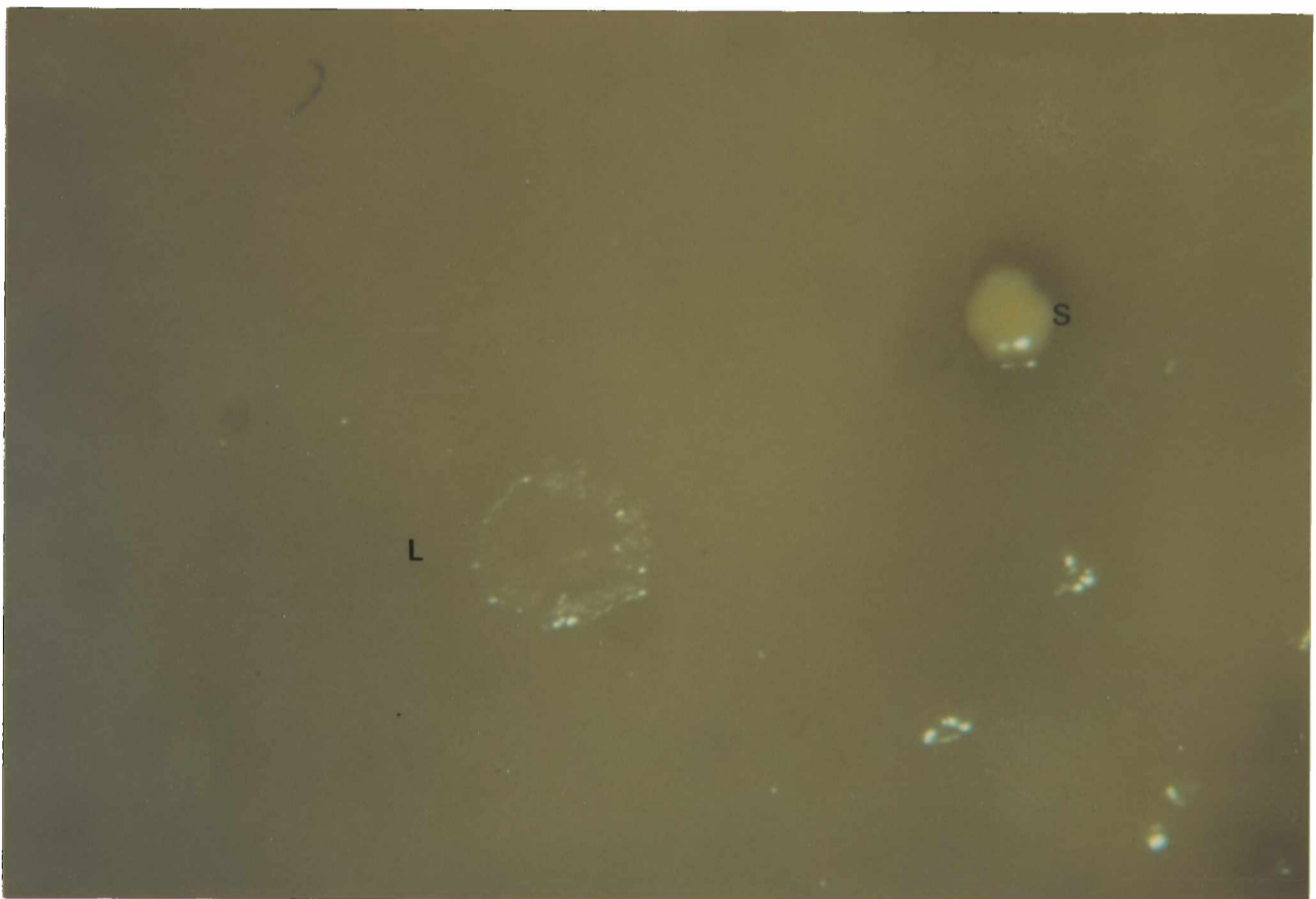


Figura 2: Colonias de *Streptococcus thermophilus* (S) y *Lactobacillus bulgaricus* (L) en medio diferencial de Lee.

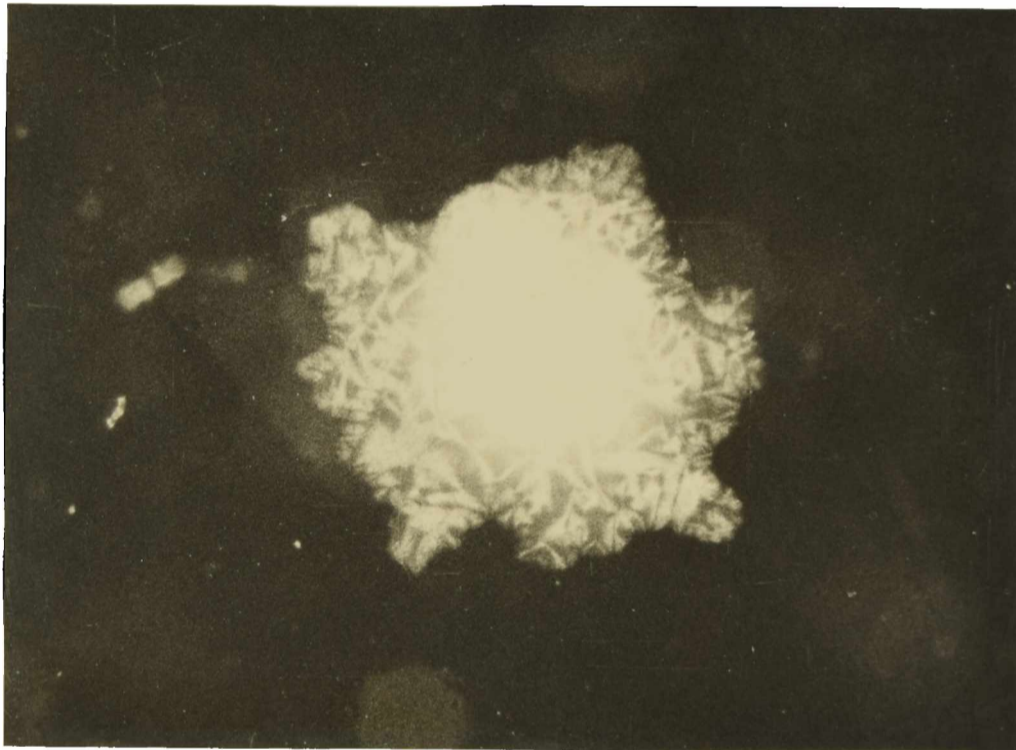


Figura 3: Colonias de *Lactobacillus bulgaricus* en agar MRS.

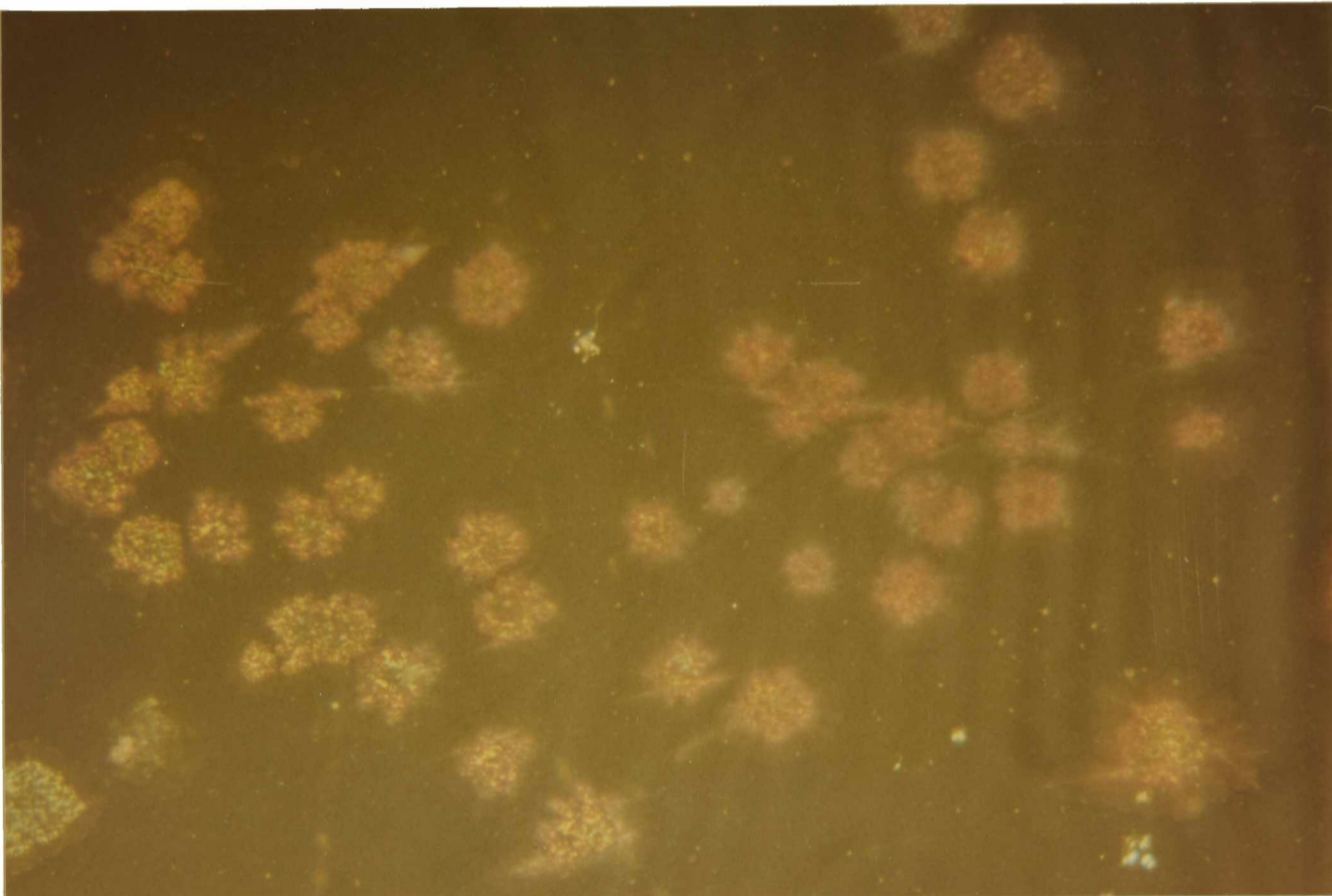


Figura 4: Colonias de *Lactobacillus bulgaricus* en agar 1.1.1..

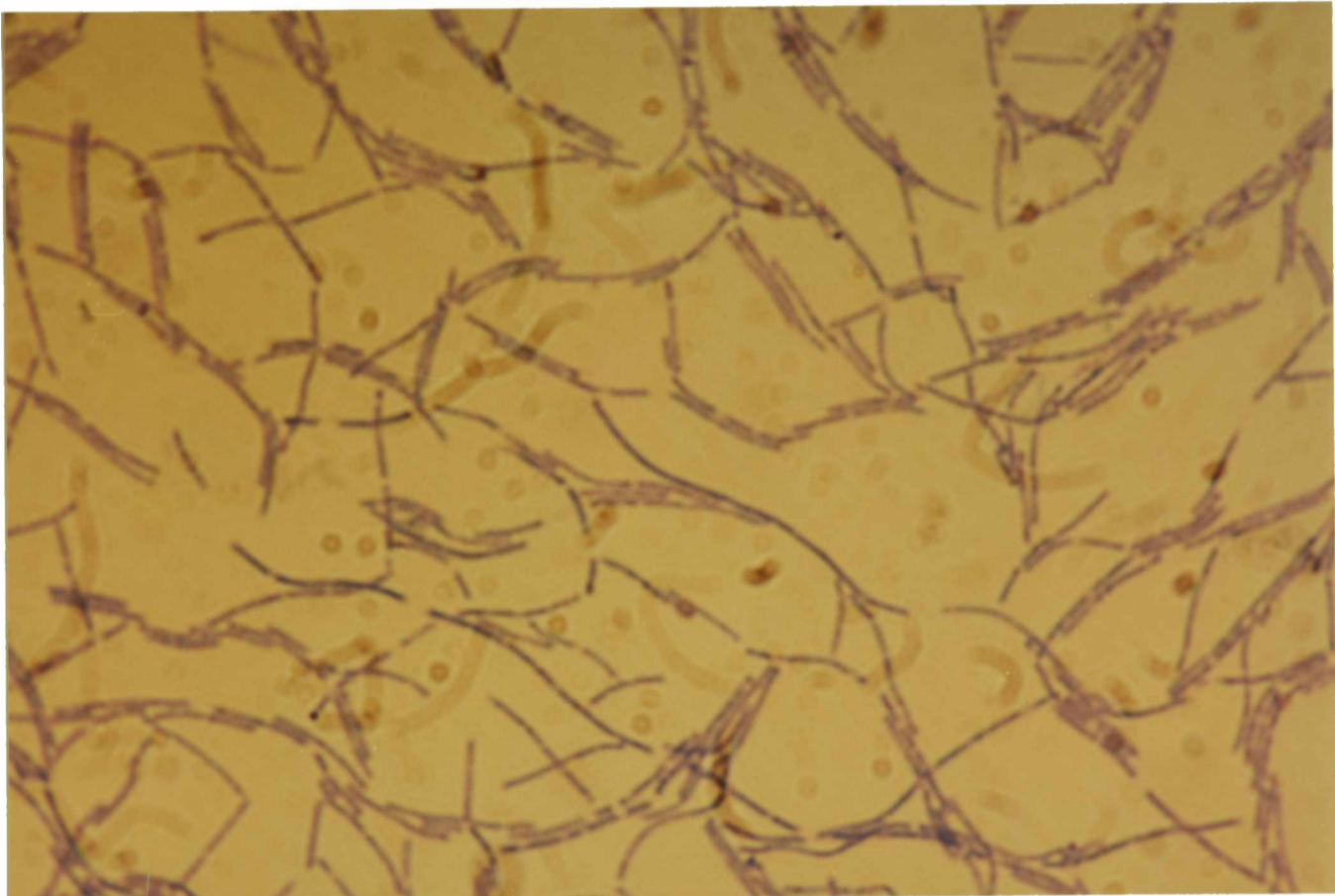


Figura 5: Micrografía de *Lactobacillus bulgaricus* teñido con azul de metileno (Aumento utilizado: 1.200x).

3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION

Las pruebas de desarrollo en caldo a diferentes temperaturas de las tres cepas aisladas y la cepa ATCC 11842 mostraron que las cuatro cepas desarrollan a 37 y 42°C a las 24 hs de incubación, pero no a 20°C, aún después de 7 días de incubación de acuerdo a lo especificado en el manual Bergey para bacterias lácticas termófilas.

Los resultados de las pruebas de fermentación de azúcares se muestran en las Figuras 6, 7 y 8 y en la Tabla 2. A las 48 hs de incubación los únicos hidratos de carbono fermentados por las cepas LBA y LBB fueron glucosa, lactosa y manosa. La cepa LBR, además de fermentar los azúcares mencionados, utiliza también fructosa. Los patrones de fermentación para *L. bulgaricus* detallados en el manual Bergey y en la tabla de identificación del sistema API 50 CHL (Ver Tabla 1 de Introducción)(Bergey, 1986; Garvie, 1984) indican que el 99% de las cepas fermentan glucosa, fructosa y lactosa y un 25% manosa y galactosa. El patrón de fermentaciones obtenido nos indica que las cepas LBA, LBB y LBR pertenecen a la especie *L. delbrueckii* subespecie *bulgaricus* dado que ninguna de ellas fermenta sacarosa ni maltosa, lo que permite diferenciarlas de otros lactobacilos.

3.4. Características de crecimiento de las cepas aisladas

Con el objetivo de conocer el comportamiento de las cepas aisladas en distintos medios, se realizaron cinéticas de crecimiento y acidificación en leche y medio de cultivo con glucosa, en presencia y ausencia de Tween 80.

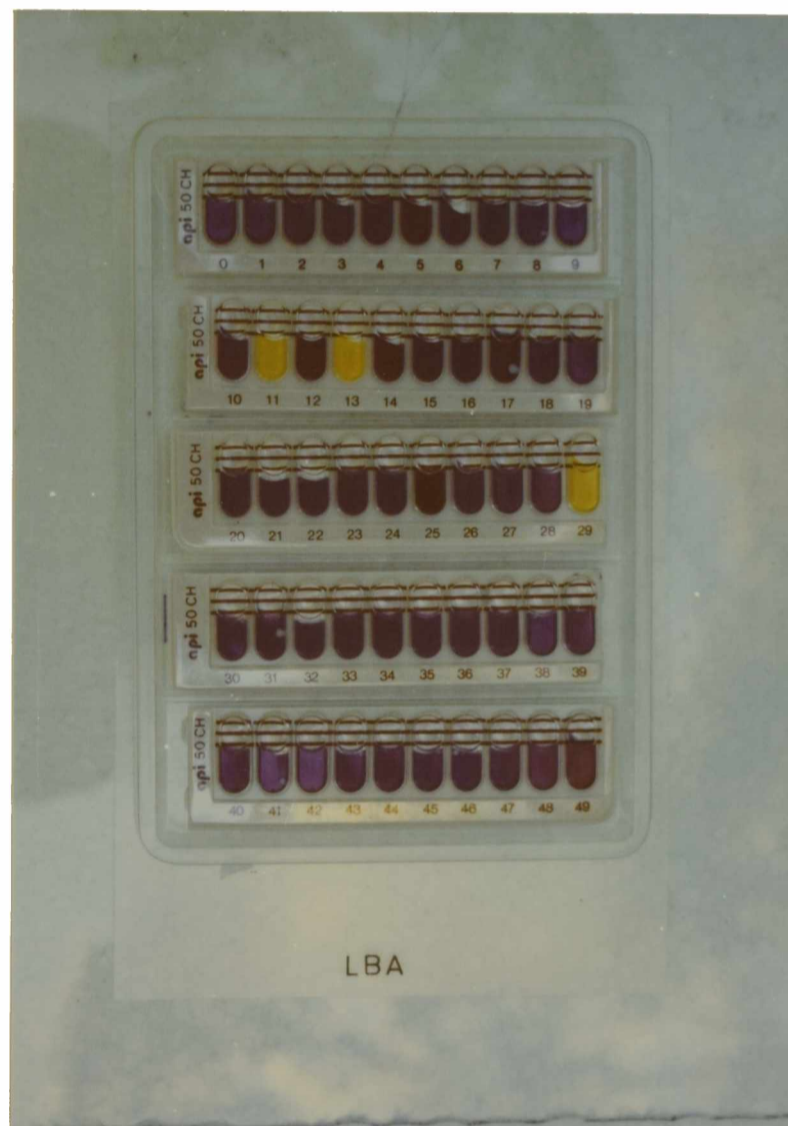


Figura 6: Fermentación de azúcares por *Lactobacillus bulgaricus* LBA.

3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION



Figura 7: Fermentación de azúcares por *Lactobacillus bulgaricus* LBB.

3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION

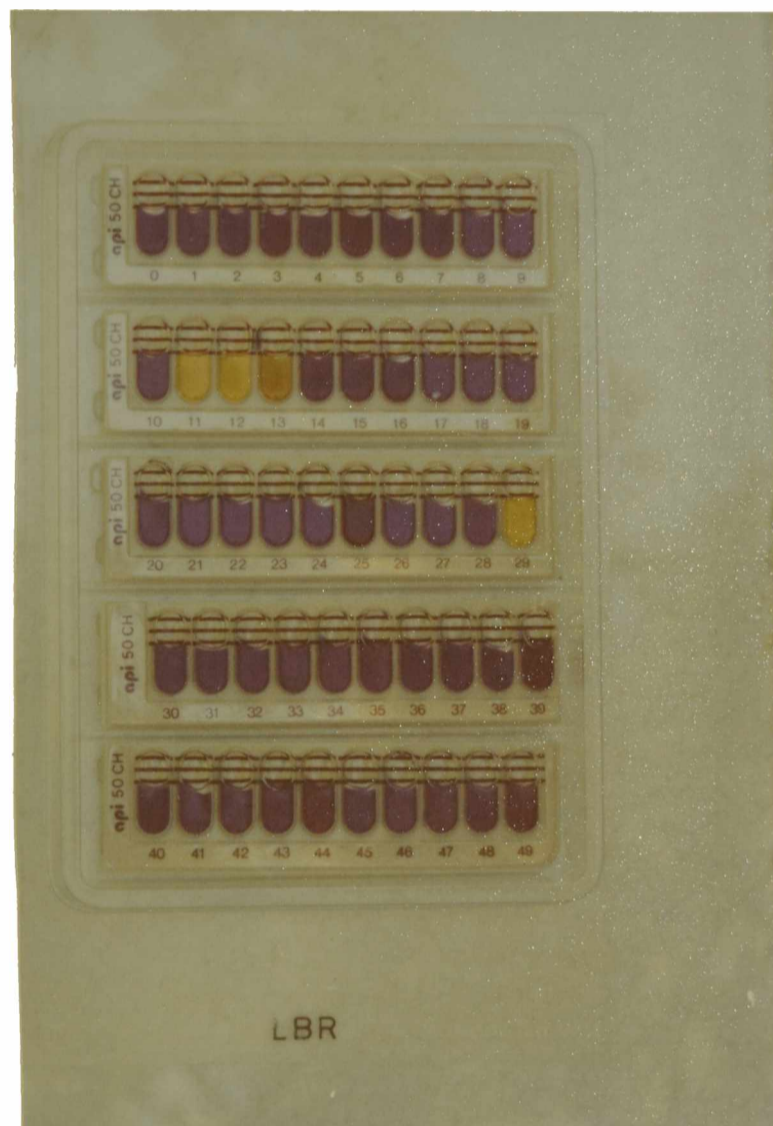


Figura 8: Fermentación de azúcares por *Lactobacillus bulgaricus* LBR.

3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION

Tabla 2: Fermentación de azúcares por cepas de *Lactobacillus bulgaricus* incubadas a 37°C durante 48 hs.

Código API	Azúcar	Cepas		
		LBA	LBB	LBR
0	Control			
1	Glicerol			
2	Eritritol			
3	D-Arabinosa			
4	L-Arabinosa			
5	Ribosa			
6	D-Xilosa			
7	L-Xilosa			
8	Adonitol			
9	β -Metil-xilósido			
10	Galactosa			
11	D-Glucosa	+	+	+
12	D-Fructosa			+
13	D-Manosa	+	+	+
14	L-Sorbosa			
15	Ramnosa			
16	Dulcitol			
17	Inositol			
18	Manitol			
19	Sorbitol			
20	α -Metil-D-manósido			
21	α -Metil-D-glucósido			
22	N-Acetil-glucosamina			
23	Amigdalina			
24	Arbutina			
25	Esculina			
26	Salicina			
27	Celobiosa			
28	Maltosa			
29	Lactosa	+	+	+
30	Melibiosa			
31	Sacarosa			
32	Trehalosa			
33	Inulina			
34	Melezitosa			
35	D-Rafinosa			
36	Almidón			
37	Glucógeno			
38	Xilitol			
39	β -Gentiobiosa			
40	D-Turanosa			
41	D-Lixosa			
42	D-Tagatosa			
43	D-Fucosa			
44	L-Fucosa			
45	D-Arabitól			
46	L-Arabitól			
47	Gluconato			
48	2 ceto-gluconato			
49	5 ceto-gluconato			

+ Fermentación del azúcar. En los restantes casos no se observó fermentación del azúcar.

3.4.1. Cinéticas de acidificación en leche

Para conocer el comportamiento de las bacterias en leche se realizaron cinéticas de acidificación a dos temperaturas, 40 y 42°C. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 9 y 10 y en la Tabla 3.

En la Figura 9 se presentan las cinéticas de acidificación en leche a 40°C de las tres cepas aisladas. Si se comparan las cinéticas obtenidas con las cepas LBA y LBB se observa que *L. bulgaricus* LBB presenta una velocidad de acidificación levemente mayor partiendo de un número de bacterias 1,3 veces menor, en tanto que los tiempos de coagulación son iguales para ambas bacterias (Tabla 3).

LBR en cambio, presenta una velocidad de acidificación más lenta aunque parte de un número de bacterias mayor, además, el tiempo de coagulación es de 4 hs 20 min mientras que LBB y LBA presentan un tiempo de coagulación de 2 hs 45 min.

Cuando las cinéticas de acidificación se realizan a 42°C (Figura 10), se acentúa la diferencia entre LBA y LBB. Ambas cepas presentan una velocidad y tiempo de acidificación semejantes; sin embargo, el recuento inicial de bacterias para la cepa LBA es 10 veces superior al correspondiente a LBB. A 42°C LBR sigue siendo la cepa que presenta una velocidad de acidificación más lenta y llega a un nivel de acidez menor que LBB y LBA el cual se mantiene constante hasta las 6 hs de incubación.

Comparando la fase de latencia correspondiente a las curvas de acidificación a ambas temperaturas se observa que la misma es mayor cuando las bacterias se incuban a 42°C. Posiblemente debido a que a 42°C se parte de un número de microorganismos iniciales menor que a 40°C.

Cabe destacar que el distinto comportamiento de las cepas en cuanto a la capacidad acidificante puede deberse no sólo a diferencias en la capacidad de fermentar el azúcar sino también a diferencias en otras actividades

Tabla 3: Recuento de bacterias iniciales y finales obtenidos en las cinéticas en leche.

Cepa	(UFC/ml) $\times 10^{-8}$ inicial	(UFC/ml) $\times 10^{-8}$ final	Tiempo de coagulación
Temperatura de incubación: 40°C			
LBA	0,48	2,8	2hs 45 min
LBB	0,27	6,0	2hs 45 min
LBR	0,80	1,8	4hs 20 min
Temperatura de incubación: 42°C			
LBA	0,13	7,0	4hs 10 min
LBB	0,013	1,8	3hs 50 min
LBR	0,02	0,68	4hs 45 min

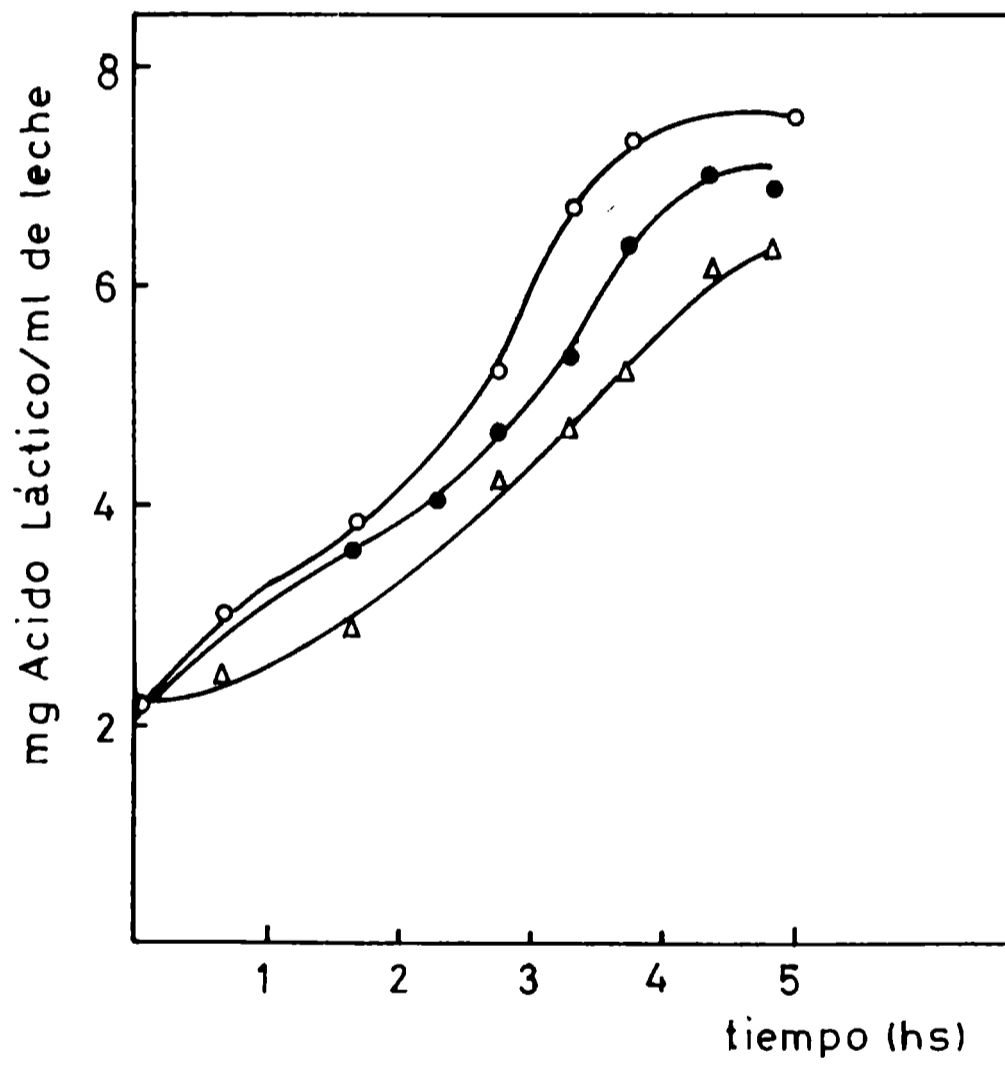


Figura 9: Cinética de producción de ácido láctico por *Lactobacillus bulgaricus* (●), LBA, (○) LBB y (Δ) LBR incubados a 40°C.

metabólicas como la capacidad de hidrolizar las caseínas de la leche.

3.4.2. Crecimiento de *Lactobacillus bulgaricus* en leche

El desarrollo de *L. bulgaricus* en leche se estudió mediante las cinéticas de crecimiento por recuento de células viables (Figura 11) y por incremento de la masa celular por lectura de la absorbancia a 480 nm previa resuspensión en Na₂EDTA según se describe en Materiales y Métodos (Kanasaki y col., 1975) (Figura 12). Las cinéticas se realizaron a dos temperaturas, 37 y 42°C.

Las cinéticas en leche determinadas por recuento de células viables (Figura 11) muestran que la velocidad de crecimiento es mayor a 42°C que a 37°C.

Las cinéticas evaluadas por lectura de la A_{480nm} según el método de Kanasaki y col. (1975) (Figura 12) presentan una curva de crecimiento característica, con una fase de latencia, período de crecimiento exponencial y una fase estacionaria y la velocidad de crecimiento obtenida a 42°C es mayor que a 37°C.

3.4.3. Cinéticas de crecimiento en medio de cultivo

Continuando con el estudio de caracterización de las cepas aisladas se realizaron cinéticas de crecimiento en medio de cultivo (MRS base) con glucosa.

Teniendo en cuenta que en determinadas condiciones ciertos ácidos grasos afectan el crecimiento de las bacterias lácticas y sabiendo que el ácido oleico es esencial para el crecimiento de *L. bulgaricus* pues

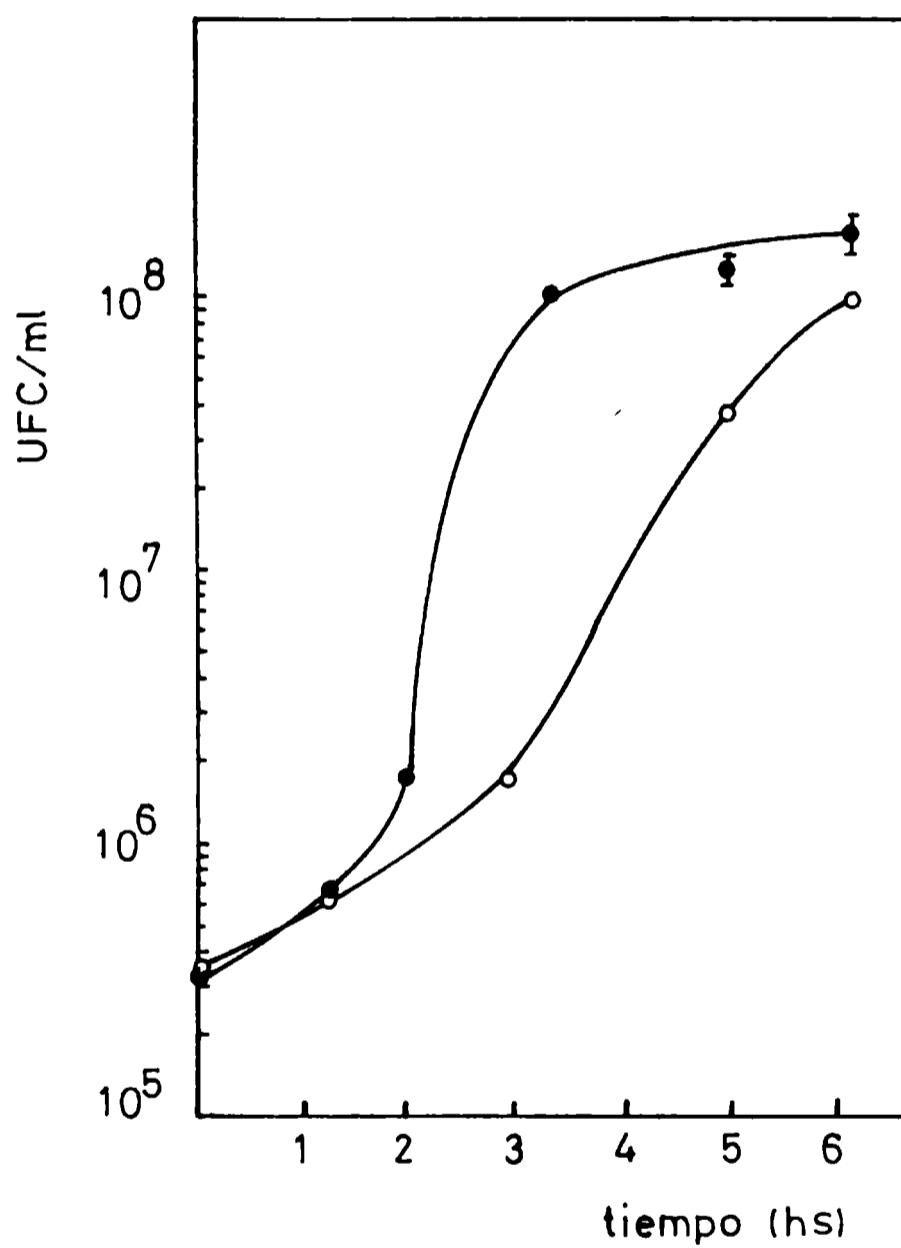


Figura 11: Cinética de crecimiento de *Lactobacillus bulgaricus* LBB en leche a (○) 37 y (●) 42°C.

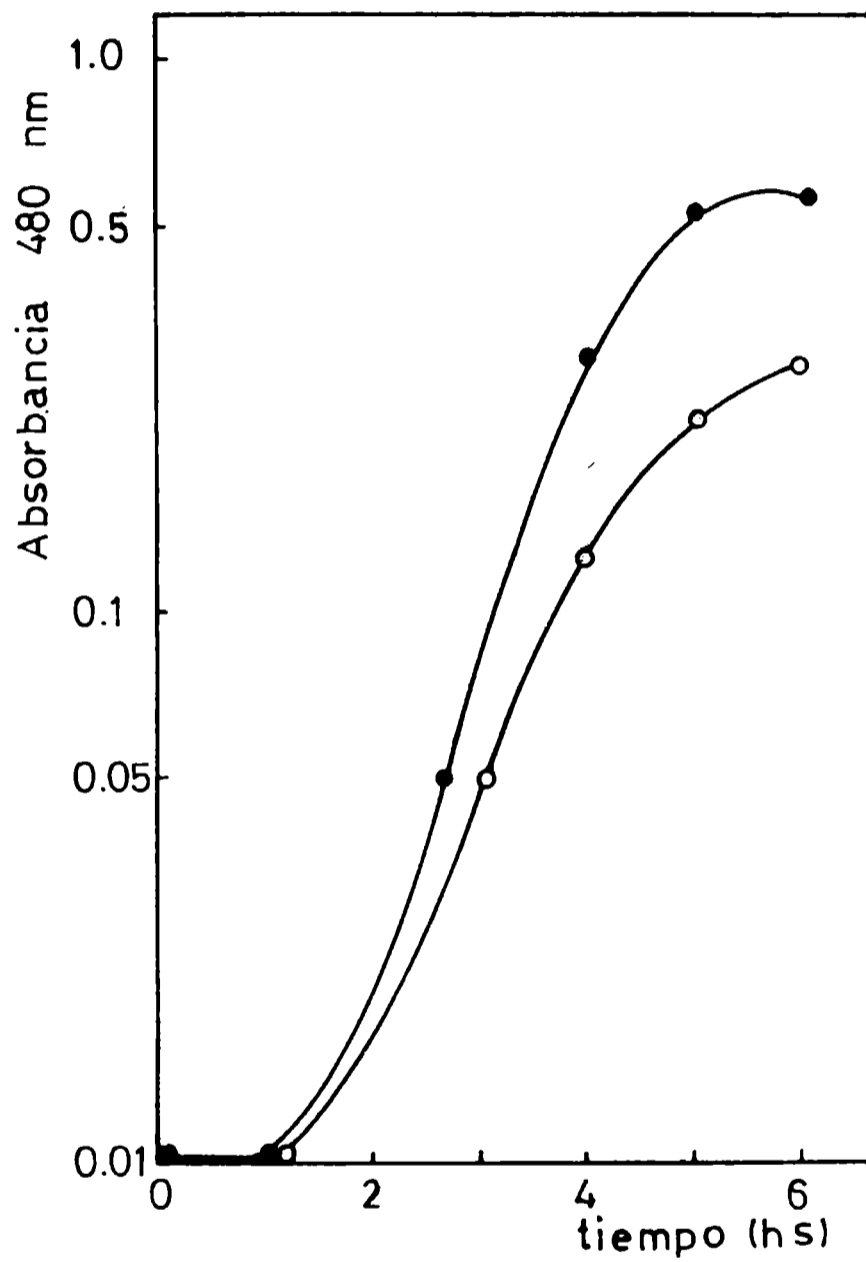


Figura 12: Incremento de absorbancia a 480 nm en función del tiempo de incubación a (○) 37 y (●) 42°C de *Lactobacillus bulgaricus* LBB en leche.

3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION

reemplaza los requerimientos de biotina (Willams y col., 1947) se realizó un estudio comparativo en medio MRS base en presencia y ausencia de Tween 80 (polioxietilen sorbitan monooleato).

A partir de las curvas de crecimiento (A_{550nm} en función del tiempo de incubación) se determinó la fase de latencia y el tiempo de duplicación (g). El parámetro g se calculó mediante la expresión:

$$\ln x/x_0 = t/g \ln 2 \quad (1)$$

donde:

x_0 = número inicial de bacterias

x = número de bacterias a tiempo t

t = tiempo

g = tiempo de duplicación

Los resultados obtenidos se encuentran detallados en la Figura 13 y en la Tabla 4.

En la Figura 13 se muestran las cinéticas de crecimiento de *L. bulgaricus* LBB en presencia y ausencia de Tween 80. Durante el crecimiento en MRS la presencia de Tween 80 disminuyó la fase de latencia en 100 minutos. Los tiempos de duplicación no se vieron afectados por la presencia de Tween 80 (Tabla 4).

Cuando *L. bulgaricus* LBR crece en medio MRS glucosa, con o sin Tween, presenta un período de latencia de 75 minutos y un tiempo de duplicación semejante en las dos condiciones de crecimiento (Tabla 4).

Comparando el comportamiento de LBB y LBR en medio con glucosa se observa que la presencia de Tween 80 ejerce un efecto diferente sobre el desarrollo de ambas cepas. *L. bulgaricus* LBB se ve favorecida por la presencia de esta sustancia dado que acorta su período de latencia; en cambio, *L. bulgaricus* LBR no modifica sus parámetros de crecimiento.

3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION

Tabla 4: Fase de latencia y tiempo de duplicación (g) de *Lactobacillus bulgaricus* LBB, y LBR en distintos medios de crecimiento a 37°C.

Cepas	LBB		LBR	
	Con Tween 80	Caldo MRS base + glucosa Sin Tween 80	Con Tween 80	Sin Tween 80
Latencia (min)	70	170	75	75
g (min)	235	230	250	260

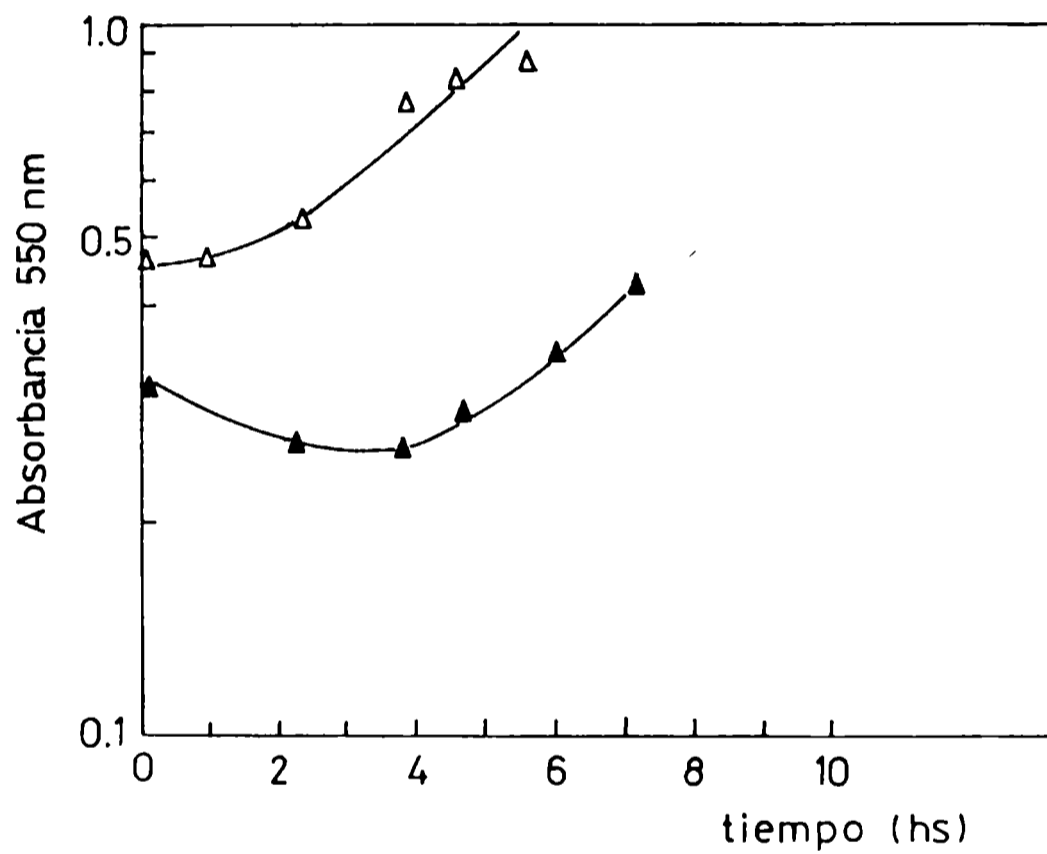


Figura 13: Cinéticas de crecimiento de *Lactobacillus bulgaricus* LBB en caldo MRS base con y sin Tween 80. ▲ MRS glucosa; △ MRS glucosa + 0,1% Tween 80.

3.5. Actividad proteolítica

Para evaluar la actividad proteolítica mediante el incremento de tirosina TCA soluble, se puso a punto la técnica de Hull (1947) con las modificaciones detalladas en Materiales y Métodos. Se realizó una curva de calibración para relacionar la absorbancia a 650 nm con la concentración de tirosina TCA soluble de las muestras (Figura 14). Como se observa en la Figura 14 hay una muy buena correlación lineal ($r = 0,998$) entre la absorbancia a 650 nm y la concentración de tirosina. Con este método se determinó la concentración de nitrógeno TCA soluble de distintas muestras de leches y leches fermentadas con *L. bulgaricus* LBA, LBB y LBR (Tabla 5).

Es importante destacar que existen diferencias en los niveles de tirosina TCA soluble de distintas leches (Juffs, 1973 a y b; Tiburzi y col., 1985). Para una misma leche, el valor de tirosina no se ve afectado por la tindalización ni por la incubación a las temperaturas usuales en la fabricación de yogur (Tabla 5) lo cual indica que el incremento de tirosina en la leche inoculada e incubada para obtener yogur es debido a la actividad metabólica bacteriana.

La leche pasteurizada es una leche fluída de distribución comercial, la leche A y la leche B son leches reconstituídas provenientes de distintas partidas y distintos orígenes. Los experimentos que se describen en capítulos posteriores se realizaron con la leche B (LPR_B).

Cuando las tres cepas se desarrollan en leche se produce un incremento de la concentración de tirosina TCA soluble (Tabla 5). Los valores obtenidos son similares a los descritos por Rajagopal y Sandine (1990) con varias cepas de *L. bulgaricus*. Después de coagular la leche con *L. bulgaricus* LBA y LBB se llegó a una concentración de tirosina TCA soluble de 100 y 106 $\mu\text{g/ml}$ partiendo de una leche con una concentración de 60 μg de tirosina por ml. La leche fermentada con *L. bulgaricus* LBR, alcanzó un nivel de

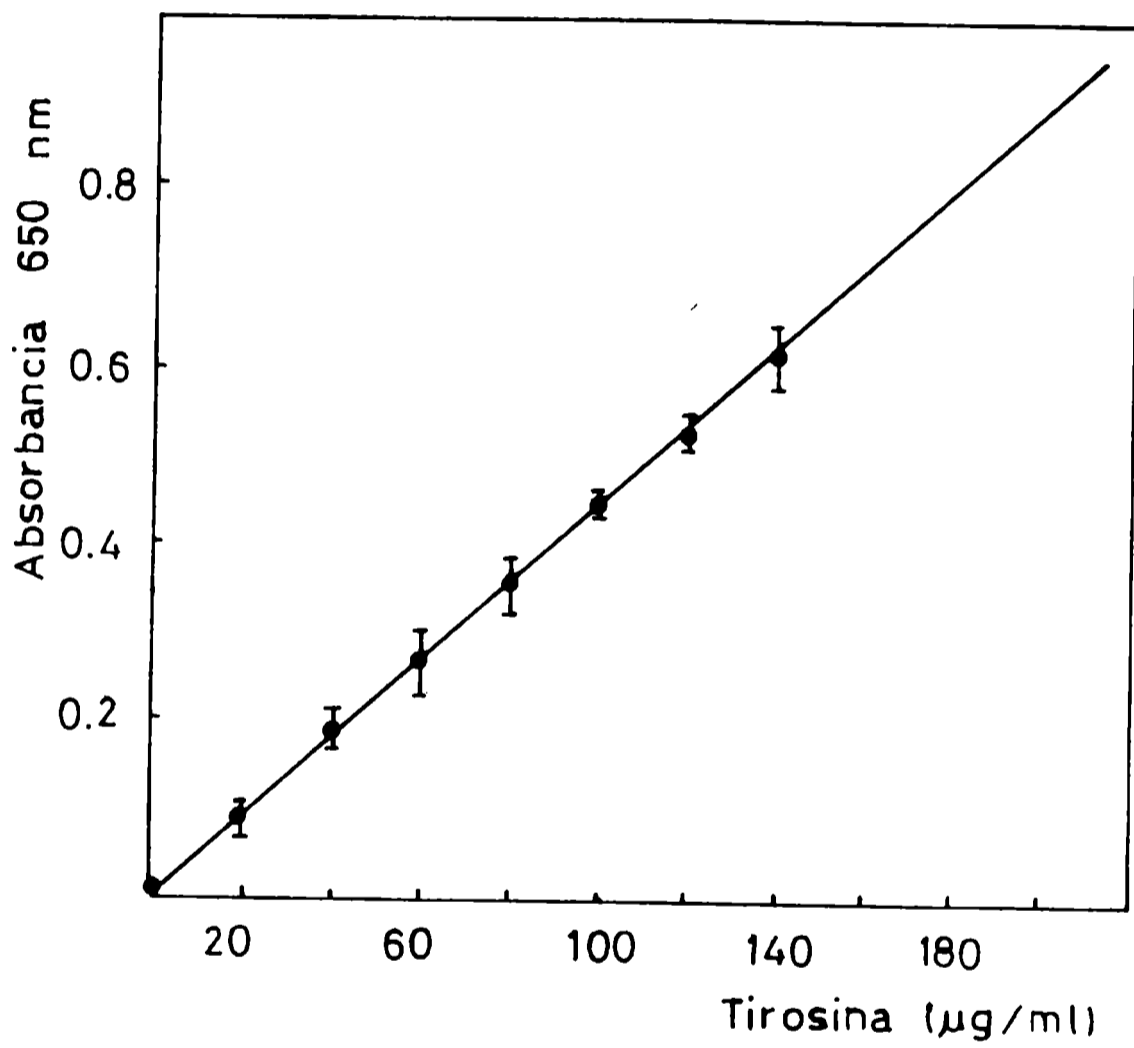


Figura 14: Curva de calibración con tirosina patrón ($r = 0,998$).

Tabla 5: Niveles de tirosina soluble en leche

Muestra	Tirosina ($\mu\text{g/ml}$)	
	I	II
Leche descremada pasteurizada	32	38
Leche en polvo descremada reconstituída 12% (LPR_A)	65	60
LPR_A tinalizada	61	60
LPR_A tinalizada incubada a 37°C	61	62
LPR_B tinalizada	75	75
LPR_A fermentada por <i>L. bulgaricus</i> LBB a 37°C	106	107
LPR_A fermentada por <i>L. bulgaricus</i> LBA a 37°C	98	101
LPR_A fermentada por <i>L. bulgaricus</i> LBR a 37°C	70	74

I y II: duplicados.

A y B: indican diferentes partidas de leche

3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION

nitrógeno soluble expresado como tirosina de 74 $\mu\text{g/ml}$ partiendo de la misma leche.

En base a las características metabólicas estudiadas en este capítulo, acidificación de leche, crecimiento en medio de cultivo, fermentación de azúcares y proteolisis de leche, se puede concluir que las cepas LBA y LBB son semejantes entre sí y diferentes de LBR.

ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE
Lactobacillus bulgaricus

4. ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE LACTOBACILLUS BULGARICUS

El objetivo de este capítulo es estudiar la actividad proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus* en leche y medio de cultivo y la influencia de las condiciones de crecimiento; composición del medio de cultivo y temperatura de incubación en la expresión de esta actividad bacteriana.

4.1. Consideraciones generales

La industria láctea requiere fermentos con actividades metabólicas definidas para mantener la calidad del producto final. Los mismos deben seleccionarse en base a ciertas propiedades entre las que se pueden mencionar la producción de ácido láctico, producción de polisacáridos extracelulares, actividad proteolítica bacteriana, producción de aromas, etc.

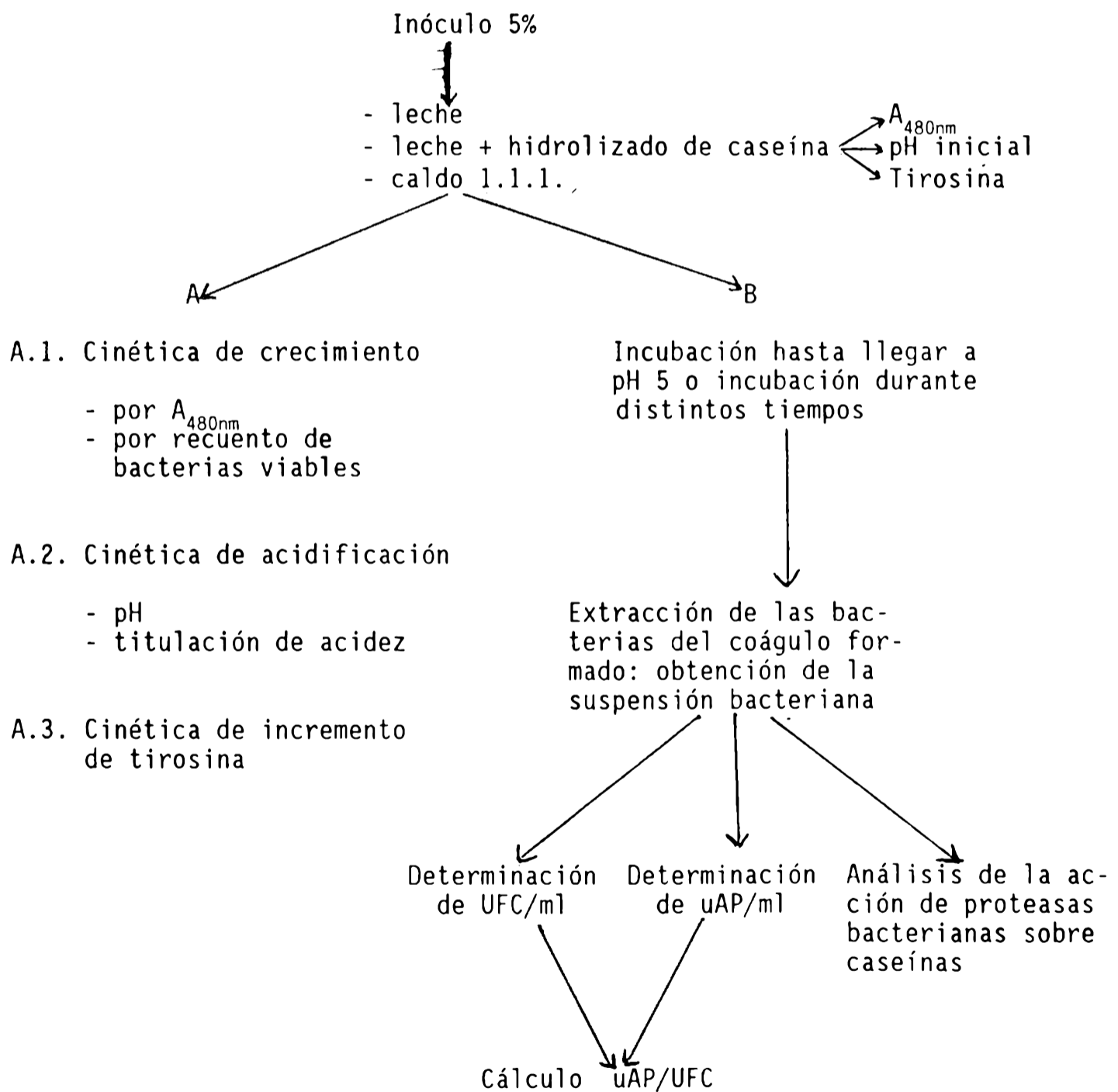
Para la elaboración de yogur se utilizan fermentos compuestos por cepas de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Durante el crecimiento simbiótico de ambas cepas *S. thermophilus* produce CO₂ y ácido fórmico. El ácido fórmico interviene en la síntesis de bases púricas del lactobacilo, estimulando su desarrollo. Este estímulo se evidencia por un acortamiento de cadenas durante su crecimiento (Susuki y col., 1986 a y b).

Por su parte *S. thermophilus*, requiere la actividad proteolítica del lactobacilo dado que la concentración de péptidos y aminoácidos libres en leche no es suficiente para su completo desarrollo (Higashio y col., 1977a; Mills y Thomas, 1981). Por ello es importante conocer esta propiedad metabólica del lactobacilo en leche que es la condición fisiológica de crecimiento y el medio en el cual se desarrollan las bacterias para su aplicación industrial. Para evaluar la actividad proteolítica de *Lactobacillus*

4. ACTIVIDAD PROTEOLITICA

bulgaricus en este trabajo se determinó el incremento de nitrógeno soluble durante el crecimiento bacteriano y la actividad proteolítica específica siguiendo en forma parcial o completa el Esquema 1.

Esquema 1: Metodología empleada para evaluar la actividad proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus*.



4.2. Evaluación de la actividad proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus*

LBB por incremento de tirosina durante el crecimiento bacteriano

4.2.1. Cinéticas de crecimiento, acidificación y producción de tirosina en leche

Para la realización de estos estudios se eligió la cepa *Lactobacillus bulgaricus* LBB por ser la que acidificaba la leche con mayor rapidez y por producir mayor incremento de tirosina en leche (Tabla 5). La actividad proteolítica bacteriana se evaluó, en una primera etapa, mediante la determinación de la variación de concentración de tirosina TCA soluble de la leche durante el crecimiento bacteriano. Simultáneamente se determinó la acidificación de la leche y el crecimiento del fermento. Para ello se sembró un inóculo fresco de *L. bulgaricus* LBB en leche al 12% p/v y se realizaron las determinaciones de acidez por titulación con NaOH 0,1 N, dosaje de tirosina por el método de Hull (1947) y recuento bacteriano en agar 1.1.1. como se detalla en Materiales y Métodos y Esquema 1. Estas cinéticas se realizaron a 42°C y los resultados obtenidos se graficaron en función del tiempo de incubación según se muestra en la Figura 15.

A partir de las cinéticas de crecimiento se calculó el tiempo de duplicación (g) como se indicó anteriormente (ecuación (1)).

En la Figura 15 se observa que la cinética de crecimiento está asociada a la producción de tirosina y de ácido láctico. Los tiempos de duplicación obtenidos en dos experiencias realizadas fueron $21,0 \pm 0,3$ min.

Es importante destacar que en ambas experiencias el tiempo de duplicación es el mismo (Tabla 6). Para futuros experimentos se eligieron las condiciones de la experiencia 1 (Tabla 6); para partir de 2 a 5×10^6 bacterias por ml a fin de obtener tiempos de fermentación más cortos dado que en la experiencia 2 se obtuvo una fase de latencia más larga.

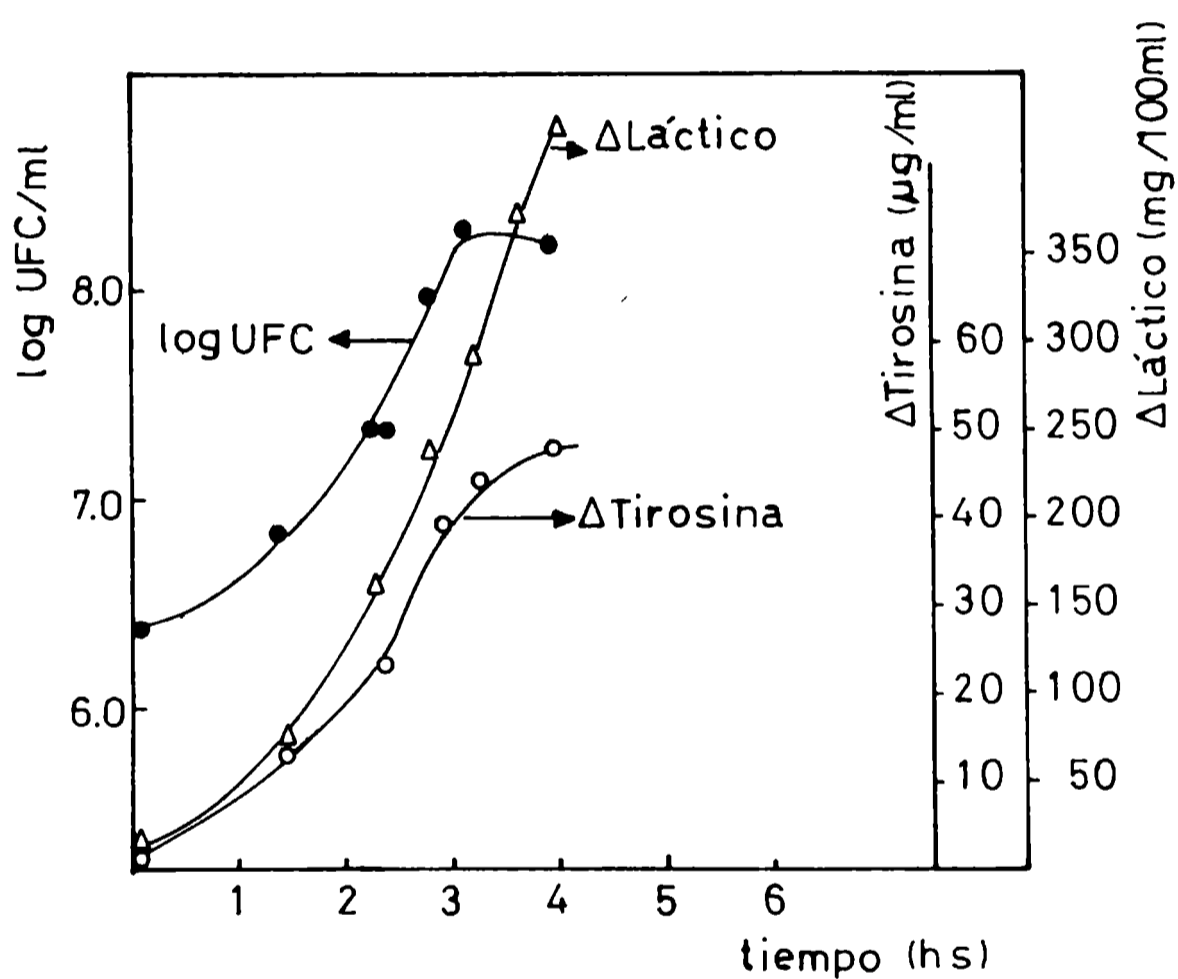


Figura 15: Cinéticas de crecimiento, acidificación y producción de tirosina soluble por *Lactobacillus bulgaricus* LBB en leche incubada a 42°C.

Tabla 6: Parámetros de crecimiento obtenidos en las cinéticas de desarrollo de *Lactobacillus bulgaricus* LBB en leche a 42°C.

Experiencia	UFC/ml inicial	g (min)	Fase de latencia (min)
1	2,68 10 ⁶	20,7	30
2	0,58 10 ⁶	21,3	120

4.2.2. Influencia de la temperatura de incubación en el desarrollo y actividad metabólicas de *Lactobacillus bulgaricus* LBB

Con el objeto de estudiar la influencia de la temperatura de incubación sobre la actividad proteolítica se evaluó esta actividad mediante la determinación del incremento de tirosina soluble durante el desarrollo bacteriano. Para este estudio se realizaron, en paralelo, cinéticas de crecimiento por absorbancia a 480 nm (Kanasaki y col., 1975), determinación de tirosina TCA soluble y acidificación de la leche. Estos estudios se realizaron en leche con una concentración inicial de tirosina de 61 $\mu\text{g/ml}$. Las temperaturas de incubación elegidas fueron 37 y 42°C, ambas utilizadas en la industria para la obtención de productos fermentados. A intervalos regulares se tomaron muestras para cada determinación. En cada caso se realizaron los blancos respectivos.

En la Figura 16 se observa la cinética de crecimiento bacteriano determinada por el incremento de absorbancia a 480 nm. El crecimiento bacteriano fue mayor a 42°C que a 37°C y los tiempos de duplicación fueron de 64 y 78 minutos respectivamente (Tabla 7). Estos fueron mayores que los obtenidos con la partida de leche correspondiente a los experimentos descritos en la Tabla 6.

Si se evalúa la cinética de acidificación (Figura 17) se observa que la velocidad de producción de ácido láctico a 42°C es mayor que a 37°C concordando con los tiempos de duplicación, a 37°C se obtuvo un tiempo de duplicación mayor y una velocidad de acidificación menor que a 42°C.

La liberación de tirosina al medio se presenta en la Figura 18. En las cinéticas de liberación de tirosina se observa un incremento del nivel de este aminoácido durante el crecimiento bacteriano. A las 5 hs 30 min de incubación el valor de tirosina TCA soluble alcanzado por el cultivo incubado a 37°C fue menor que el valor alcanzado a 42°C, siendo de $85 \pm 3 \mu\text{g/ml}$

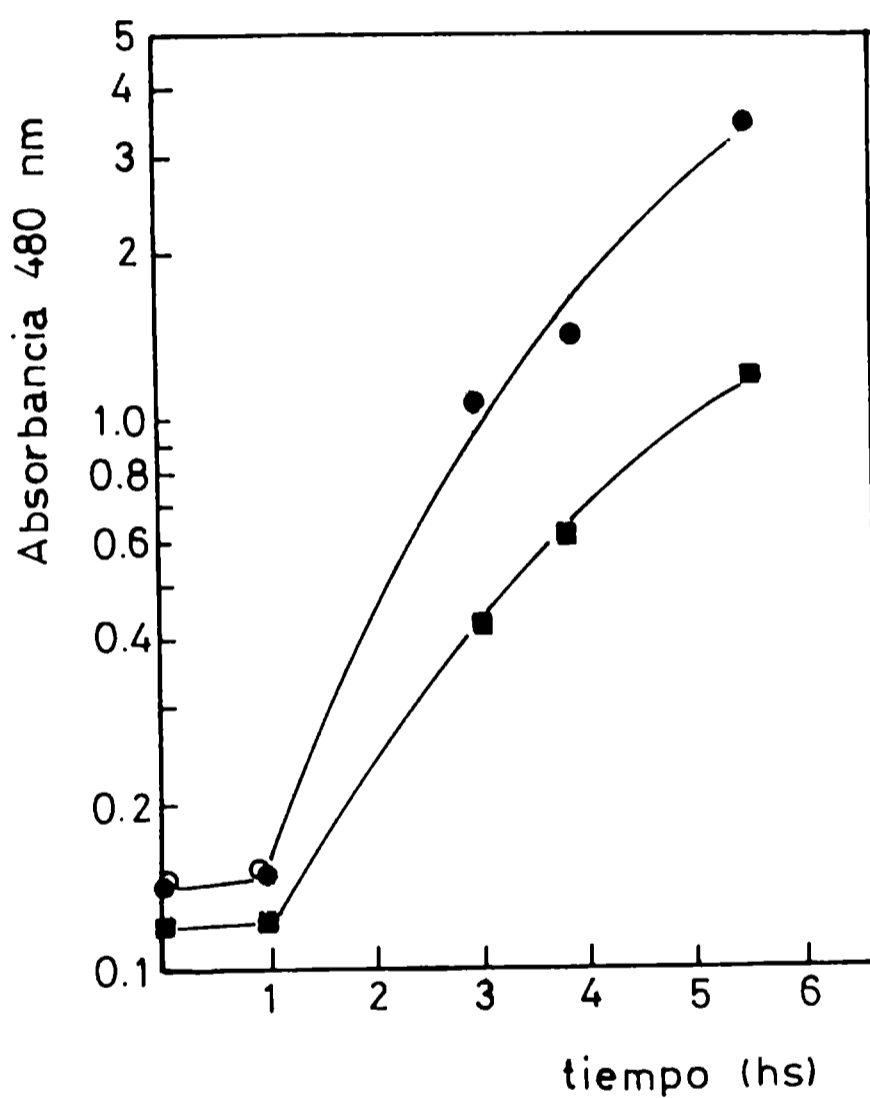


Figura 16: Cinética de crecimiento por $A_{480\text{nm}}$ de *Lactobacillus bulgaricus* LBB en leche a 37 (■) y a 42°C (●).

Tabla 7: Tiempos de duplicación (g) y velocidades de acidificación de *Lactobacillus bulgaricus* LBB en leche a 37 y 42°C

Medio	Temperatura de incubación	
	37°C	42°C
	Leche	Leche
g (min)	78	64
Δ ác. láctico a 5 hs 30 min	171	513
velocidad de producción de ácido láctico (mg/min)	0,83	1,75

Δ ác. láctico: mg % de ácido láctico final - mg % ácido láctico inicial.

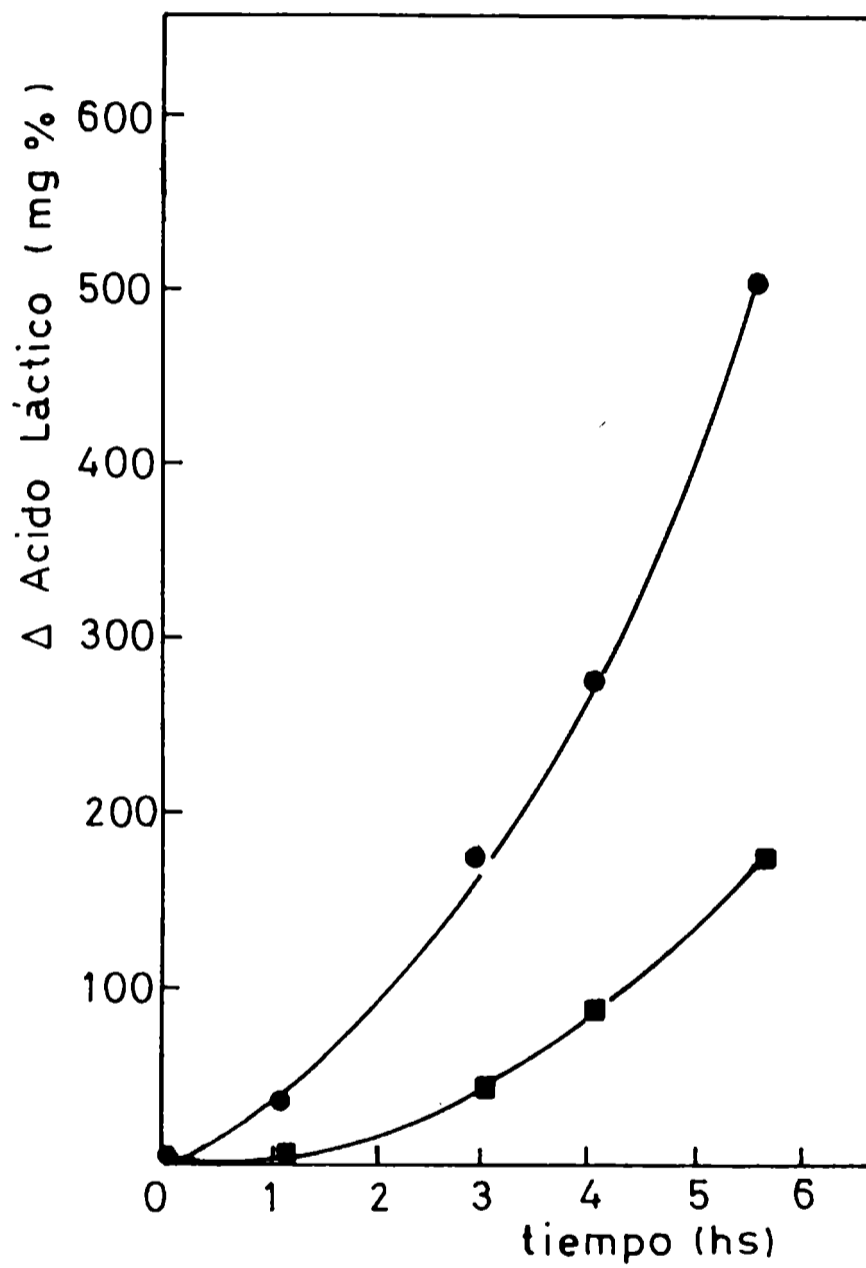


Figura 17: Cinéticas de producción de ácido láctico de *Lactobacillus bulgaricus* LBB en leche a 37 (■) y a 42°C (●).

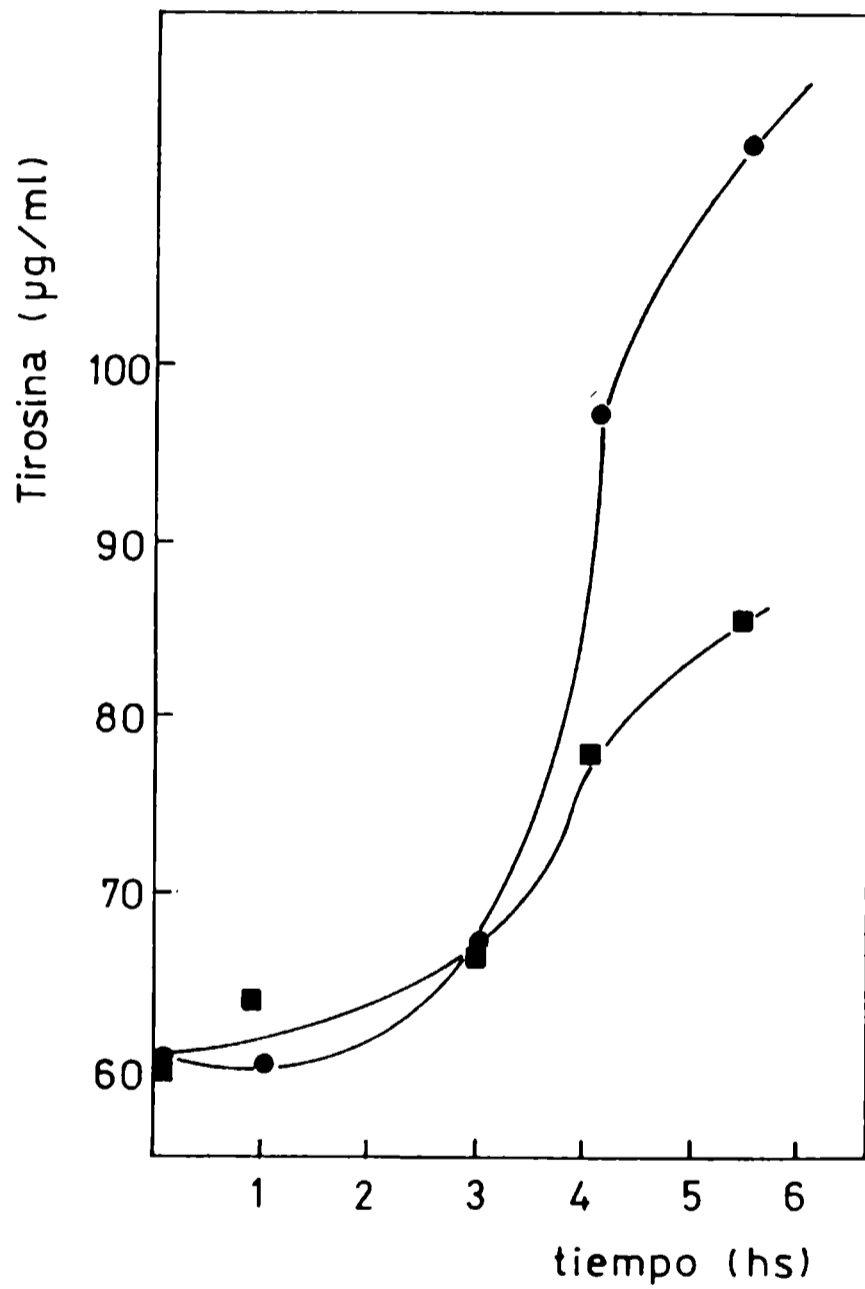


Figura 18: Concentración de tirosina en el medio de crecimiento durante el desarrollo de *Lactobacillus bulgaricus* en leche a 37 (■) y a 42°C (●).

4. ACTIVIDAD PROTEOLITICA

de tirosina TCA soluble a 37°C y $116 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ a 42°C. Es probable que los diferentes valores obtenidos sean debidos a la diferencia en la concentración de bacterias totales a ambas temperaturas.

Nuevos experimentos se realizaron con leche de diferente procedencia (leche A y B). Ambas leches se incubaron con *Lactobacillus bulgaricus* LBB al 5% y después de un cierto tiempo de incubación, cuando el cultivo llegó a pH 5, se determinó el incremento de tirosina producida por masa celular ($A_{480\text{nm}}$) a 37 y 42°C (Tabla 8). Dado que el valor de $\Delta\text{Tyr}/A_{480\text{nm}}$ es mayor en la leche B los experimentos subsiguientes se realizaron con esta partida.

Con el objeto de estudiar la influencia de la concentración de nitrógeno soluble sobre la actividad proteolítica, la leche B ($75 \mu\text{g/ml}$ de tirosina TCA soluble), se adicionó con hidrolizado de caseína para obtener valores finales de tirosina soluble de 125, 155 y $220 \mu\text{g/ml}$. Cada una de ellas fue inoculada con *Lactobacillus bulgaricus* LBB e incubada a 37 y 42°C hasta alcanzar pH 5. De esta manera se obtuvieron células en la misma fase de crecimiento y expuestas a las mismas condiciones de acidez. Cosechando las células a este pH se obtuvo un buen rendimiento celular sin someter a las células a pHs extremos. En cada condición se determinó el nivel de tirosina TCA soluble y la concentración bacteriana por lectura de la absorbancia a 480 nm.

En la Figura 19 A se observan los valores de $\Delta\text{Tyr}/A_{480\text{nm}}$ obtenidos con los cultivos de *Lactobacillus bulgaricus* LBB a 37°C. A medida que se incrementa la concentración de nitrógeno soluble de 70 a $120 \mu\text{g/ml}$ no se observan variaciones en el $\Delta\text{Tyr}/A_{480\text{nm}}$. A contenidos de tirosina mayores (120 a $150 \mu\text{g/ml}$) se observa un descenso del parámetro evaluado, manteniendo un valor mínimo a concentraciones mayores de tirosina soluble (150 a $220 \mu\text{g/ml}$).

Tabla 8: Influencia de la calidad de la leche en la evaluación de Δ Tyr ($\mu\text{g/ml}$) producida durante el desarrollo de *Lactobacillus bulgaricus* LBB referida a la masa celular ($A_{480\text{nm}}$)

Temperatura de incubación ($^{\circ}\text{C}$)	Δ Tyr ($\mu\text{g/ml}$)/ $A_{480\text{nm}}$	
	Leche A	Leche B ^(a)
37	20,7	43
		33
42	15	25
		27

(a) Valores correspondientes a dos experimentos diferentes.

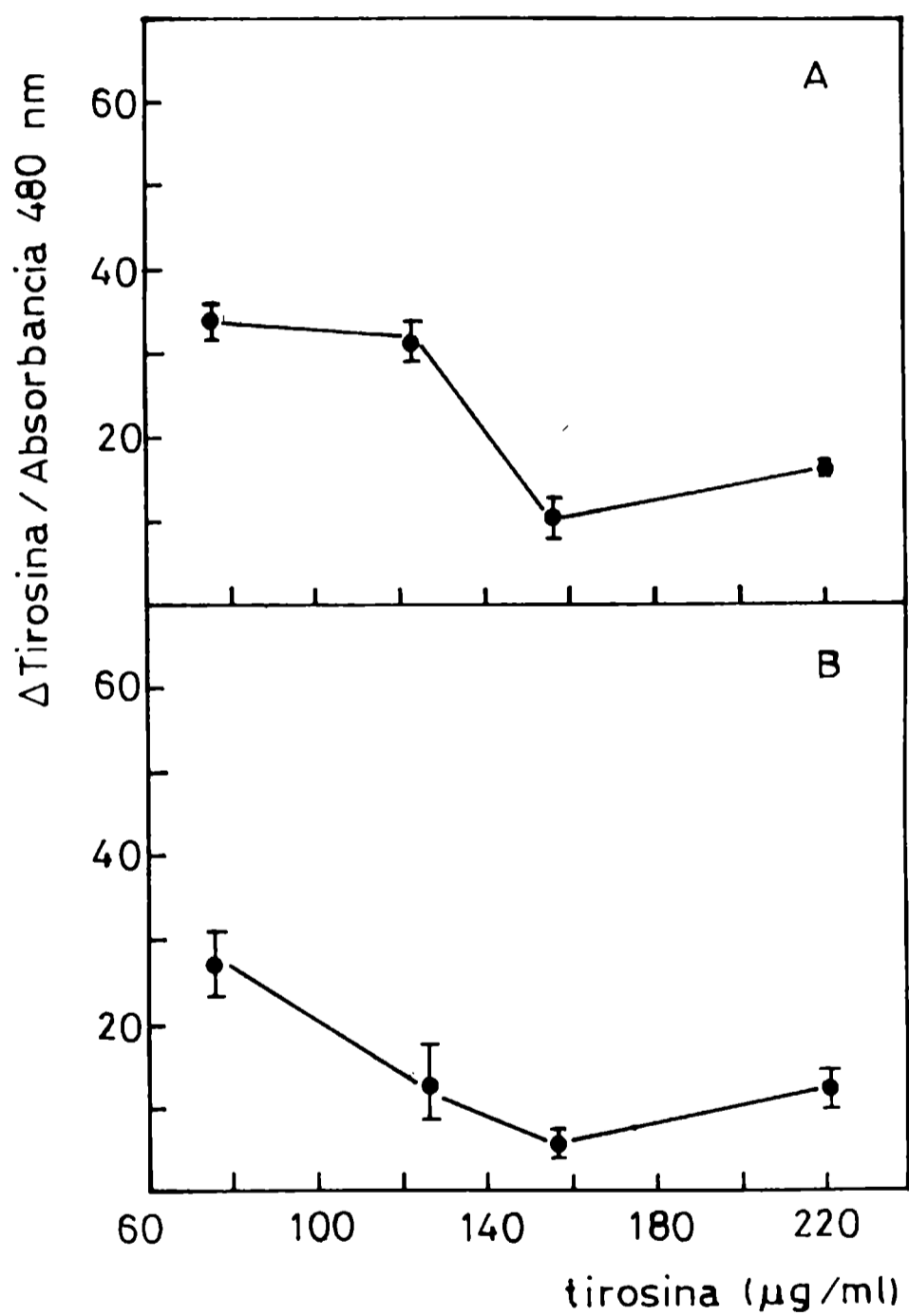


Figura 19: Incremento de tirosina por masa bacteriana en cultivos de *Lactobacillus bulgaricus* LBB desarrollados en leche con distinto nivel de aminoácidos libres a 37 (A) y 42°C (B).

4. ACTIVIDAD PROTEOLITICA

A 42°C (Figura 19 B), el $\Delta\text{Tyr}/A_{480\text{nm}}$ desciende paulatinamente con el incremento de tirosina TCA soluble alcanzando un valor mínimo a 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tirosina.

Estos resultados indican que la concentración de aminoácidos ejerce un efecto sobre la actividad proteolítica de esta cepa y que el mismo depende de la temperatura a la cual se desarrollan las bacterias.

Si bien el incremento de tirosina TCA soluble durante el crecimiento de bacterias en leche es un método ampliamente utilizado para evaluar la actividad proteolítica bacteriana (Juff, 1973a y b; Giori y col., 1983; Griffiths y Phillips, 1984; Giori y col., 1985; Strasser de Saad y col., 1987; Slocum y col., 1988 a y b; Vignolo y col., 1988; Rajagopal y Sandine, 1990), es necesario tener en cuenta que durante el crecimiento la concentración de tirosina evaluada proviene del balance entre la liberación de aminoácidos debido a la actividad proteásica y su captación y consumo. Por consiguiente, en un cultivo donde las bacterias se dividen no se puede diferenciar entre la actividad enzimática en sí misma y el metabolismo bacteriano de aminoácidos. Además, dado que el consumo de aminoácidos está relacionado con el crecimiento bacteriano es posible suponer que estaría afectado por la temperatura y medio de crecimiento. En estreptococos lácticos la captación de péptidos y aminoácidos depende del pH a ambos lados de la membrana (van Boven y Konings, 1986) y también de la interacción con el entorno lipídico (Driessen, 1989) por lo cual es lógico pensar que esté afectado por la temperatura. Por otra parte, debe tenerse en cuenta que al evaluar la actividad proteolítica durante el crecimiento, la misma podría ser afectada por la composición del medio de cultivo y la temperatura de incubación, a nivel de la síntesis y/o la actividad de la enzima.

4.3. Determinación de la actividad proteolítica específica

4.3.1. Puesta a punto del método de obtención de bacterias

Para evaluar la actividad proteolítica se necesita un procedimiento que permita determinar la misma sin la interferencia del consumo de aminoácidos durante el crecimiento bacteriano. Para ello es necesario separar las bacterias del medio de crecimiento. Esto posibilita la determinación de la actividad proteolítica en condiciones constantes y asegura la obtención de resultados comparables. En el caso de las bacterias desarrolladas en caldo 1.1.1. esta separación es posible efectuarla por centrifugación; sin embargo, para cultivos en leche es necesario un método que permita cosechar las células libres de caseínas.

Las micelas caseínicas presentes en la leche, compuestas por submicelas que contienen α , β y κ caseína, están estabilizadas por uniones hidrofóbicas y la presencia de fosfato de calcio coloidal. El descenso del pH a 4,6 solubiliza el fosfato de calcio coloidal lo que permite la interacción electrostática entre micelas promoviendo su precipitación. La separación de las bacterias de las caseínas precipitadas por centrifugación a baja velocidad no resulta entonces un método conveniente dado que gran número de células quedan ocluidas en el coágulo. Para evitar la coagulación Mills y Thomas (1978), Neviani y col. (1984) y Musset y col. (1989) crecieron bacterias lácticas en presencia de β glicerofosfato y separaron las células por centrifugación. Dado que el objetivo de este trabajo es estudiar la actividad proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus* en las condiciones de elaboración de productos lácteos el método antedicho no fue utilizado.

Con el objeto de redissolver el precipitado caseínico se decidió utilizar Na_2EDTA pH 12 para reestablecer el pH y complejar el calcio. El agregado de este compuesto fue utilizado por Kanasaki y col. (1975) para

determinar concentraciones bacterianas de cultivos en leche mediante turbidimetría. Para este estudio se tuvo especial cuidado en no incrementar el pH por encima de 7 para evitar dañar las bacterias y/o modificar la actividad enzimática. Lin y col. (1989) utilizaron un método similar para determinar actividad β -galactosidásica de bacterias lácticas.

La aplicación de este método permitió obtener suspensiones bacterianas libres de caseínas de 10^8 - 10^9 UFC/ml. La ausencia de caseínas en el precipitado de células obtenido por centrifugación fue comprobada mediante un ensayo control sobre leche libre de bacterias. La leche fue acidificada con HCl 10N hasta pH 4,5 o 5,0.; el coágulo fue redissuelto mediante el agregado de Na_2EDTA alcalino y la ausencia de proteínas en el sedimento obtenido después de la centrifugación se comprobó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

4.3.2. Puesta a punto del ensayo enzimático

En la determinación de la actividad proteolítica bacteriana se trataron de mantener las condiciones utilizadas en la elaboración de productos lácteos fermentados en cuanto a medio de cultivo, temperatura de crecimiento y tiempos de incubación.

La puesta a punto del ensayo enzimático se realizó con bacterias crecidas en leche a 37 y 42°C, temperaturas usualmente empleadas en la elaboración de yogur. Los cultivos se cosecharon a pH 5 (fase estacionaria) y el ensayo enzimático se realizó a 42°C con células enteras midiendo la actividad a tiempos cortos, entre 30 minutos y 2 horas de incubación. La selección del precipitado de células para la determinación de la actividad proteolítica se basó en el hecho que en el sobrenadante se detectó una

actividad enzimática 50 veces menor. Por otra parte, en leche no inoculada no se detectó actividad proteolítica.

Las cinéticas de actividad proteolítica se realizaron según se detalla en Materiales y Métodos obteniendo curvas semejantes a la que se muestra en la Figura 20. En la misma se observa un incremento de la absorbancia a 650 nm con el tiempo de incubación. De la pendiente se calcularon las unidades de actividad proteolítica (uAP) tal como se definió en Materiales y Métodos. Cabe destacar que durante el período de tiempo utilizado en la determinación de la cinética no se detectó modificación de la viabilidad celular, lo cual se comprobó por recuento de bacterias viables.

Para determinar la cantidad de sustrato saturante que asegurara condiciones de velocidad inicial máxima se realizó el ensayo enzimático, en presencia de distintas concentraciones de caseína (Tabla 9). Los experimentos se realizaron por duplicado, utilizando *Lactobacillus bulgaricus* LBB crecido en leche a 37°C. Los resultados obtenidos indican que la actividad enzimática (uAP/ml) no se modificó con las distintas concentraciones de sustrato ensayadas (Tabla 9). Para el resto de los ensayos se utilizaron 2,5 mg/ml de caseína ya que todas las concentraciones ensayadas resultaron saturantes. Con esta concentración de caseína se obtiene una buena solubilización de la misma.

4.3.3. Influencia del tratamiento con Na₂EDTA pH 12 sobre la actividad proteolítica

Se ha descrito que algunas cepas de estreptococos lácticos liberan proteasas al medio cuando se resuspenden durante cierto tiempo en buffer libre de calcio, efecto que es inhibido por el agregado de este ion. También se ha demostrado que *Lactococcus lactis* subespecie *cremoris* posee una

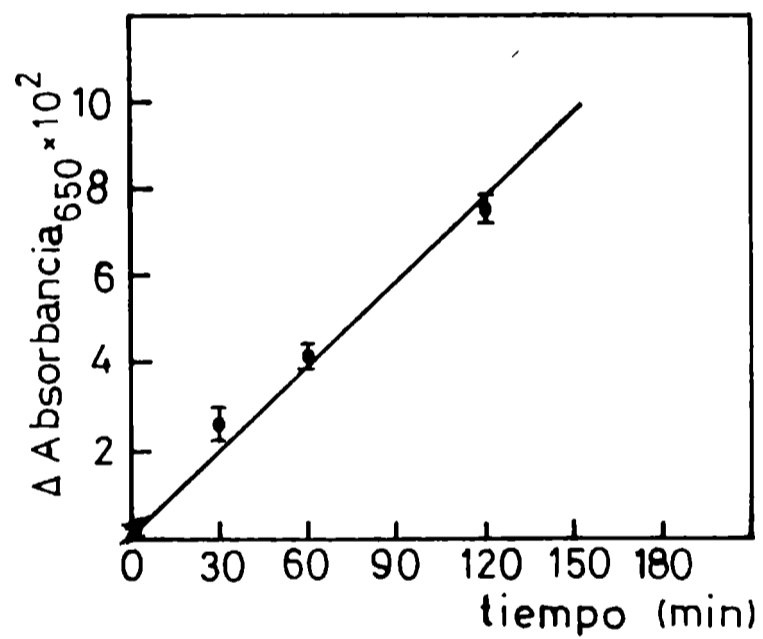


Figura 20: Cinética de actividad caseinolítica de suspensiones de *Lactobacillus bulgaricus* LBB.

4. ACTIVIDAD PROTEOLITICA

Tabla 9: Influencia de la concentración de sustrato en la actividad proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus* LBB.

Concentración de la solución de caseína (mg/ml)	Concentración de caseína en la mezcla de reacción (mg/ml)	Unidades de actividad proteolítica (uAP/ml)	
		Leche 1	Leche 2 ^(a)
1,0	0,8	3,0	-
2,5	2,0	2,7	6,7
5,0	4,0	3,0	-
10,0	8,0	2,8	6,7

(a) 1 y 2 significan que las bacterias utilizadas para el ensayo fueron desarrolladas en dos leches de diferente partida.

proteinasas asociada a la pared celular cuya unión está estabilizada por la presencia de calcio (Laan y Konnings, 1989).

Además, es sabido que ciertos agentes quelantes como EDTA y citrato, inhiben la actividad de proteasas y peptidasas de lactobacilos. El porcentaje de inhibición no es siempre el mismo, dependiendo de la especie de lactobacilo y de la enzima estudiada (Ezzat y col, 1986). Estos resultados muestran la importancia del calcio en la actividad y estabilidad de las proteasas.

A efectos de determinar si el tratamiento con Na_2EDTA alcalino tiene influencia sobre la actividad proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus* LBB, se realizó el ensayo enzimático con suspensiones bacterianas provenientes de cultivos celulares tratados o no con dicho quelante. Para ello bacterias crecidas en caldo 1.1.1. se dividieron en dos fracciones, una de las cuales fue neutralizada con Na_2EDTA pH 12 previo a la centrifugación. Los precipitados obtenidos se lavaron con agua estéril y se disolvieron en un volumen de agua 10 veces menor. Con las bacterias resuspendidas se realizó el ensayo enzimático tal como se detalló en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10. Se puede observar que no existen diferencias significativas en la actividad proteolítica por bacteria (uAP/UFC) obtenida con ambos cultivos. Por lo tanto se puede concluir que el tratamiento con Na_2EDTA alcalino no modifica la actividad proteolítica bacteriana. Este hecho permitió comparar posteriormente la actividad de las bacterias provenientes de leche con aquellas provenientes de medio 1.1.1.

4.3.4. Reproducibilidad del método

Con el objeto de determinar la reproducibilidad del método se determinó la actividad proteolítica (uAP/ml) y la concentración de bacterias

4. ACTIVIDAD PROTEOLITICA

Tabla 10: Influencia del tratamiento con Na₂EDTA alcalino sobre la actividad proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus* LBB propagado en caldo 1.1.1.

Condición de extracción	uAP/10 ⁸ UFC
Con Na ₂ EDTA pH 12	0,75 ± 0,1
Sin Na ₂ EDTA pH 12	0,90 ± 0,1

uAP: unidades de actividad proteolítica

UFC: unidades formadoras de colonias

LSD: 0,7

viabiles (UFC/ml) de suspensiones bacterianas obtenidas a partir de 12 cultivos independientes de *Lactobacillus bulgaricus* LBB crecidos en leche a 37°C. La Figura 21 muestra los resultados obtenidos al graficar unidades enzimáticas (uAP/ml) en función de las unidades formadoras de colonias (UFC/ml). La recta obtenida se ajustó por cuadrados mínimos corroborándose el modelo lineal mediante un análisis de residuos. De la pendiente de la recta se calculó la actividad proteolítica específica (uAP/UFC) obteniéndose un valor de 3,8 uAP/10⁸ UFC. El coeficiente de correlación calculado a partir de los valores experimentales fue 0,911.

4.3.5. Evaluación de la actividad proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus* LBB durante el crecimiento a 37 y 42°C.

Una vez puesto a punto el ensayo de actividad proteolítica y comprobada su reproducibilidad, se aplicó esta metodología para evaluar dicha actividad en distintas fases de crecimiento a 37 y 42°C.

Para ello células de *Lactobacillus bulgaricus* LBB provenientes de un cultivo en caldo 1.1.1. se sembraron en leche y se incubaron a 37 y 42°C. A distintos tiempos se determinó el número de bacterias viables, el pH y la actividad proteolítica específica de las suspensiones bacterianas. En la Figura 22 se presentan los datos obtenidos. A ambas temperaturas se observa un descenso del pH y un incremento del número de bacterias viables (UFC/ml). Es importante destacar que a pH 5 todos los cultivos se encuentran en fase estacionaria.

Asimismo, a 37°C se detecta un aumento de la actividad proteolítica específica durante el período de latencia, alcanzando un valor de 3 uAP/10⁸ UFC el que se mantiene hasta las 6 horas (fase estacionaria).

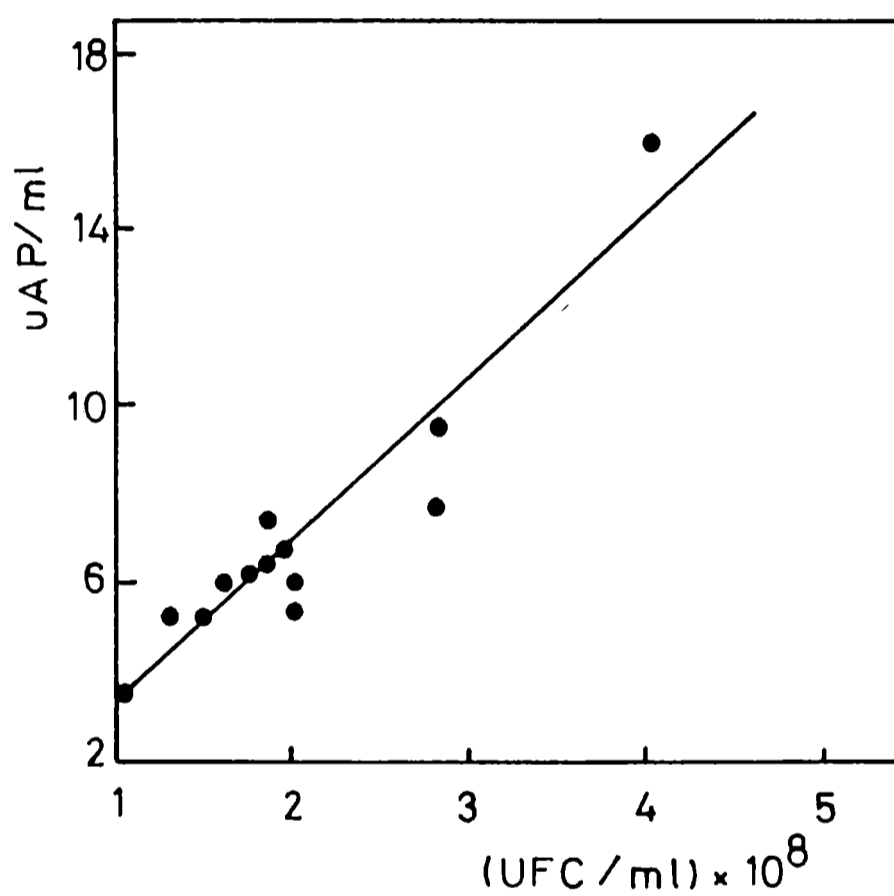


Figura 21: Actividad proteolítica de suspensiones bacterianas en función del número de bacterias viables. Cada punto de la curva proviene de un cultivo bacteriano independiente.

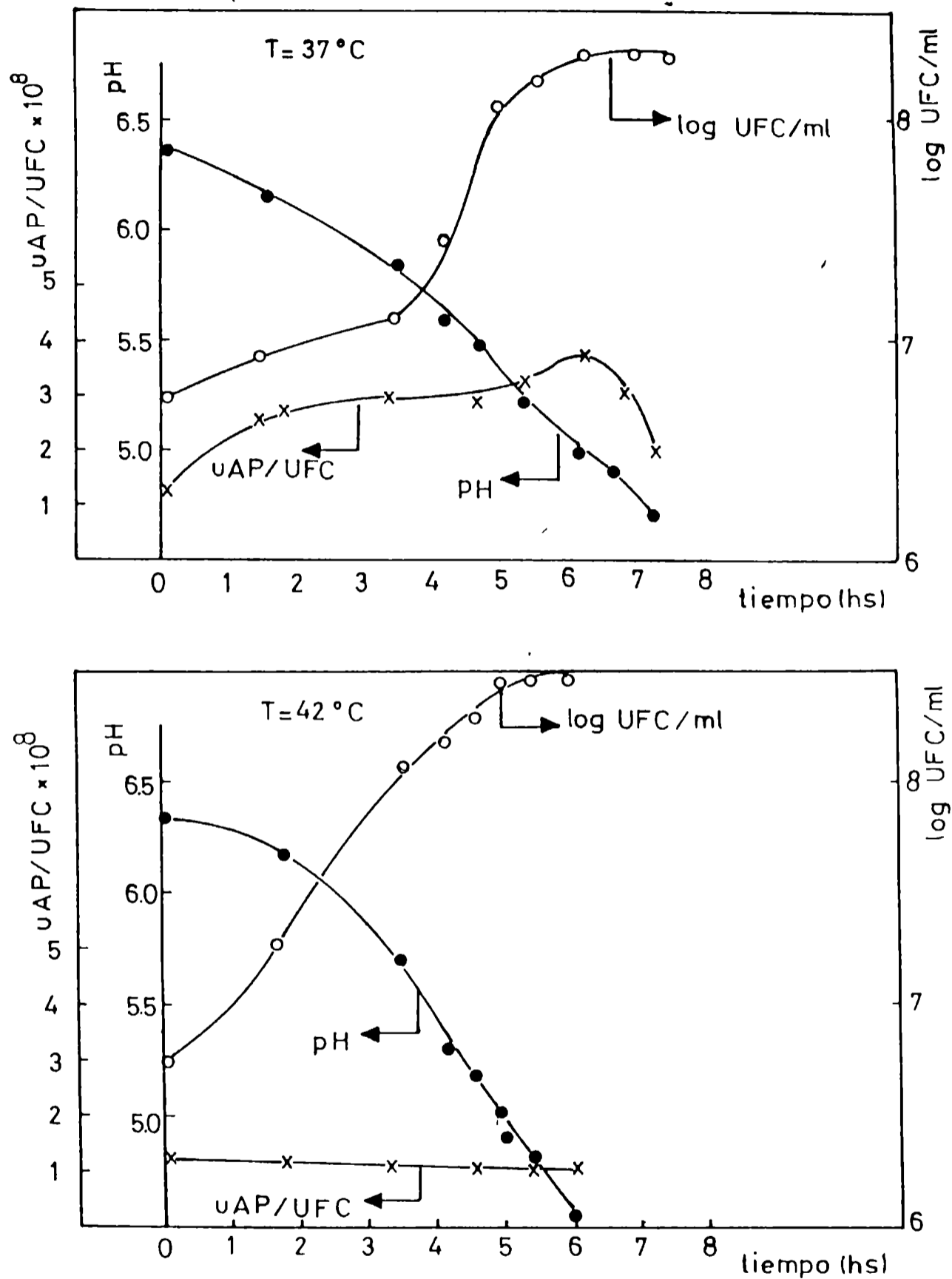


Figura 22: Cinéticas de crecimiento, acidificación y actividad proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus* LBB en leche a 37 y a 42°C. LSD (uAP/10⁸ UFC) = 0,7.

En tanto que a 42°C dicha actividad mantuvo un valor bajo (1,2 uAP/10⁸ UFC) y constante durante todas las fases de crecimiento.

Este experimento permite analizar el efecto simultáneo ejercido por el nivel de aminoácidos y la temperatura. Las células que provienen de un medio rico en aminoácidos poseen una actividad proteolítica baja; en estas condiciones es esperable que el "pool" interno de aminoácidos sea elevado. Cuando el precipitado bacteriano libre de medio 1.1.1. se siembra en leche, con bajo nivel de aminoácidos solubles, el resultado observado depende de la temperatura de incubación. A 42°C no se modifica esta actividad, a 37°C hay un rápido incremento de la misma. Esto indicaría que las células presentarían un nivel de actividad proteolítica que se incrementa o no dependiendo de las condiciones de crecimiento.

4.3.6. Influencia de la concentración de aminoácidos y péptidos solubles sobre la actividad proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus* LBB

Para evaluar la influencia de la concentración de aminoácidos sobre la actividad proteolítica las bacterias se desarrollaron en leche con distintos niveles de tirosina TCA soluble. Para ello la leche (75 µg/ml de tirosina TCA soluble) fue adicionada de hidrolizado de caseína hasta obtener 125, 155 y 220 µg/ml de tirosina TCA soluble evaluada por el método de Hull según se describió previamente. Posteriormente, se inocularon con *L. bulgaricus* LBB y se incubaron a 37 y 42°C hasta llegar a pH 5 siendo posteriormente evaluada la actividad proteolítica. La Figura 23 muestra a modo de ejemplo, las cinéticas obtenidas a partir de suspensiones bacterianas provenientes de cultivos crecidos en leche con distinta concentración de tirosina soluble a 42°C. Dado que dichas cinéticas se realizaron a partir de suspensiones bacterianas con diferente concentración de células (indicados

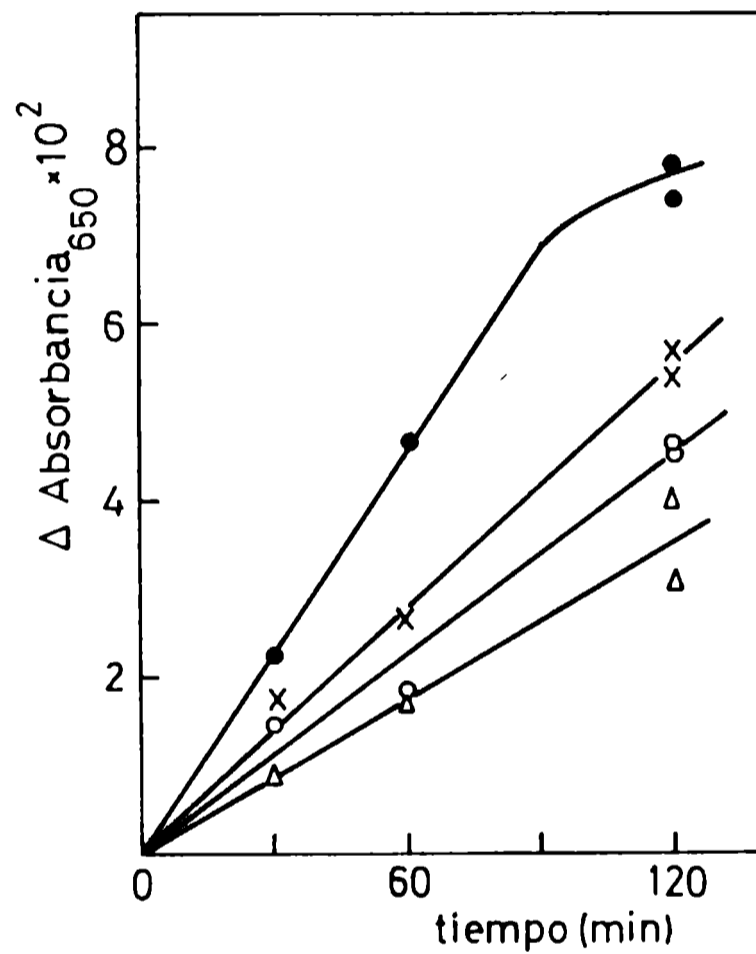


Figura 23: Cinéticas enzimáticas realizadas con bacterias provenientes de cultivos desarrollados en leche con distintas concentraciones de aminoácidos solubles a 42°C. (Δ) 75 µg Tyr/ml, 4 x 10⁸ UFC/ml; (●) 125 µg Tyr/ml, 7,5 x 10⁸ UFC/ml; (x) 155 µg Tyr/ml, 7,5 x 10⁸ UFC/ml; (○) 220 µg Tyr/ml, 5,5 x 10⁸ UFC/ml.

4. ACTIVIDAD PROTEOLITICA

en la figura), se calculó la actividad proteolítica específica (uAP/10⁸ UFC) para poder comparar los resultados obtenidos en distintas condiciones de crecimiento. Las uAP/10⁸ UFC se graficaron en función de la concentración inicial de tirosina de la leche (Figura 24). Cada punto corresponde al promedio de cuatro o más experimentos. La actividad proteolítica de cultivos de *Lactobacillus bulgaricus* LBB en leche (75 µg/ml de nitrógeno TCA soluble expresado como tirosina) resultó ser 1,7 veces mayor a 37°C que a 42°C. Es importante destacar que esta diferencia fue la misma para todos los experimentos llevados a cabo (Tabla 11).

En la Figura 24 A y B además se puede observar que el incremento de tirosina TCA soluble en el medio de crecimiento ejerce un efecto diferente sobre la actividad proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus* LBB cuando éste se desarrolla a 37 o a 42°C. A 37°C esta actividad metabólica desciende bruscamente a medida que se incrementa la concentración de tirosina TCA soluble desde 75 µg/ml hasta 150 µg/ml llegando a un valor mínimo que se mantiene constante al menos hasta concentraciones de 220 µg/ml. Mientras que las células desarrolladas a 42°C no mostraron cambios significativos en la actividad proteolítica al incrementar el contenido de tirosina TCA soluble de la leche. Estos resultados fueron confirmados mediante un análisis de varianza y comparación de los valores promedios de cada experimento mediante el test t de Student. Además, se calculó la mínima diferencia significativa (LSD) dando un valor de 0,9 ($\alpha = 0,05$).

La disminución de la actividad proteolítica de los cultivos crecidos a 37°C en función de la concentración de aminoácidos podría deberse a la existencia de mecanismos de regulación a diferentes niveles que afectarían la actividad de la enzima o su síntesis.

Los resultados de la Figura 24 se pueden comparar con los descritos previamente en la Figura 19, donde se observa el incremento de nitrógeno soluble de la leche debido al desarrollo bacteriano. En la misma se observa

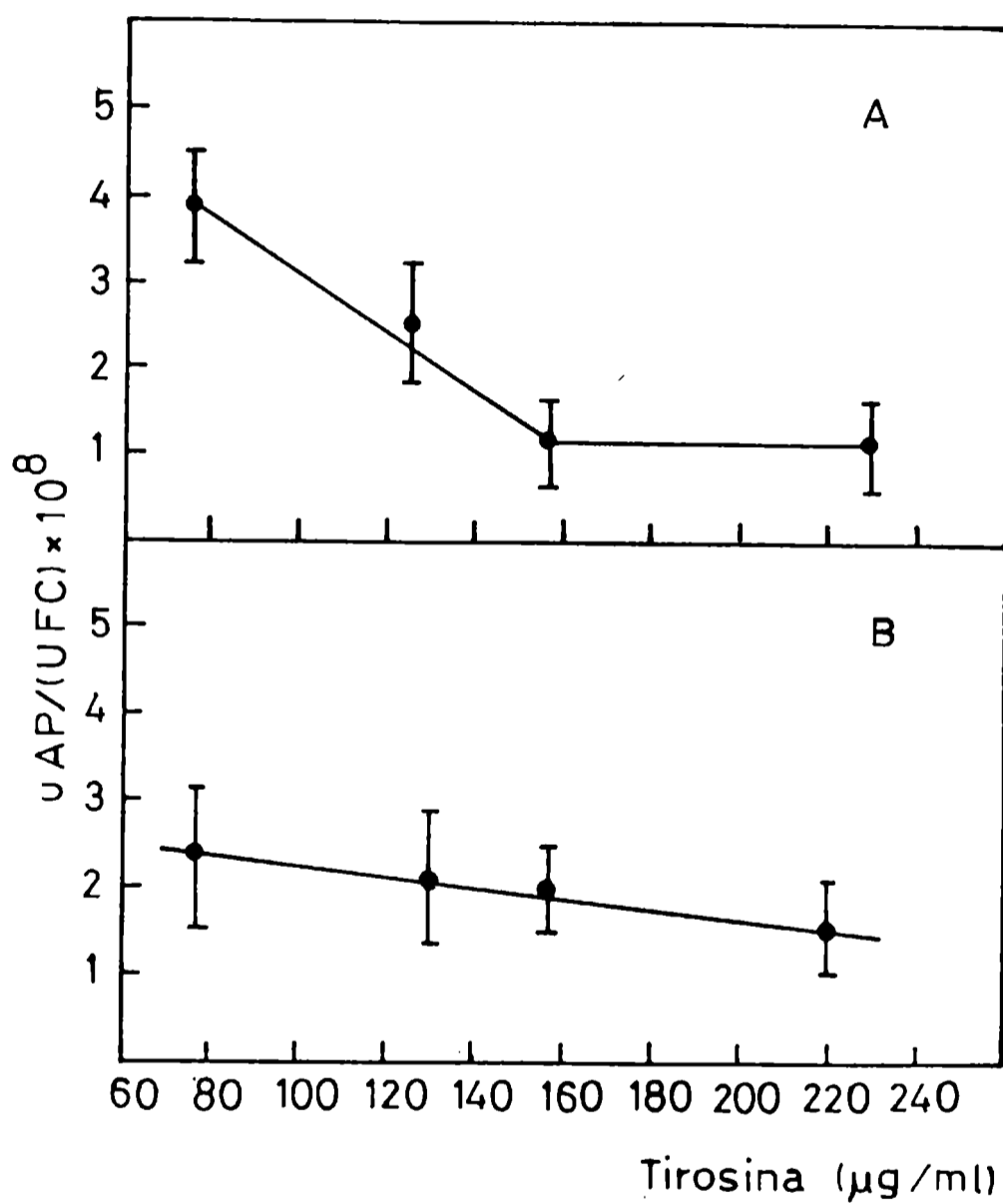


Figura 24: Influencia del nivel de nitrógeno soluble en leche sobre la actividad proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus* LBB a dos temperaturas de crecimiento a 37 (A) y 42°C (B). LSD = 0,9.

4. ACTIVIDAD PROTEOLITICA

Tabla 11: Actividad proteolítica por bacteria de células desarrolladas en leche (75 µg/ml de Tyr) a 37 y 42°C obtenidas en diferentes experimentos

Experimento	uAP/UFC 10 ⁸		ΔuAP/10 ⁸ UFC
	Temperatura de crecimiento 37°C	42°C	
1	3,7	1,7	2,0
2	4,8	3,2	1,7
3	3,1	1,2	1,9
4	2,9	1,2	1,7

uAP: Unidades de actividad proteolítica

UFC: Unidades formadoras de colonias

ΔuAP/UFC: uAP/UFC de células crecidas a 37°C -
uAP/UFC de células crecidas a 42°C.

LSD = 0,9

que en los cultivos crecidos a 37°C en leche con una concentración de tirosina TCA soluble entre 70 y 120 $\mu\text{g/ml}$, el $\Delta \text{Tyr}/A_{480\text{nm}}$ se mantiene constante y a mayores concentraciones de tirosina TCA soluble (155 $\mu\text{g/ml}$) desciende bruscamente y mantiene este valor al menos hasta 220 $\mu\text{g/ml}$ de tirosina TCA soluble (Figura 19 A). Los cultivos a 42°C (Figura 19 B) muestran una disminución gradual del $\Delta \text{Tyr}/A_{480\text{nm}}$ con el incremento de tirosina soluble de la leche.

Los resultados de Δ tirosina de la Figura 19 están referidos a la absorbancia obtenida a 480 nm que nos da idea de la masa total bacteriana. Los resultados de la Figura 24, en cambio, están referidos al número de bacterias viables de cada ensayo. En las condiciones experimentales usadas (cosecha en fase exponencial temprana, pH 5) la mayor parte de las bacterias presentes se encuentran viables, por lo tanto, es posible comparar los resultados mostrados en las Figuras 19 y 24, a pesar de que en una de ellas la concentración de células fue determinada espectrofotométricamente ($A_{480\text{nm}}$) y en el otro caso se evaluaron las UFC/ml.

Analizando ambas figuras se observa que entre 70 y 120 $\mu\text{g/ml}$, el $\Delta \text{Tyr}/A_{480\text{nm}}$ se mantiene constante (Figura 19 A) y la actividad proteolítica (uAP/UFC) disminuye (Figura 24 A). Esto podría interpretarse en términos de una disminución de la captación de aminoácidos del medio y/o del consumo de los mismos. De 120 $\mu\text{g/ml}$ a 150 $\mu\text{g/ml}$ de tirosina en el medio el $\Delta \text{Tyr}/A_{480\text{nm}}$ disminuye y por encima de ese valor se mantiene constante coincidiendo con los resultados de la Figura 24.

Cuando las bacterias se desarrollan a 42°C no se ven modificaciones significativas de la actividad proteolítica con el incremento de nitrógeno soluble (Figura 24 B). Sin embargo, hay un descenso marcado del balance de tirosina (ΔTyr) (Figura 19 B). Posiblemente la temperatura elevada no sólo altere la funcionalidad de la proteasa sino también modifique el consumo y/o captación de aminoácidos del medio.

De los resultados de la Figura 24 A surge que la disminución de la actividad enzimática con la concentración de aminoácidos podría deberse a un efecto sobre la síntesis o sobre la actividad de la enzima.

4.3.7. Influencia de la concentración de aminoácidos TCA solubles sobre el ensayo enzimático

Cuando *Lactobacillus bulgaricus* se desarrolla en leche con distintas concentraciones de hidrolizado de caseína se observa una disminución de la actividad proteolítica específica. Podría pensarse que el crecimiento en leche con distintos niveles de tirosina soluble modifica el "pool" interno de aminoácidos de la bacteria y esos aminoácidos podrían reprimir la síntesis de la enzima o su actividad.

A efectos de determinar si la actividad de la enzima se ve afectada por la concentración de aminoácidos se extrajeron las células de cultivos de bacterias desarrolladas en leche a 37 y a 42°C, con ellas se realizaron ensayos enzimáticos utilizando como sustrato caseína y caseína adicionada con hidrolizado de caseína. En la Tabla 12 se presentan los resultados obtenidos. Se puede observar que la actividad enzimática no se ve afectada por la concentración de aminoácidos del ensayo enzimático (entre 20 y 150 µg/ml Tyr TCA soluble) independientemente de la temperatura de crecimiento de las bacterias. Esto indicaría que la disminución de la actividad proteolítica detectada (Figura 24 A) no se debería a la inhibición de la actividad de la enzima por la presencia de aminoácidos.

Tabla 12: Influencia de la concentración de aminoácidos sobre la actividad de la enzima proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus* LBB.

Actividad específica (uAP/10 ⁸ UFC)		
Temperatura de crecimiento	Sustrato	
	Caseína (20 µg/ml de Tyr)	Caseína + hidrolizado de caseína (150 µg/ml de Tyr)
37°C	3,20 ± 0,1	3,14 ± 0,05
42°C	0,83 ± 0,05	0,87 ± 0,05

uAP: Unidades de actividad proteolítica

UFC: Unidades formadoras de colonias

LSD: 0,5

4.3.8. Evaluación del efecto de la temperatura de crecimiento sobre la actividad proteolítica bacteriana

Hemos visto que la concentración de aminoácidos solubles afecta de manera diferencial la actividad proteolítica de bacterias desarrolladas a 37 y a 42°C. Por ello se decidió indagar el efecto de un rango más amplio de temperatura sobre esta actividad metabólica. Para ello, cultivos de *Lactobacillus bulgaricus* LBB se incubaron a distintas temperaturas, entre 34 y 48°C, hasta alcanzar pH 5. Los medios elegidos fueron leche (75 µg/ml Tyr) y leche adicionada con hidrolizado de caseína (155 µg/ml Tyr).

Los resultados de la Figura 25 muestran la actividad enzimática por bacteria de las células crecidas en leche con bajo nivel de tirosina TCA soluble (Figura 25 A) y leche adicionada con hidrolizado de caseína (Figura 25 B). Se puede observar que la temperatura de crecimiento ejerce un efecto diferente sobre la actividad proteolítica específica según el contenido de aminoácidos solubles en el medio. Para una baja concentración de tirosina la actividad proteolítica específica (uAP/UFC) es alta a temperaturas de crecimiento entre 34 y 38°C). Cuando ésta aumenta (38 a 40°C) se observa un brusco descenso de 4 a 5 veces de la actividad específica. Esta actividad no se modifica a temperaturas de crecimiento más altas. Sin embargo, cuando las células se desarrollan en leche con alto nivel de aminoácidos solubles la temperatura de crecimiento, al menos en el rango ensayado, no modifica significativamente la actividad metabólica evaluada. En leche con 155 µg/ml de tirosina TCA soluble la actividad específica (uAP/UFC) obtenida entre 32 y 48°C es tan baja como el valor correspondiente al de las bacterias desarrolladas en leche a temperaturas superiores a 40°C.

El efecto ejercido por la temperatura sobre la actividad proteolítica bacteriana podría deberse a una represión a nivel de la síntesis de la

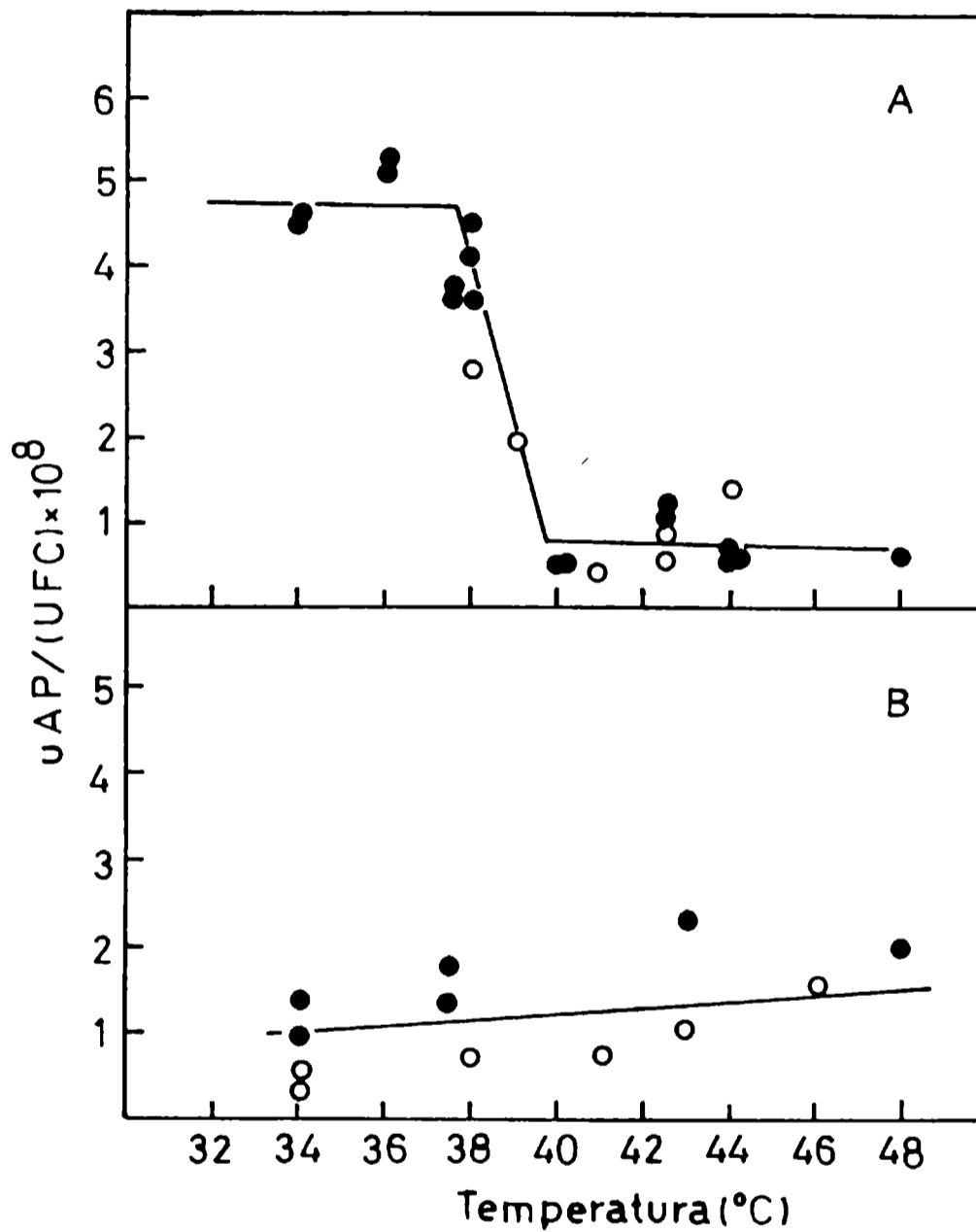


Figura 25: Influencia de la temperatura de crecimiento en la actividad proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus* LBB desarrollado en leche (75 µg/ml Tyr)(A) y leche más hidrolizado de caseína (155 µg/ml Tyr)(B). (○) (●) indican los experimentos realizados con partidas distintas de leche. LSD = 0,9.

enzima, a una modificación de la accesibilidad enzima-sustrato o bien a una alteración de la actividad enzimática.

4.3.9. Influencia de la temperatura sobre la actividad de la enzima

Para indagar la influencia de la temperatura sobre la actividad enzimática se crecieron las bacterias en leche, se obtuvo la suspensión bacteriana según se indicó en Materiales y Métodos y se determinaron las unidades de actividad proteolítica a distintas temperaturas de incubación (32, 37, 42 y 48°C). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 26. Se observa que la actividad proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus* LBB aumenta con el aumento de la temperatura de acuerdo a la expresión de Arrhenius

$$(\log uAP = -Ea/RT)$$

donde E_a es energía de activación; R : constante cinética de los gases y T la temperatura absoluta. Por lo tanto la disminución de la actividad específica determinada en función de la temperatura de crecimiento (Figura 25 A) no se puede asignar a una disminución de la actividad enzimática, ya que se produce un aumento de esta actividad entre 32 y 48°C (Figura 26) mientras que la Figura 25 A muestra un descenso brusco de la actividad proteolítica a temperaturas mayores de 38°C. Por ello se puede decir que la disminución de actividad específica observada (Figura 25 A) no es atribuible a una inactivación de la enzima.

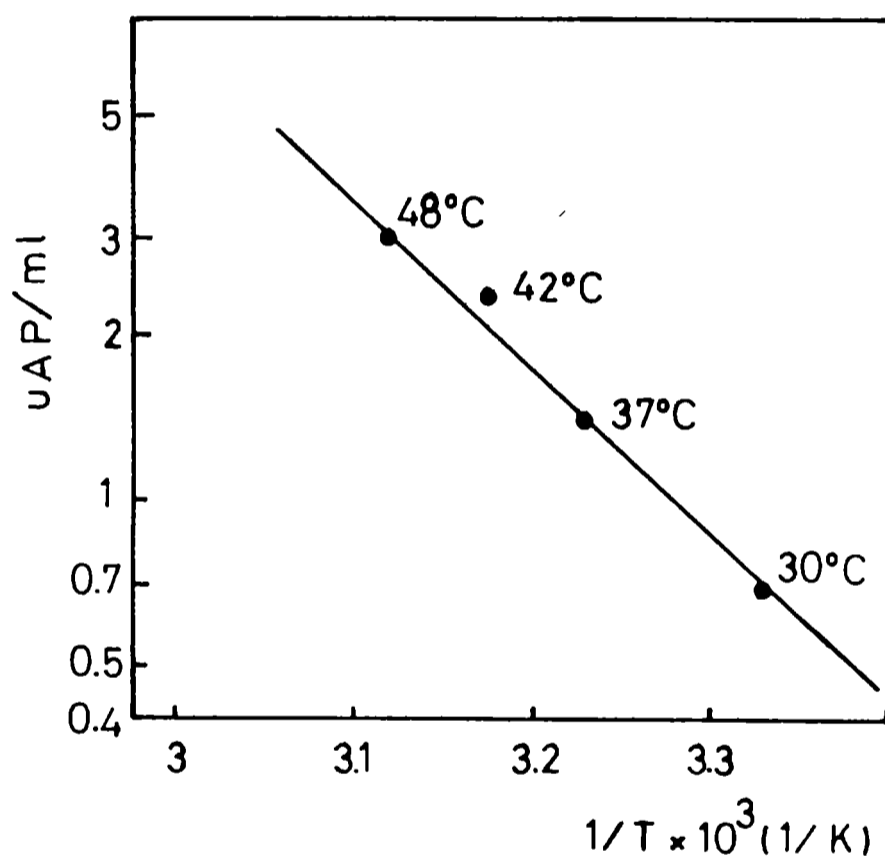


Figura 26: Diagrama de Arrhenius para la actividad proteásica de *Lactobacillus bulgaricus* LBB desarrollado en leche a 37°C.

4.4. Estudio comparativo del efecto del medio de crecimiento sobre la actividad proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus* LBA, LBB y LBR

La actividad proteolítica bacteriana se determinó mediante la evaluación de la acción de las proteasas de células enteras sobre caseína. La proteólisis se siguió por incremento del nitrógeno soluble y por degradación de caseína en geles de poliacrilamida. Estos estudios se realizaron con *Lactobacillus bulgaricus* LBA, LBB y LBR provenientes de un mismo fermento.

4.4.1. Evaluación de la actividad proteolítica de bacterias desarrolladas en leche y medio de cultivo por incremento de nitrógeno TCA soluble

Para realizar este ensayo las bacterias se propagaron a 37°C en leche (75 µg/ml tirosina TCA soluble), leche adicionada de hidrolizado de caseína (150 µg/ml tirosina TCA soluble) y caldo 1.1.1. (310 µg/ml tirosina TCA soluble). La leche se adicionó con hidrolizado de caseína hasta 150 µg/ml pues, de acuerdo a los resultados anteriormente descritos, a esta concentración se obtiene un valor mínimo de actividad proteolítica.

Con los tres cultivos se obtuvieron las suspensiones bacterianas para determinar la actividad proteolítica y se realizaron ensayos enzimáticos como se describió en Materiales y Métodos.

Las cinéticas obtenidas con suspensiones de *Lactobacillus bulgaricus* LBB (Figura 27) muestran que la máxima actividad para esta cepa se obtiene cuando las células se desarrollan en leche y desciende cuando las bacterias crecen en leche adicionada de hidrolizado de caseína o en caldo 1.1.1.. Estas cinéticas son comparables pues el número de células presentes en los

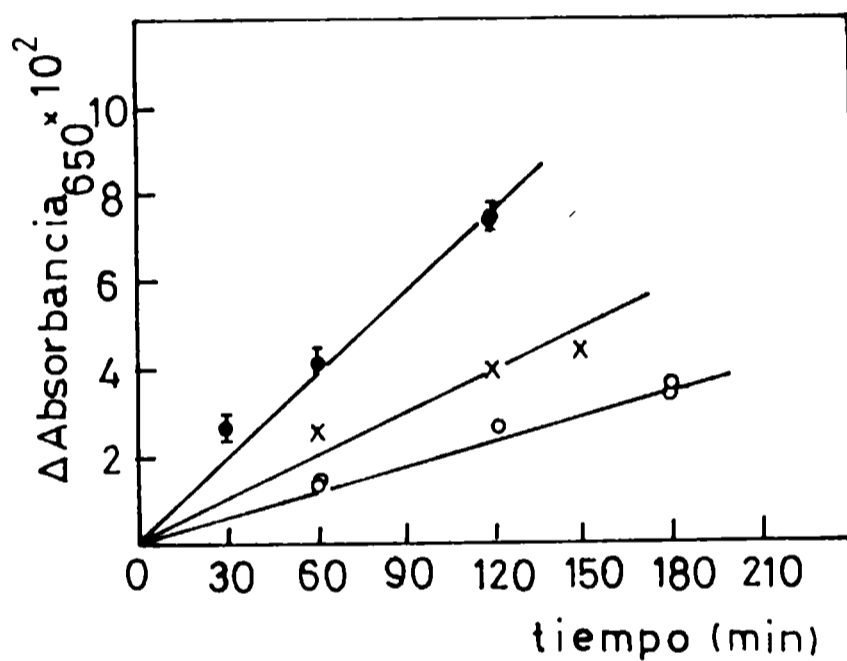


Figura 27: Incremento de tirosina TCA soluble en función del tiempo de incubación de células de *Lactobacillus bulgaricus* LBB desarrollado a 37°C en leche (●), leche con hidrolizado de caseína (x) o caldo 1.1.1. (o)

4. ACTIVIDAD PROTEOLITICA

distintos ensayos es similar. Las suspensiones provenientes de leche contienen $1,8 \times 10^8$ UFC/ml, las correspondientes a leche adicionada con hidrolizado de caseína $2,4 \times 10^8$ UFC/ml y las obtenidas a partir de caldo 1.1.1. $2,0 \times 10^8$ UFC/ml. La mayor actividad proteolítica se obtiene en leche con el concentrado bacteriano de menor número de células. Para estandarizar los resultados se calculó la actividad proteolítica específica (uAP/UFC) (Figura 28). Para las dos cepas estudiadas, LBA y LBB, se puede observar que la actividad proteolítica es mayor cuando el medio de crecimiento empleado es leche y disminuye cuando la concentración de aminoácidos del mismo aumenta concordando con los resultados encontrados previamente (Figura 24). Las uAP/ 10^8 UFC obtenidas en leche para *Lactobacillus bulgaricus* LBB y LBA fueron 2 y 1,5 veces mayores que las alcanzadas en las otras condiciones de cultivo (Figura 28).

La actividad proteolítica específica (uAP/UFC) de *Lactobacillus bulgaricus* LBR fue la misma ($1,2 \text{ uPA}/10^{-8}$ UFC) para células provenientes de leche o medio de cultivo (Tabla 13). El valor obtenido para *Lactobacillus bulgaricus* LBR en las dos condiciones de crecimiento ensayadas es del orden de la actividad específica de *Lactobacillus bulgaricus* LBA y LBB crecidos en caldo 1.1.1. y es inferior al valor obtenido por *Lactobacillus bulgaricus* LBA y LBB en leche. Estos resultados nos indican que *Lactobacillus bulgaricus* LBR presenta un nivel "basal" de proteasas que no se ve incrementado cuando la bacteria crece en leche con bajo nivel de aminoácidos libres. En cambio, *Lactobacillus bulgaricus* LBA y LBB presentan una actividad mayor al crecer en leche.

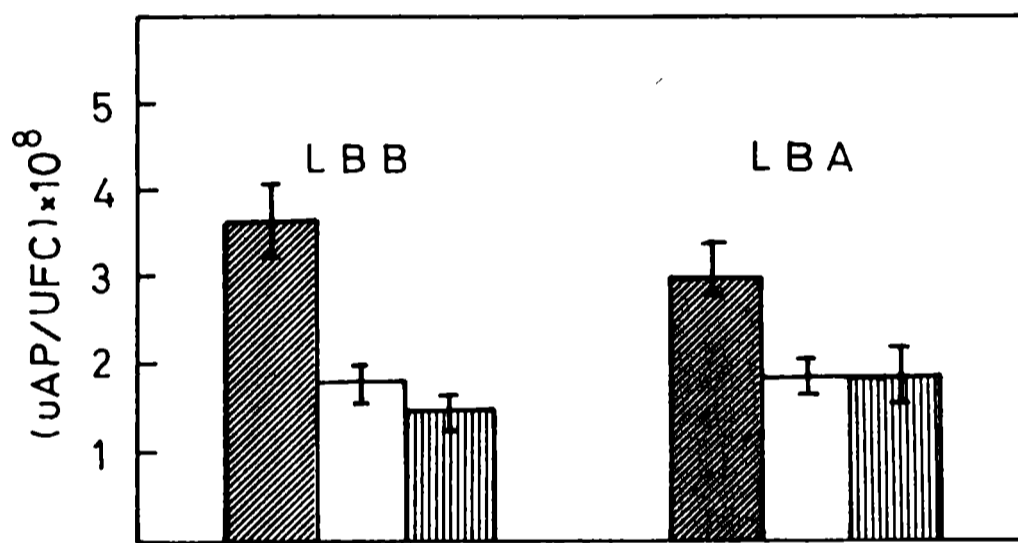





Figura 28: Actividad proteolítica específica (uAP/10⁸ UFC) de *Lactobacillus bulgaricus* LBA y LBB desarrollados en leche , leche con hidrolizado de caseína  y medio 1.1.1. .

Tabla 13: Influencia del medio de crecimiento en la actividad proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus* LBA, LBB y LBR

uAP/10 ⁸ UFC		
Cepa	Medio de crecimiento	
	leche	caldo 1.1.1.
LBA	2,7 ± 0,6	0,9 ± 0,2
LBB	3,8 ± 0,6	1,1 ± 0,5
LBR	1,2 ± 0,1*	1,2 ± 0,3*

Todos los resultados son el promedio de 4 o más experimentos.

* Son el promedio de 2 experimentos.

4.4.2. Evaluación de la actividad proteolítica bacteriana por degradación de fracciones caseínicas

La actividad proteolítica de suspensiones bacterianas de *Lactobacillus bulgaricus* LBA, LBB y LBR desarrolladas en leche, leche con hidrolizado de caseína y caldo 1.1.1. fue analizada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida para determinar su degradación.

Los ensayos enzimáticos se realizaron como se describió en Materiales y Métodos y a distintos tiempos de incubación de la suspensión bacteriana con caseína la reacción enzimática se detuvo por congelación de la muestra a -80°C . Antes de sembrar el gel, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se diluyeron en buffer de muestra (1:1 v/v). En los geles se sembraron veinte microlitros de cada muestra y se corrieron a intensidad constante (15 mA por placa). En cada calle se sembró aproximadamente $100\ \mu\text{g}$ de proteína.

En la Figura 29 se observan los geles obtenidos con suspensiones de *Lactobacillus bulgaricus* LBB proveniente de caldo 1.1.1. (calles 1 a 4) y de leche (calles 5 a 8). Las calles 1, 2, 5 y 6 muestran los tiempos iniciales de incubación ($t = 0$) y las calles 3, 4, 7 y 8 los resultados obtenidos luego de 6 horas de incubación a 42°C . En las calles 1 y 2 se observan las fracciones de α y β caseína. La intensidad de estas fracciones disminuye en las calles 3 y 4 aumentando las bandas de pesos moleculares menores. Lo mismo se observa comparando las calles 5 y 6 con las calles 7 y 8. En estas últimas la disminución de las fracciones α y β es más marcada. Por lo tanto, estos resultados nos indicarían que la acción sobre caseínas es más notable cuando las bacterias se desarrollan en leche. Es importante destacar que ambos ensayos se realizaron con igual número de células.

Estos resultados coinciden con los obtenidos mediante la evaluación de la actividad proteolítica específica (Figura 28) y confirmarían los

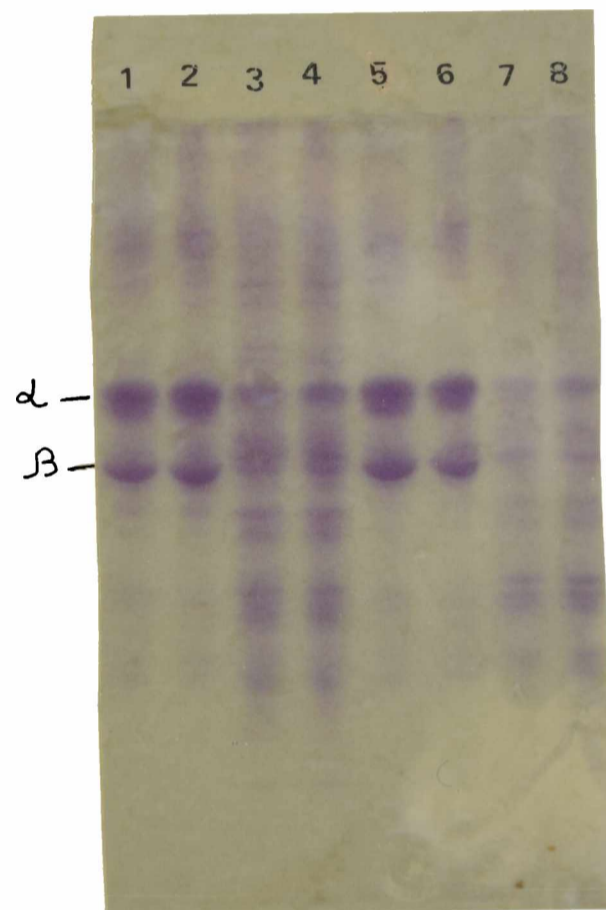


Figura 29: Geles de poliacrilamida (10%) con SDS de fracciones caseínicas antes y después de la incubación con suspensiones de *Lactobacillus bulgaricus* LBB. Desarrollado en caldo 1.1.1.: 0 hs calles 1 y 2; 6 hs de incubación calles 3 y 4. Desarrollado en leche: 0 hs calles 5 y 6; 6 hs de incubación calles 7 y 8.

resultados anteriores dado que en medio 1.1.1., con alto contenido de tirosina TCA soluble (310 $\mu\text{g/ml}$), la actividad proteolítica se encuentra disminuida con respecto a los valores obtenidos en leche con 75 $\mu\text{g/ml}$ de tirosina TCA soluble.

En la Figura 30 se muestran los densitogramas obtenidos por lectura de la absorbancia de las bandas proteicas separadas en geles de poliacrilamida con SDS según se describió oportunamente. En la Figura 30 A se muestra el tiempo inicial de incubación donde están presentes las fracciones α y β de caseína que poseen un peso molecular (PM) de 39 y 33 kDa, respectivamente. En la Figura 30 B, luego de 2 horas de incubación, hay un descenso de las fracciones caseínicas y se observa una nueva fracción de menor peso molecular (19 kDa). Este pico se incrementa a las 4 hs de incubación y a las 6 hs se observan nuevas bandas de peso molecular entre 11 y 15 kDa. Esto indica que las proteasas de *Lactobacillus bulgaricus* actúan sobre las fracciones α y β de la caseína.

La degradación de caseínas por *Lactobacillus bulgaricus* LBA se muestra en la Figura 31. Las calles 3 a 6 muestran las cinéticas de degradación de caseínas por *Lactobacillus bulgaricus* LBA desarrollado en leche. En las mismas con el incremento del tiempo de incubación se obtiene una disminución de las fracciones caseínicas siendo más importante la disminución de la fracción β . A las 2 hs de incubación se observa un aumento de un péptido de menor peso molecular (22 kDa), esta banda se hace más intensa a mayores tiempos de incubación. Las calles 7, 8, 9 y 10 describen la cinética de degradación de caseínas a partir de una suspensión bacteriana proveniente de leche con hidrolizado de caseína. Se observa que con el tiempo de desarrollo de la cinética hay disminución, sobre todo de β caseína y aparición de un péptido de menor peso molecular. Luego de 2 hs de incubación se puede observar que la degradación de β caseína es mayor cuando se utiliza leche

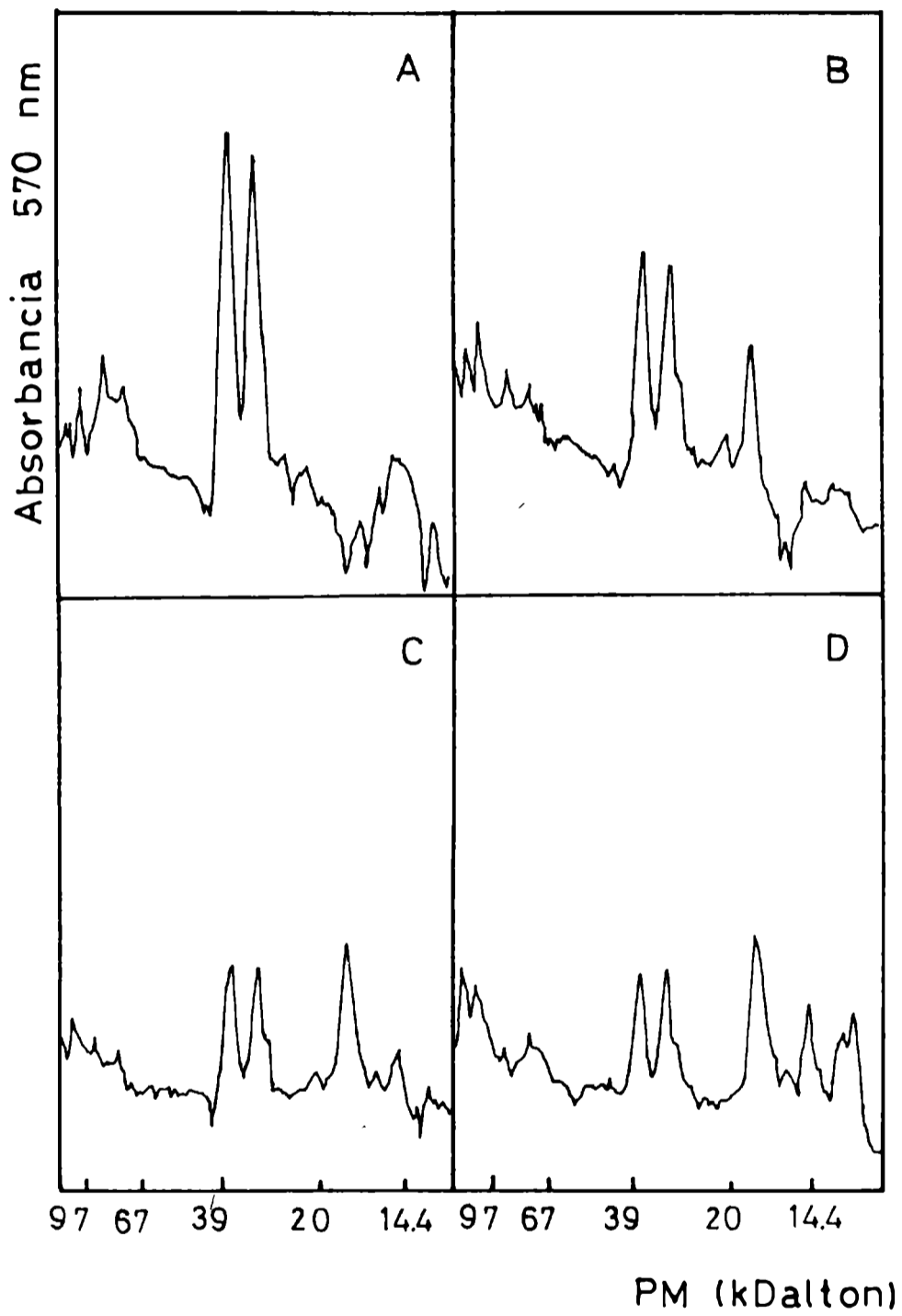


Figura 30: Densitograma correspondiente a la actividad caseinolítica de *Lactobacillus bulgaricus* LBB en leche. Tiempo de incubación: A: 0; B: 2 hs; C: 4 hs y D: 6 hs.

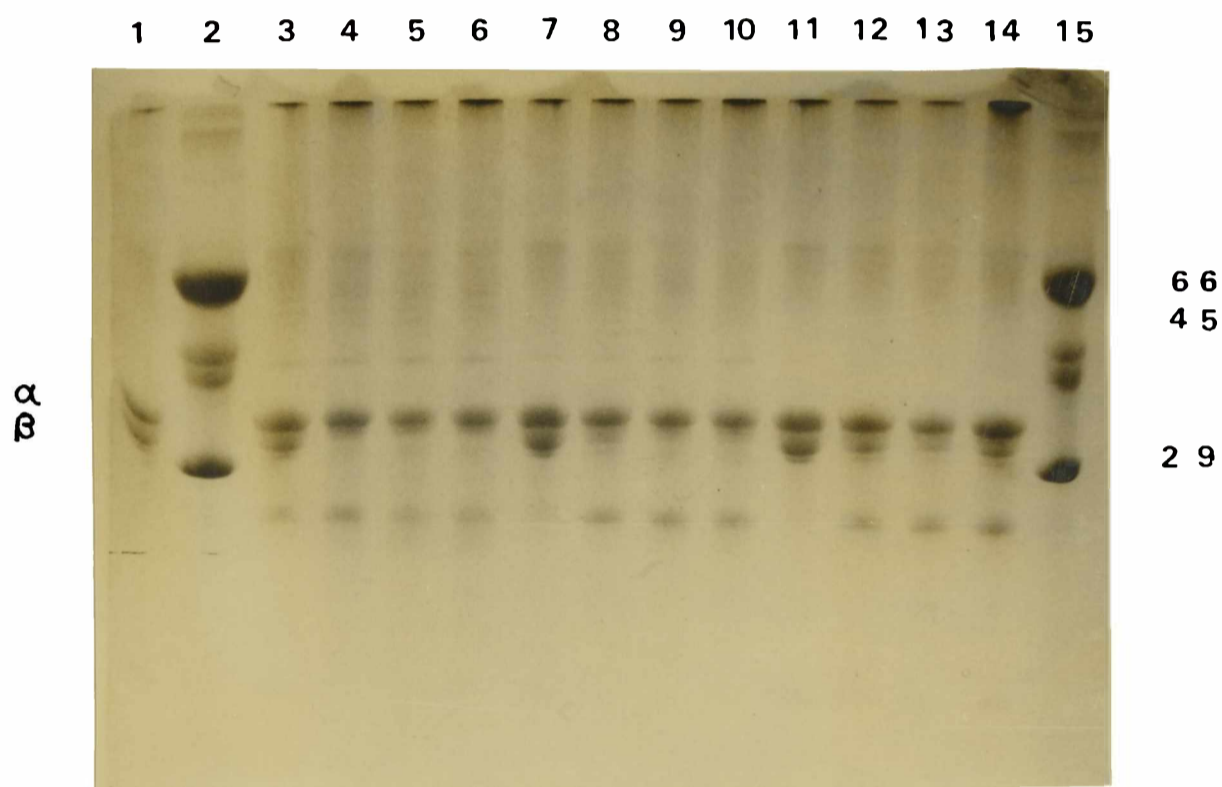


Figura 31: Degradación de caseínas por proteasas de *Lactobacillus bulgaricus* LBA evaluada en geles de poliacrilamida con SDS. Caseínas: calle 1, patrones de peso molecular: calle 2 y 15 . LBA propagada en leche: Calle 3 0 hs; Calle 4 2 hs; Calle 5 4 hs; Calle 6 6 hs. LBA propagada en leche más hidrolizado de caseína: Calle 7 0 hs; Calle 8 2 hs; Calle 9 4 hs; Calle 10 6 hs. LBA crecida en caldo 1.1.1.: Calle 11 0 hs; Calle 12 2 hs; Calle 13 4 hs; Calle 14 6 hs.

como medio de cultivo (calle 4 y calle 8). Esta comparación es válida pues ambas cinéticas se realizaron con igual número de células.

Las calles 11, 12, 13 y 14 muestran la cinética de degradación de caseínas por *Lactobacillus bulgaricus* LBA desarrollado en caldo 1.1.1. Los resultados obtenidos indican que la disminución de las fracciones caseínicas es escasa dado que aún después de 6 hs de incubación se encuentra presente la fracción β caseínica (calle 14). Sin embargo, hay indicios de actividad proteolítica, pues aumenta la intensidad de la fracción de peso molecular 22 kDa. Estos resultados confirman los valores de actividad proteolítica específica de cultivos desarrollados en leche y caldo 1.1.1. (Figura 28) indicando que la actividad proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus* LBA es mayor en leche que en los otros medios evaluados.

Por otro lado, suspensiones bacterianas de *Lactobacillus bulgaricus* LBR, provenientes de leche y medio de cultivo se incubaron con caseína durante distintos tiempos. Los densitogramas obtenidos se muestran en las Figuras 32 y 33. En la Figura 32 se presentan los resultados correspondientes a la cinética de degradación de caseínas de bacterias desarrolladas en leche. A tiempo inicial se observan las fracciones de α y β caseína (PM 39 y 33 kDa). Estas fracciones disminuyen a las 2 y 4 hs de incubación (Figura 32 B y C) apareciendo un péptido de 22 kDa. A las 6 hs de incubación no se observan modificaciones en las fracciones caseínicas con respecto a 4 hs, pero hay una disminución del péptido de 22 kDa (Figura 32 D).

Los resultados de la Figura 33, muestran la degradación de caseínas por *Lactobacillus bulgaricus* LBR desarrollado en caldo 1.1.1. A tiempo 0 (Figura 33 A) se observan las fracciones caseínicas α y β ya descritas que disminuyen con el tiempo de incubación. A las 2 hs (Figura 33 B) se observa una disminución de la fracción β que se acentúa a las 4 hs (Figura 33 C) y 6 hs (Figura 33 D). Asimismo, con el tiempo de incubación hay un incremento de la intensidad del pico correspondiente al péptido de 22 kDa.

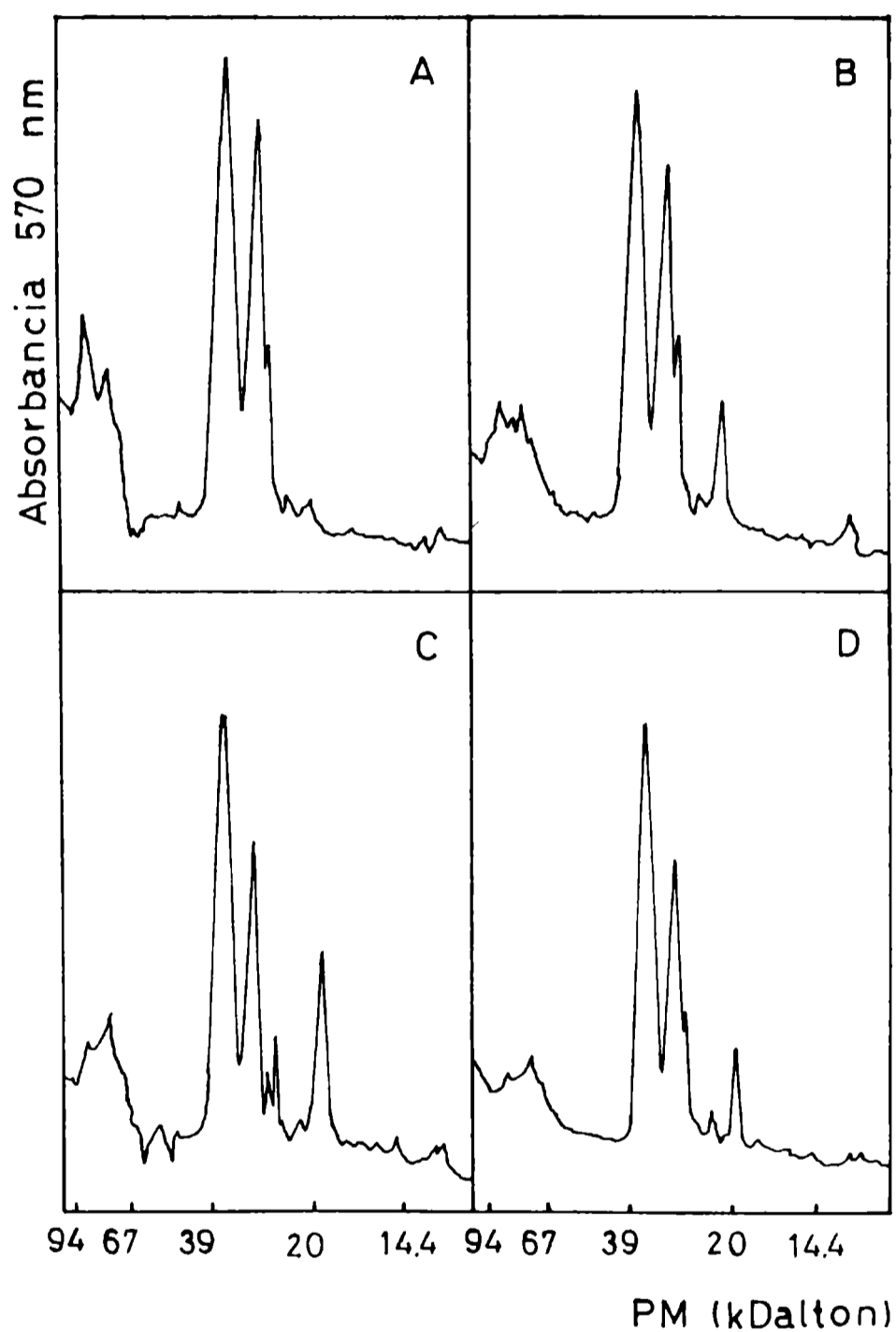


Figura 32: Hidrólisis de caseínas por proteasas de *Lactobacillus bulgaricus* LBR desarrollado en leche. A: 0 hs; B: 2 hs; C: 4 hs y D: 6 hs de incubación..

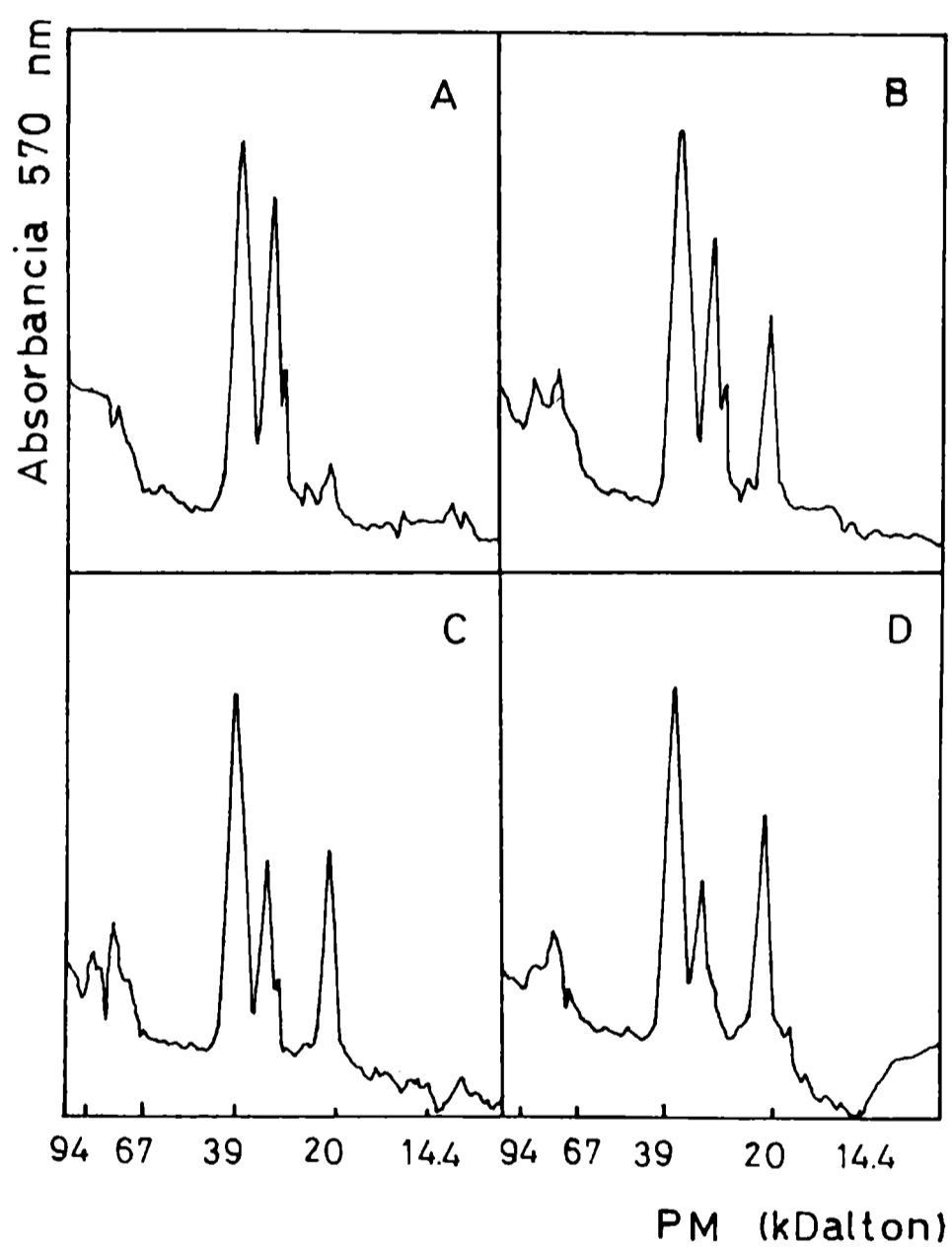


Figura 33: Hidrólisis de caseínas por proteasas de *Lactobacillus bulgaricus* LBR desarrollada en caldo 1.1.1. A: 0 hs; B: 2 hs; C: 4 hs y D: 6 hs de incubación.

Los resultados de las Figuras 32 y 33 son semejantes. No observándose diferencias significativas entre las cinéticas obtenidas con bacterias crecidas en leche o medio 1.1.1. Teniendo en cuenta estos resultados se puede decir que el medio de crecimiento no modifica la actividad proteolítica de *Lactobacillus bulgaricus* LBR en concordancia con los datos de la Tabla 13. Esta cepa, posee baja actividad proteolítica e hidroliza preferentemente β caseína dando un péptido de PM 22 kDa.

Con respecto a la acción de proteasas bacterianas sobre caseína hay resultados divergentes. Algunos autores encontraron que las proteasas intracelulares de *Lactobacillus bulgaricus* hidrolizan α , β y κ caseína (Khalid y Marth, 1990). Asimismo, las proteasas de pared celular de algunos lactobacilos hidrolizan α y β caseína (El Soda y Desmazeaud, 1982; Ezzat y col., 1985; Khalid y Marth, 1990). Otros autores, en cambio postulan que las proteasas de *L. bulgaricus* hidrolizan preferencialmente β caseína aunque las otras fracciones también se degradan en menor grado (Castberg y Morris, 1976; Chandan y col., 1982). Por lo tanto el hecho de que las células aisladas presenten distinto patrón de hidrólisis de caseínas nos indica que las proteasas presentes en cada una de ellas podrían ser distintas.

4.5. Discusión

La actividad proteolítica de bacterias lácticas es un parámetro a tener en cuenta para la selección y preparación de fermentos. Los resultados obtenidos con *Lactobacillus bulgaricus* indican que el medio de crecimiento y la temperatura de incubación juegan un rol importante en la regulación de esta actividad.

De las tres cepas de *Lactobacillus bulgaricus* estudiadas, *Lactobacillus bulgaricus* LBA y LBB presentan una actividad proteolítica diferente, dependiendo del medio de crecimiento. La actividad proteolítica de células crecidas en medio 1.1.1. es menor que la actividad de las bacterias crecidas en leche (Figuras 27 y 28). Por su parte, Laloi y col. (1991) obtuvieron resultados semejantes con *Lactobacillus bulgaricus* CNZR 397.

En cambio *Lactobacillus bulgaricus* LBR presenta la misma actividad tanto en leche como en medio de cultivo y esta actividad es tan baja como la obtenida con las otras dos cepas crecidas en medio (Tabla 13, Figuras 32 y 33). Esto significaría que *Lactobacillus bulgaricus* posee una actividad proteolítica basal y algunas cepas son capaces de responder a una condición de crecimiento, donde la concentración de aminoácidos es insuficiente, incrementando esta actividad. Este efecto se observa con la cepa LBB (Figura 22 A), donde las células provenientes de caldo 1.1.1. y sembradas en leche incrementan su actividad proteolítica respondiendo al estímulo del medio de crecimiento. Este incremento se produce si la temperatura de incubación es 37°C, pero no a 42°C.

Asimismo, cuando se incrementa el contenido de nitrógeno soluble de la leche utilizada como medio de crecimiento de *Lactobacillus bulgaricus* LBB, se observa una disminución de la actividad proteolítica bacteriana si el crecimiento se realiza a 37°C (Figura 24 A). Existen evidencias bibliográficas que refuerzan estos datos. Resultados obtenidos por Glen (1976), Exterkate (1979) y Thomas y Mills (1981) con estreptococos lácticos indican que la concentración de aminoácidos del medio regula la actividad proteolítica bacteriana. Asimismo, en otras bacterias como *Clostridium sporogenes* (Allison y Mc Farlane, 1990), *Bacillus megaterium* (Moravcova y Chaloupka, 1984) y *Bacillus licheniformis* (Hanlon y col., 1982, Frankena y col., 1985) el alto contenido de nitrógeno soluble del medio de crecimiento deprime la actividad proteolítica bacteriana. Sin embargo, el efecto de la concentración

4. ACTIVIDAD PROTEOLITICA

de aminoácidos en el medio de crecimiento de *Lactobacillus bulgaricus* LBB a 42°C es diferente, la actividad proteolítica no se modifica significativamente (Figura 24 B), lo cual nos indica que la temperatura también es un parámetro a tener en cuenta en la expresión de esta actividad metabólica.

El efecto de la temperatura de crecimiento depende de la concentración de aminoácidos libres de la leche. En leche (75 µg/ml tirosina TCA soluble) se observa una actividad proteásica alta si la temperatura de crecimiento está entre 34 y 48°C, desciende bruscamente entre 38 y 40°C y mantiene este valor bajo a temperaturas superiores (40-48°C) (Figura 25 A). En cambio, las bacterias desarrolladas en leche adicionada con hidrolizado de caseína, que poseen una actividad proteolítica baja, no modifican esta actividad basal con las distintas temperaturas de incubación.

De los resultados obtenidos se pueden plantear distintos mecanismos de regulación de la actividad proteolítica. Esta actividad podría estar regulada por los aminoácidos y péptidos solubles y/o la temperatura de incubación a distintos niveles. Un primer mecanismo de regulación sería a nivel de la actividad de la enzima en sí misma. Un segundo nivel de regulación sería la síntesis de la enzima ya sea en los procesos de transcripción o traducción. Y un tercer aspecto sería la regulación a nivel de membrana o pared que determinaría la accesibilidad enzima-sustrato y el transporte de aminoácidos. Si bien estos niveles están bien definidos, la regulación podría afectar a más de uno de ellos, actuando en forma combinada o independiente.

Si se evalúan los resultados descriptos previamente se puede descartar el efecto de la temperatura y aminoácidos sobre la actividad de la enzima (Tabla 12, Figura 26).

Con los experimentos realizados no podemos descartar ninguno de los otros niveles de regulación planteados. Es posible que el efecto ejercido por los aminoácidos a 37°C sea debido a una regulación a nivel de

traducción o transcripción. En *S. cremoris* que presenta proteasas asociadas a pared celular (Exterkate, 1975; Exterkate, 1976a y b) la represión por aminoácidos observada (Exterkate, 1979) es debido a un doble control, un control fino a nivel de traducción y uno más grueso a nivel de transcripción (Exterkate, 1985).

Sin embargo, cuando entra en juego la temperatura de incubación, se puede plantear un control dual a nivel de la síntesis y/o a nivel de membrana. Una primera hipótesis sería considerar que el efecto de los aminoácidos es a nivel de la síntesis de la enzima y que la temperatura regula a nivel de membrana, a baja temperatura la membrana no permitiría la entrada de los aminoácidos del medio cuando la concentración de los mismos no es elevada, al aumentar el contenido de aminoácidos y péptidos del medio, éstos entrarían en la célula reprimiendo la síntesis. A mayor temperatura de incubación la membrana permitiría el pasaje de aminoácidos aún cuando están en baja concentración estando el sistema reprimido, lo cual explicaría el efecto observado en la Figura 25 A.

Otra posibilidad sería considerar una relación entre la temperatura de crecimiento y la actividad de la enzima. De acuerdo a los resultados de la Figura 26, la enzima es más activa a mayores temperaturas siguiendo la expresión de Arrhenius. Por lo tanto, si las bacterias crecen a 42°C, sus enzimas liberarán mayor cantidad de aminoácidos a partir de caseínas que si el crecimiento es a 37°C. Por ello al crecer a 37°C, la célula advierte la carencia de aminoácidos para su óptimo desarrollo y responde sintetizando mayor cantidad de enzima proteolítica. Esto significa que necesita mayor cantidad de enzima para obtener la misma cantidad de producto final. Esta hipótesis se clarifica con los resultados de la Figura 22 donde las bacterias con un nivel basal de proteasas se transfieren a leche (75 µg/ml de tirosina TCA soluble). A 37°C las células incrementan su actividad proteolítica específica, pero no lo hacen a 42°C. Posiblemente debido a que la

actividad de la enzima a 42°C libera suficiente cantidad de aminoácidos para su óptimo desarrollo.

Los resultados experimentales responden a ambas hipótesis. La diferencia es que en la primera está considerado el transporte de aminoácidos a través de la membrana a distintas temperaturas y la segunda tiene en cuenta la actividad de la enzima. El resultado final es un mayor contenido de aminoácidos en el interior celular ya sea por aumento de la permeabilidad de la membrana o por aumento de los aminoácidos por proteólisis de caseínas.

Estos resultados permitirían optimizar la obtención de fermentos en base a la actividad proteolítica requerida en cada producto, mediante la modificación de parámetros simples como la composición de aminoácidos de la leche y la temperatura de crecimiento.

CONSERVACION DE
Lactobacillus bulgaricus

5. CONSERVACION DE *Lactobacillus bulgaricus*

5.1. Consideraciones generales

Los métodos de conservación de bacterias más difundidos son la congelación y la liofilización. En ambos se utilizan sustancias crioprotectoras para disminuir el daño ocasionado por esos procesos. Estos métodos también son ampliamente utilizados para la conservación de bacterias lácticas y fermentos mixtos para su uso industrial. En el caso de fermentos para yogur, constituidos por *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, se plantea el problema de una diferente sensibilidad de cada una de las especies a la congelación-descongelación, siendo *S. thermophilus* la más resistente (Heckly, 1978). Esta especie mantiene entre 30 y 65% de sus células viables después de 12 ciclos de congelación-descongelación (Pérez, 1991). En cambio, *Lactobacillus bulgaricus* es muy sensible a las condiciones de almacenamiento y conservación. Numerosos han sido los intentos para conservar los lactobacilos, entre ellos el mantenimiento de cultivos en leche a 4°C (Rasic y Kurman, 1978), cultivos concentrados a 5°C (Kaneko y col., 1987) y liofilización y congelación (Heckly, 1978; Sharp, 1984). Para mantener el porcentaje de bacterias viables tanto en la liofilización como en la congelación se han adicionado al medio de congelación agentes crioprotectores como leche, glicerol, adonitol, azúcares, etc. (Barbour y Priest, 1986; Valdez y col., 1983; Smittle y col., 1972; 1974). Sin embargo, con *L. bulgaricus* en todos los casos se obtuvo baja viabilidad celular luego del tratamiento de liofilización o congelación-descongelación.

5.2. Estudio de distintas condiciones de conservación para *Lactobacillus bulgaricus* LBA, LBB y LBR

Para conservar las cepas aisladas se probaron distintas condiciones. Los bacilos aislados se repicaron en medio sólido (agar MRS en pico de flauta) y se almacenaron a 6, 10 y 20°C. En todos los casos fue necesario repicar semanalmente las células para mantenerlas viables. Por tal motivo este método no fue considerado conveniente para la conservación de las cepas mencionadas.

Se estudió, entonces, la conservación de las bacterias en leche almacenada a baja temperatura (1,5°C). Antes y después de 40 días de almacenamiento se realizaron recuentos de bacterias viables. El porcentaje de células sobrevivientes fue muy bajo. *Lactobacillus bulgaricus* LBB y LBR mantuvieron su viabilidad en un 19%. Para *L. bulgaricus* LBA el porcentaje de células viables resultó inferior al 2%.

Cuando *L. bulgaricus* LBB se congeló a -80°C con glicerol 1 M como crioprotector el porcentaje de células sobrevivientes resultó aproximadamente 36%.

Teniendo en cuenta estos resultados y que el uso de cultivos congelados en freezer entre -20 y -80°C permite un fácil manejo de los fermentos, tanto en el laboratorio como a nivel industrial, se enfocó este estudio a la búsqueda de una condición de congelación para mantener las células viables y metabólicamente activas. Las variables estudiadas fueron los crioprotectores usados y el medio de crecimiento. Todos los experimentos se realizaron manteniendo la misma velocidad de congelación y descongelación y la misma temperatura de almacenamiento.

5.3. Efecto de crioprotectores en la congelación de *Lactobacillus bulgaricus*. Influencia de la concentración del crioprotector

Durante el proceso de congelación-descongelación las células sufren una serie de cambios que las dañan en mayor o menor grado. Esos cambios pueden ser a nivel de la membrana o por efecto de la concentración intracelular de solutos (Mazur, 1966; 1970). Los agentes crioprotectores actúan o bien minimizando esos efectos de concentración de solutos o protegiendo del daño a la membrana como se discutió previamente.

Si bien se conoce el efecto crioprotector de algunas sustancias como glicerol, leche, azúcares, etc., no se han realizado estudios comparativos de su eficiencia sobre bacterias lácticas. Por ello en una primera etapa se estudió el efecto crioprotector de distintas sustancias con una misma cepa de *L. bulgaricus*.

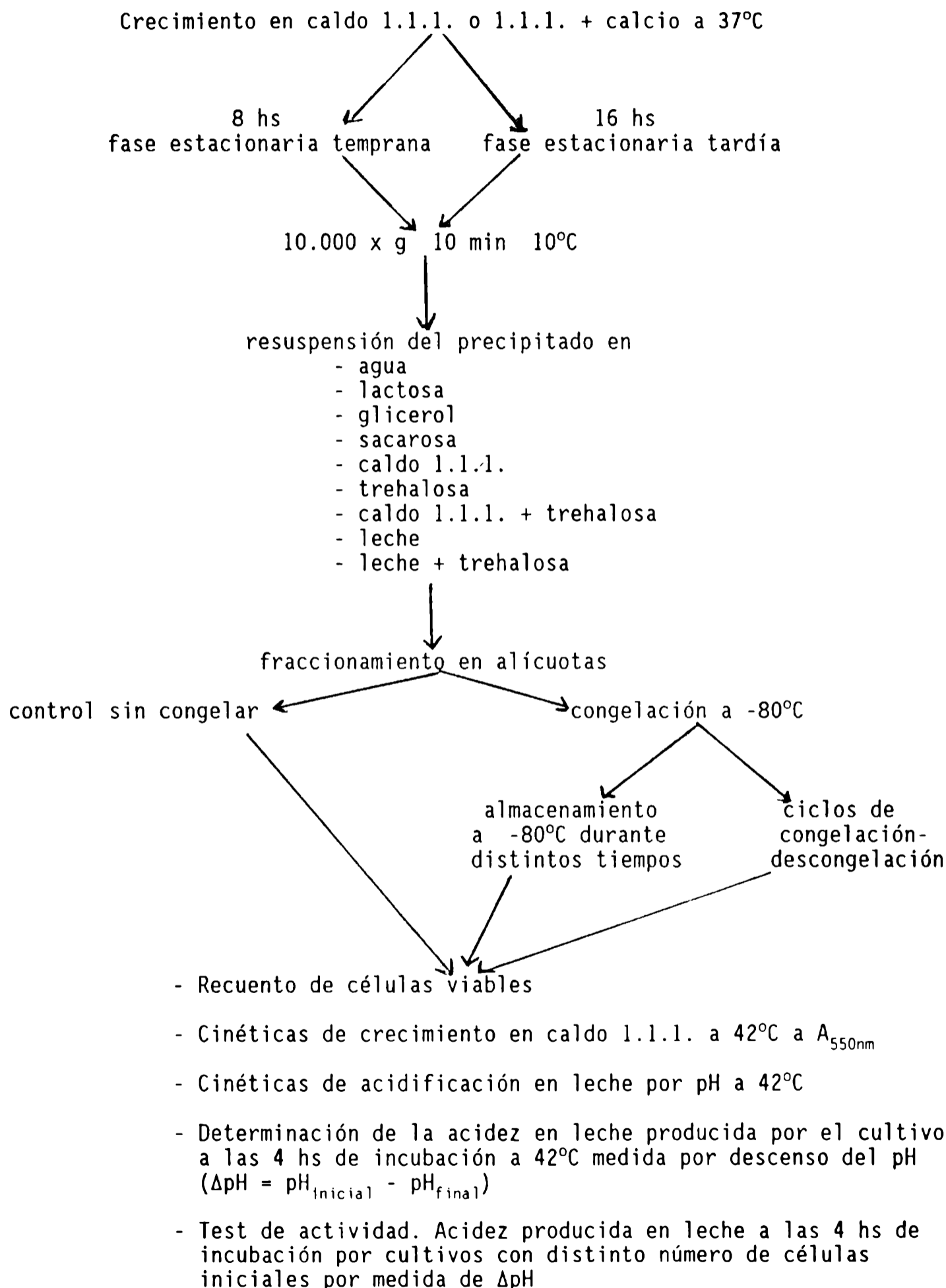
Para realizar este estudio la cepa LBB se desarrolló a 37°C en caldo 1.1.1. y se cosechó por centrifugación al llegar a la fase estacionaria (Esquema 2). Con la centrifugación se eliminaron del medio los productos del metabolismo bacteriano. Las células se resuspendieron en diferentes crioprotectores: leche, glicerol, trehalosa, sacarosa y lactosa en las concentraciones indicadas en Materiales y Métodos.

Antes de congelar se determinó el número de bacterias viables y capacidad acidificante, y después del almacenamiento durante 7 días a -80°C se evaluó la eficiencia crioprotectora mediante cinéticas de acidificación en leche siguiendo el protocolo del Esquema 2.

Las cinéticas obtenidas antes y después de la congelación en presencia de diferentes crioprotectores se muestran en la Figura 34.

En la Figura 34 A se observa la cinética de acidificación obtenida con las bacterias sin congelar. Las cinéticas obtenidas con las bacterias

Esquema 2: Metodología empleada para los experimentos de congelación



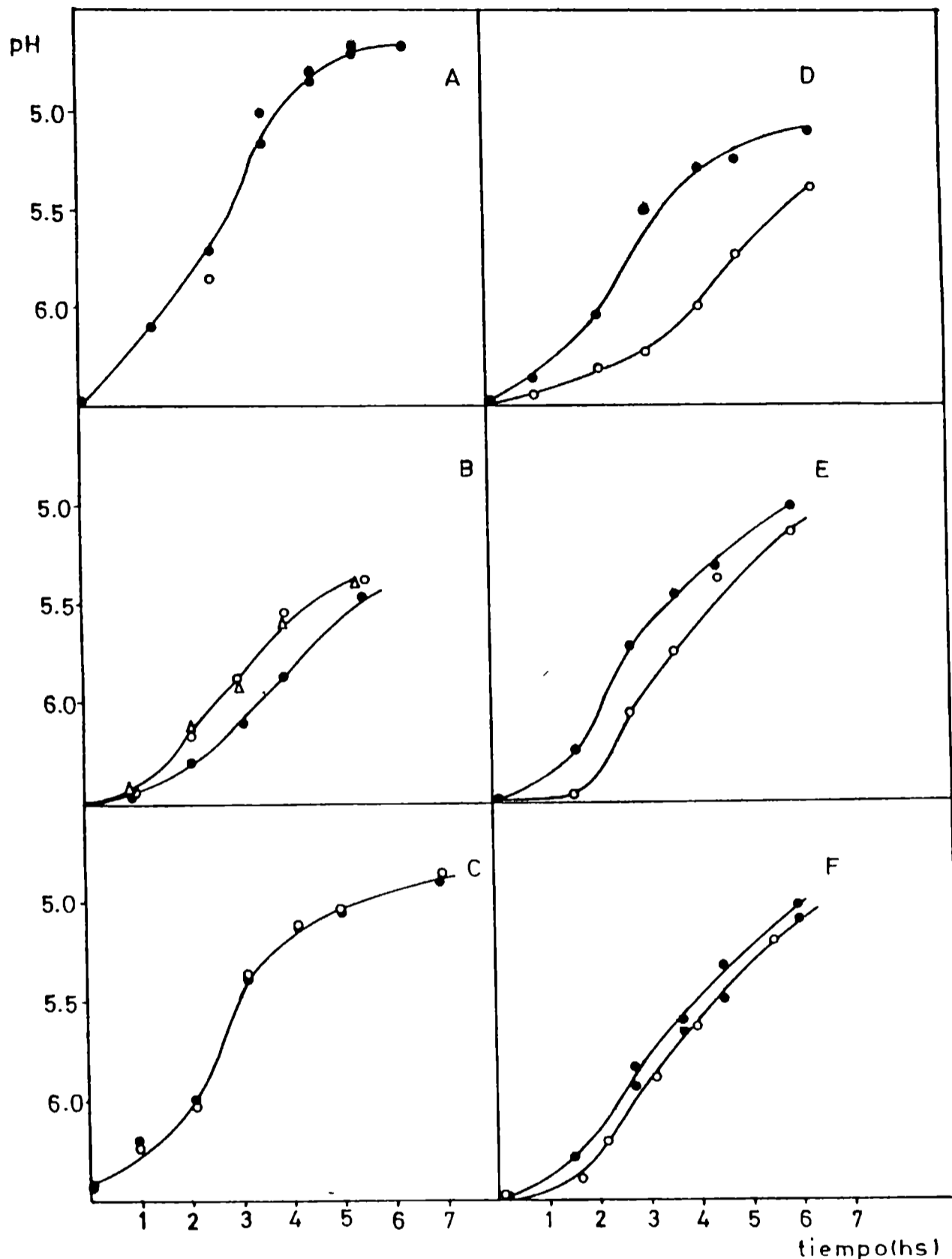


Figura 34: Cinéticas de acidificación en leche por *Lactobacillus bulgaricus* LBB antes y después de la congelación con diferentes crioprotectores. A: control sin congelar ($2,8 \times 10^8$ UFC/ml); B: crioprotector glicerol (Δ) 0,5 M ($4,4 \times 10^8$ UFC/ml), (\circ) 1 M ($3,9 \times 10^8$ UFC/ml) y (\bullet) 2 M ($3,2 \times 10^8$ UFC/ml); C: leche (\circ) 12% ($3,4 \times 10^8$ UFC/ml) y (\bullet) 24% ($3,4 \times 10^8$ UFC/ml); lactosa (\circ) 0,15 M ($1,2 \times 10^8$ UFC/ml), (\bullet) 0,3 M ($3,1 \times 10^8$ UFC/ml); E: trehalosa (\circ) 0,15 M ($2,5 \times 10^8$ UFC/ml), (\bullet) 0,3 M ($2,5 \times 10^8$ UFC/ml); F: sacarosa (\circ) 0,15 M ($4,0 \times 10^8$ UFC/ml), (\bullet) 0,3 M ($3,5 \times 10^8$ UFC/ml).

congeladas y descongeladas en presencia de glicerol 0,5, 1 y 2 M se muestran en la Figura 34 B. Las bacterias congeladas con glicerol 1 o 2 M acidifican el medio más rápido que las congeladas con glicerol 0,5 M. Comparando las cinéticas obtenidas con células sin congelar y las sometidas a congelación-descongelación se observa una disminución de la capacidad acidificante. A las 3 hs 30 min el control sin congelar llega a pH 5,4 mientras que las bacterias congeladas con glicerol 1 o 2 M alcanzan un pH 5,8.

Cuando la congelación se realiza en presencia de leche al 12 o 24% (Figura 34 C) se observa una cinética semejante a la obtenida con el control (Figura 34 A). Tanto las bacterias sin congelar, como las congeladas y descongeladas en presencia de leche 12 o 24% a las 3 hs 30 min de incubación acidificaron la leche hasta llegar a pH 5,4 demostrando que las dos concentraciones usadas presentan la misma eficiencia crioprotectora.

En la Figura 34 D, E y F se observan las cinéticas obtenidas luego de congelar y descongelar las bacterias en presencia de lactosa, trehalosa y sacarosa. Los tres azúcares, en una concentración 0,3 M, presentaron mejor eficiencia crioprotectora que el mismo azúcar 0,15 M, a las 3 hs 30 min de incubación los cultivos alcanzan un pH 5,5.

La diferencia entre el efecto crioprotector de la lactosa a dos concentraciones empleadas podría ser atribuida a la concentración de bacterias iniciales, ya que el número de bacterias viables presentes antes de congelar con lactosa 0,3 M fue el doble que el correspondiente a la lactosa 0,15 M.

Para comparar los distintos crioprotectores, se graficaron en la Figura 35 las cinéticas obtenidas con las concentraciones que mostraron mayor eficiencia crioprotectora. De acuerdo a lo observado la mejor condición de conservación sería leche, seguida por los tres disacáridos y por último glicerol.

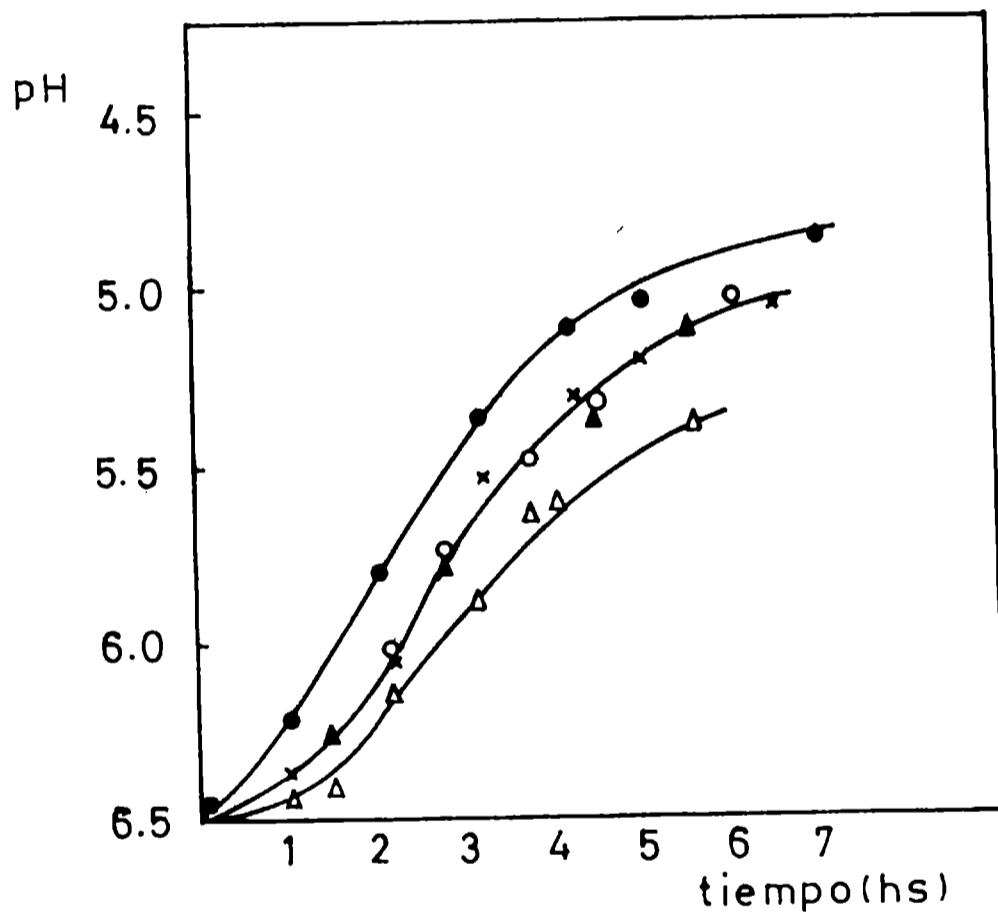


Figura 35: Cinéticas de acidificación en leche de *Lactobacillus bulgaricus* LBB después de la congelación en presencia de distintos crioprotectores. (●) leche 12%; (○) lactosa 0,3 M; (x) trehalosa 0,3 M; (△) glicerol 1 M.

5.4. Evaluación de la trehalosa como crioprotector de *Lactobacillus bulgaricus*

Ya se conocía la capacidad crioprotectora de la trehalosa sobre vesículas lipídicas y retículo sarcoplásmico (Rudolph y Crowe, 1985), y levaduras (Coutinho y col., 1989), pero no se conocía su efecto sobre bacterias lácticas. Para evaluar la eficiencia crioprotectora ejercida por este azúcar sobre dos cepas de *L. bulgaricus*, LBB y ATCC 11842, las bacterias fueron crecidas en caldo 1.1.1., cosechadas en fase estacionaria y congeladas en presencia de leche, caldo 1.1.1. y agua adicionada o no de trehalosa. La aptitud crioprotectora se evaluó mediante recuento de células viables y capacidad de acidificación luego de someter a las células a ciclos de congelación-descongelación (Esquema 2).

En la Figura 36 A se observa que cuando *L. bulgaricus* LBB se congela en agua o medio de cultivo el número de bacterias viables disminuye significativamente después de someter a las células a la congelación-descongelación. Esta disminución del número de bacterias viables es menor cuando se agrega trehalosa al agua o medio de cultivo hasta una concentración 0,3 M. La capacidad crioprotectora ofrecida por la trehalosa es comparable al efecto crioprotector de la leche (Figura 36 A). Cuando se evalúa la resistencia a la congelación de *L. bulgaricus* ATCC 11842 en los medios mencionados se observa que, si bien esta cepa es más resistente a la congelación, la adición de trehalosa también protege la viabilidad de las células sometidas a la congelación-descongelación (Figura 36 B).

La capacidad crioprotectora de la trehalosa también se observa en la recuperación de la actividad metabólica bacteriana evaluada por medida del pH a un tiempo dado (Figura 37). El pH producido por el cultivo congelado-descongelado se expresó como porcentaje del pH producido por el mismo cultivo sin congelar. Cuando LBB es congelada en medio de cultivo con trehalosa

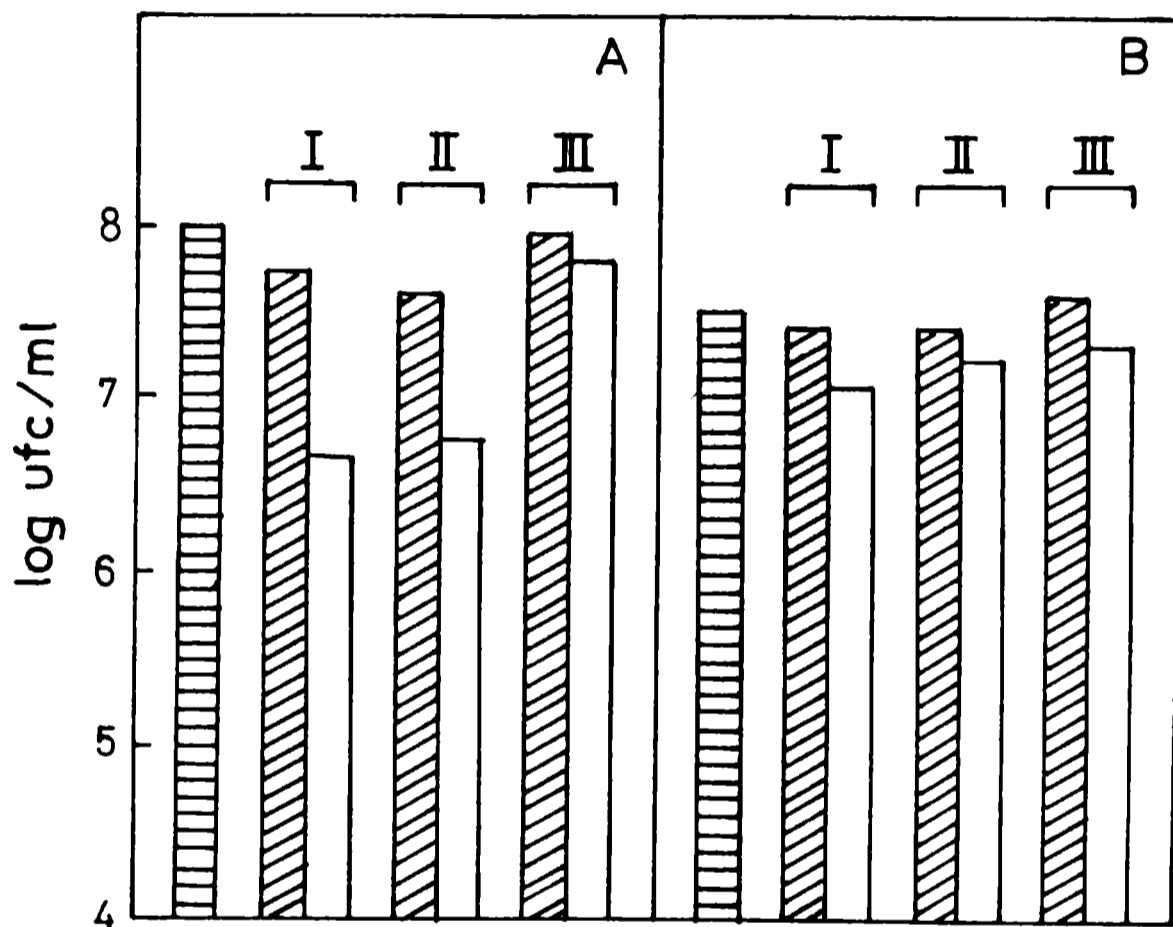


Figura 36: Efecto de un ciclo de congelación-descongelación en la viabilidad de *Lactobacillus bulgaricus* LBB y ATCC 11842. *Lactobacillus bulgaricus* LBB (A) y ATCC 11842 (B) se congelaron en agua (I), caldo 1.1.1. (II) y leche (III) en presencia (▨) y ausencia (□) de trehalosa. (≡) número de bacterias viables antes de congelar.

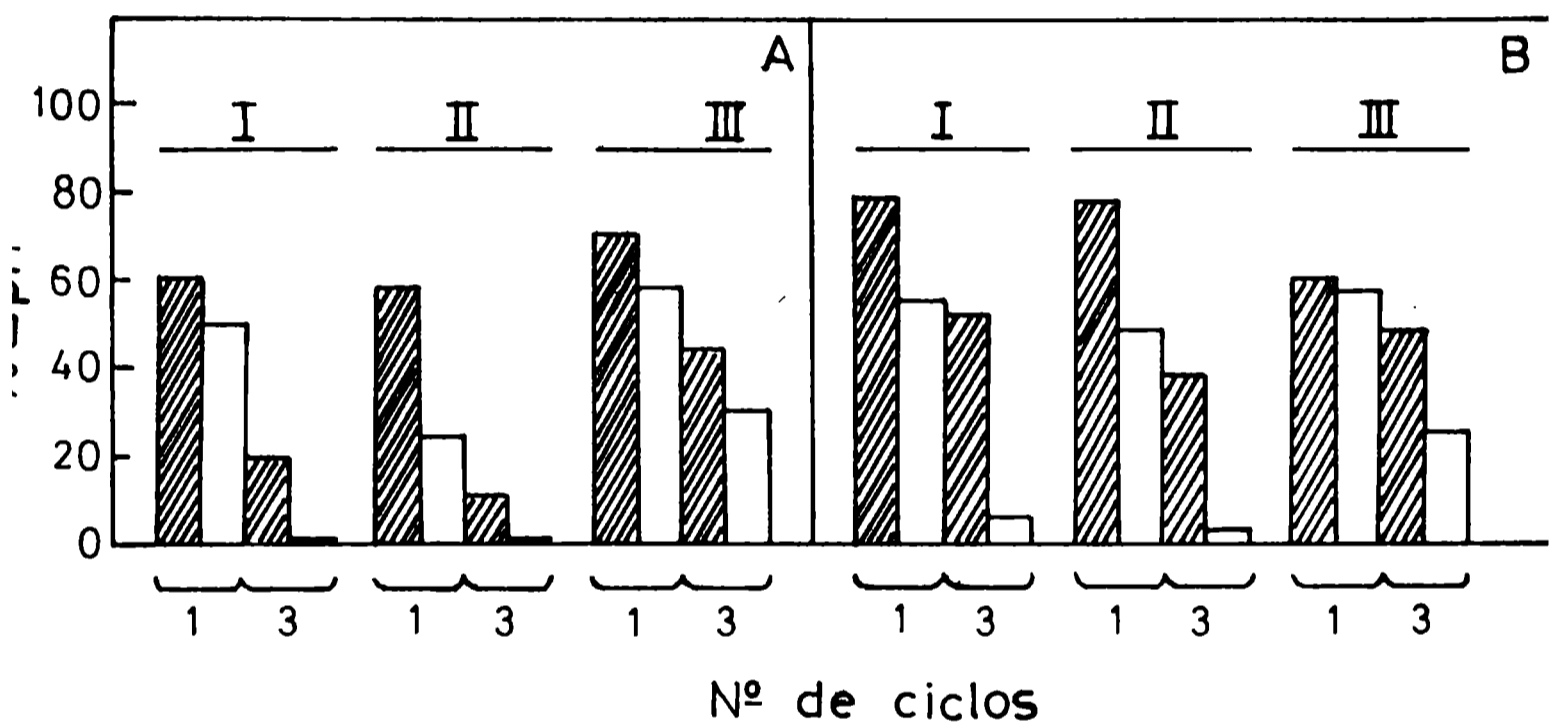




Figura 37: Acidez producida en leche por *Lactobacillus bulgaricus* LBB (A) y ATCC (B) después de 1 y 3 ciclos de congelación-descongelación en distintos medios con y sin trehalosa. Las células se congelaron y descongelaron en agua (I), medio de cultivo (II) y leche (III) con  y sin  trehalosa. $\Delta\text{pH} = \text{pH}_{\text{medio sin sembrar}} - \text{pH}_{\text{del cultivo a 5 hs.}}$. $\% \Delta\text{pH} = (\Delta\text{pH}_{\text{cultivo sin congelar}} / \Delta\text{pH}_{\text{cultivo congelado}}) \times 100$. Todas las muestras se incubaron a 37°C durante 5 horas.

o agua con trehalosa el descenso de pH obtenido es similar a aquél que se produce cuando las bacterias se congelan en leche, y superior al obtenido cuando las células se congelan en caldo 1.1.1. o agua sin trehalosa.

Para la cepa ATCC 11842 el efecto protector ejercido por la trehalosa adicionada al agua o medio supera la capacidad crioprotectora de la leche. Sin embargo, para esta cepa la adición de trehalosa a la leche no ejerce ningún efecto crioprotector adicional sobre la actividad metabólica evaluada luego de un ciclo de congelación-descongelación. Luego de tres ciclos de congelación-descongelación la trehalosa adicionada a la leche incrementa el efecto crioprotector de la leche (Figura 37 B).

La capacidad de la trehalosa para preservar la viabilidad de las bacterias sometidas a ciclos de congelación-descongelación se observa en la Figura 38. El porcentaje de células sobrevivientes sigue una relación exponencial con el número de ciclos como ya se había descrito para bacilos coliformes y neumococos (Smith, 1961).

En la Tabla 14 se detallan los resultados obtenidos después de congelar ambas cepas. Los ciclos de congelación-descongelación afectan en mayor proporción a *L. bulgaricus* LBB (Figura 38 A) y la trehalosa le confiere a esta cepa una resistencia comparable a la cepa ATCC 11842 (Figura 38 B) en medio o agua sin trehalosa.

Cuando la bacteria se congela en leche con trehalosa la viabilidad obtenida es 1,3 a 1,8 veces superior a la recuperación obtenida cuando las células se congelan en leche. Cuando se congelan en agua o medio más trehalosa la viabilidad obtenida es desde 6 a 160 veces superior que en agua o medio sin trehalosa. Esto es debido a que los componentes de la leche de por sí ejercen un efecto crioprotector sobre esta bacteria (De Antoni y col., 1989).

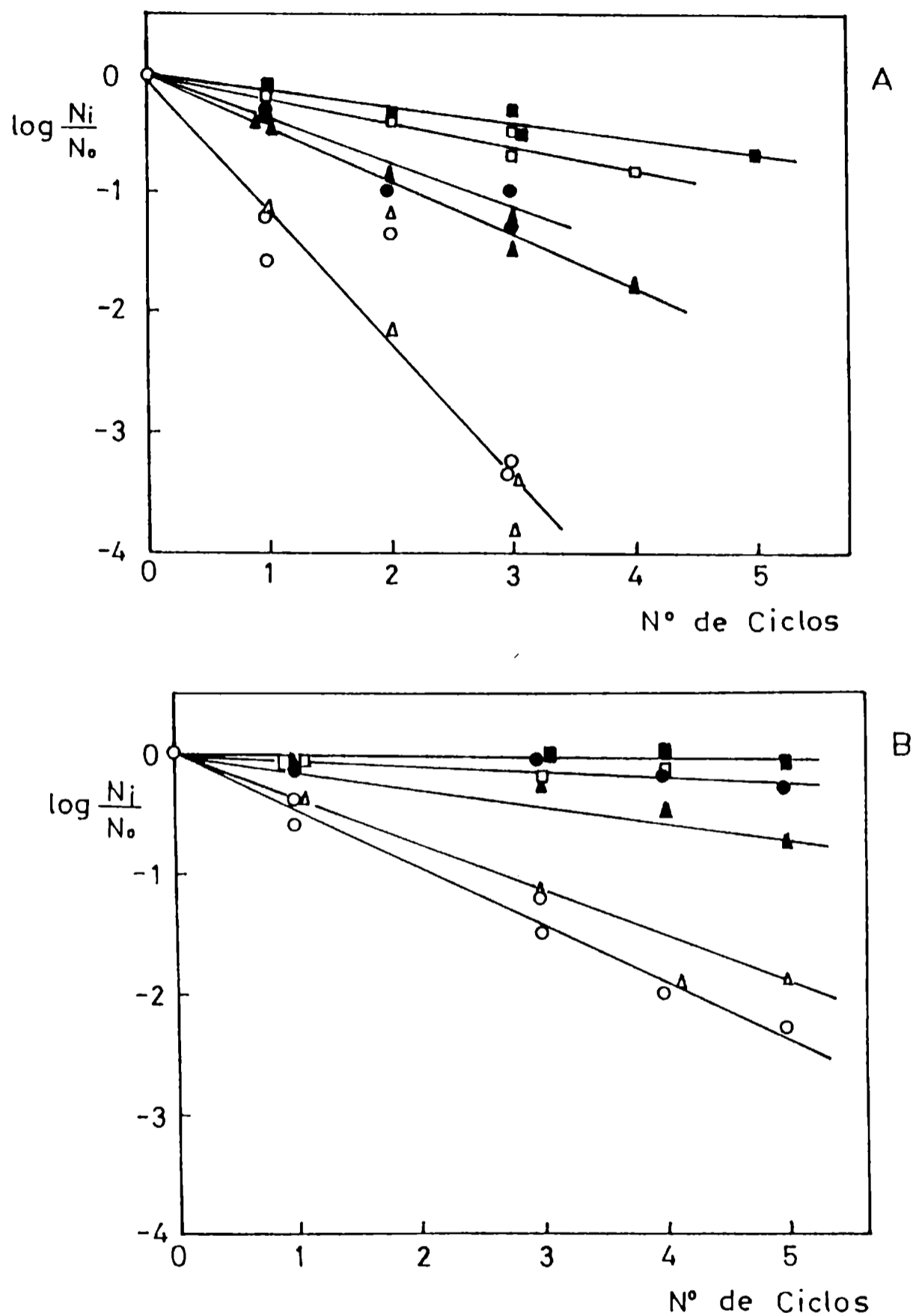


Figura 38: Fracción de células viables después de la congelación-descongelación de *Lactobacillus bulgaricus* LBB (A) y ATCC 11842 (B) en agua (o), agua con trehalosa (●), medio de cultivo (Δ), medio de cultivo con trehalosa (▲), leche (□), leche con trehalosa (■). El coeficiente de regresión es 0,91 excepto para ATCC en leche con y sin trehalosa que presenta valores de 0,74-0,84.

Tabla 14: Porcentaje de bacterias viables después de 1 y 3 ciclos de congelación-descongelación en presencia y ausencia de trehalosa.

Cepa	Medio de congelación	1 ciclo	3 ciclos	Medio de congelación + trehalosa	1 ciclo	3 ciclos
LBB	H ₂ O	4	0,05	H ₂ O	50	9
	Caldo 1.1.1.	6	0,05	Caldo 1.1.1.	30	3
	Leche 10%	62	24,00	Leche 10%	85	32
ATCC 11842	H ₂ O	43	3,40	H ₂ O	85	82
	Caldo 1.1.1.	38	7,50	Caldo 1.1.1.	75	50
	Leche 10%	76	65,00	Leche 10%	90	100

Estos resultados nos muestran que la trehalosa ejerce un efecto crioprotector sobre *L. bulgaricus* sometido a congelación-descongelación. Esta protección se visualiza sobre la viabilidad y la capacidad de acidificación después de la congelación. En otras palabras, esto sugiere que la protección debida a la trehalosa está relacionada a la integridad estructural y funcional de la bacteria.

Resultados previos en sistemas modelos indican que la trehalosa actúa en las membranas reemplazando las moléculas de agua que hidratan a los fosfolípidos (Anchordoguy y col., 1987) otorgándoles estabilidad durante la congelación-descongelación. Por lo tanto podríamos pensar que la trehalosa actuaría sobre la membrana del lactobacilo protegiéndolo del daño producido durante los ciclos de congelación-descongelación.

5.5. Estudio comparativo de la capacidad crioprotectora de distintos azúcares

Resultados anteriores muestran que trehalosa, sacarosa y lactosa poseen una eficiencia crioprotectora semejante (Figura 35). Con el objeto de evaluar la capacidad crioprotectora de los tres azúcares en función del tiempo de almacenamiento, las células desarrolladas en Caldo 1.1.1. se cosecharon al llegar a la fase estacionaria y se resuspendieron en los tres disacáridos en concentración 0,3 M que había resultado la mejor concentración de las estudiadas previamente. Las muestras se congelaron a -80°C y se almacenaron durante 7 días y 6 meses. Antes y después de la congelación-descongelación se evaluó la eficiencia crioprotectora mediante cinéticas de crecimiento en medio 1.1.1. por lectura de absorbancia a 550 nm y por determinación de test de actividad (Esquema 2).

En la Figura 39 A, B y C se observan las cinéticas obtenidas en las tres condiciones de congelación antes y después del almacenamiento a -80°C durante 7 y 60 días.

Las cinéticas obtenidas con las bacterias sin congelar (Figura 39 A) resuspendidas en los diferentes azúcares no difieren entre sí, todas parten de igual absorbancia inicial. El período de latencia para las bacterias resuspendidas en lactosa y trehalosa fue de 1 h y 1 h 30 min para las resuspendidas en sacarosa. Al descongelar las células luego de 7 días de almacenamiento a -80°C (Figura 39 B) los tres crioprotectores muestran igual eficiencia. La $A_{550\text{nm}}$ inicial es igual entre los distintos crioprotectores e igual al control sin congelar. El período de latencia se incrementa en 30 minutos para sacarosa y lactosa y 1 hora para trehalosa.

Las cinéticas de crecimiento obtenidas con las bacterias descongeladas después de 60 días de almacenamiento a -80°C (Figura 39 C) muestran una fase de latencia más larga lo que nos indica que durante el almacenamiento las células sufren daño funcional o estructural. Comparando la fase de latencia de los controles sin congelar (Figura 39 A) y después de 6 meses de almacenamiento a -80°C (Figura 39 C) se observa que las células congeladas con sacarosa muestran un incremento en la fase de latencia de 30 min, las congeladas con trehalosa de 1 hora y las congeladas con lactosa de 1 h 30 min. Si bien todas las cinéticas se realizaron con igual número de bacterias (1×10^6 UFC/ml) la mayor fase de latencia se obtuvo después de congelar y almacenar durante 6 meses con lactosa.

Además es notable el descenso de la $A_{550\text{nm}}$ durante la fase de latencia de las cinéticas obtenidas con las células almacenadas durante 6 meses, siendo este efecto más acentuado cuando el crioprotector es lactosa. Luego de este descenso la bacteria comienza su crecimiento exponencial.

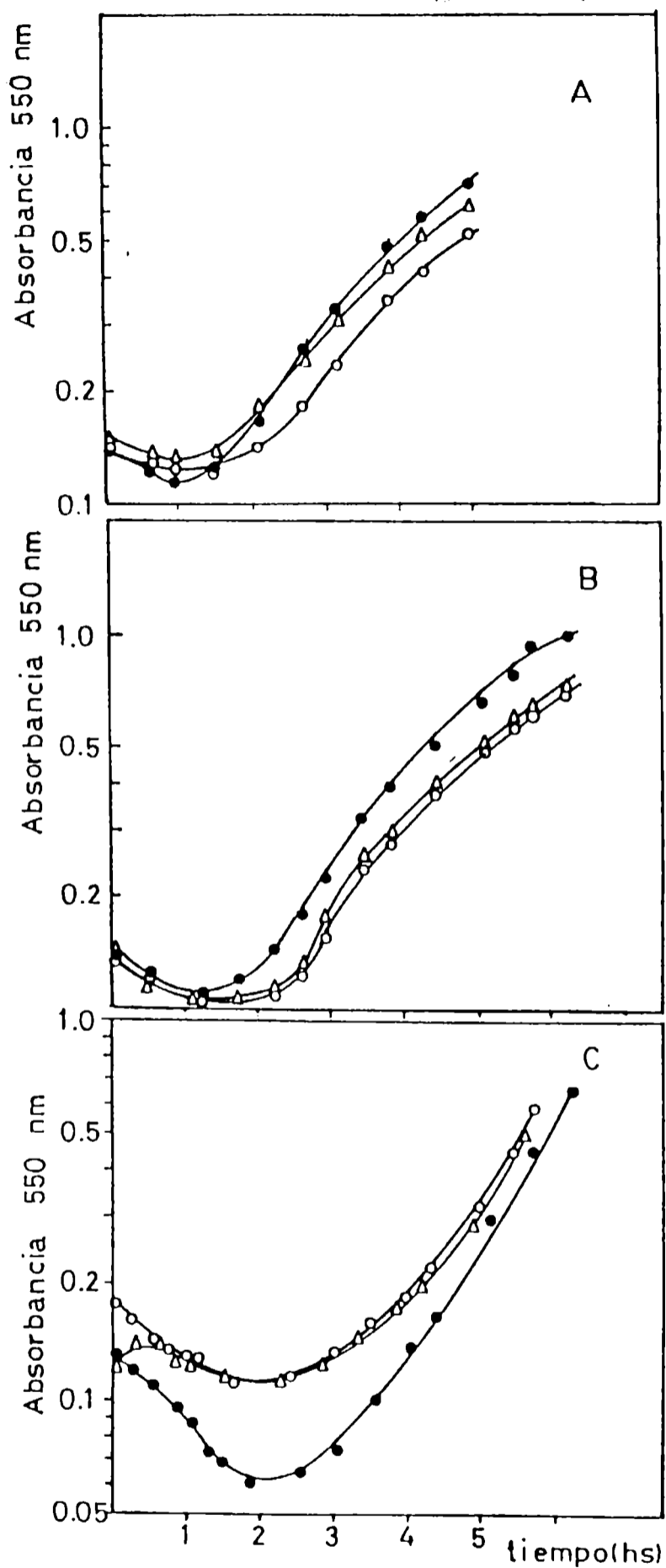


Figura 39: Cinéticas de crecimiento en caldo 1.1.1. de *Lactobacillus bulgaricus* LBB antes de congelar (A) y después de ser congelado y almacenado a -80°C durante 7 días (B) y 6 meses (C), en presencia de lactosa (●), sacarosa (○) y trehalosa (Δ).

La eficiencia crioprotectora también se evaluó sobre la capacidad acidificante mediante la realización de test de actividad (Kaneko y col., 1987).

En los test de actividad se evalúa la acidez alcanzada a un determinado tiempo de incubación por cultivos sembrados con diferentes porcentajes de un mismo inóculo. El ΔpH obtenido en función del porcentaje de inóculo da una línea recta como se observa en la Figura 40. En la misma, se presentan los tests de actividad obtenidos con los cultivos resuspendidos en los tres azúcares antes de congelar y después de 7 días y 6 meses de almacenamiento a -80°C . En la Figura 40 A, se observa que cuando el crioprotector usado es lactosa 0,3 M a los 7 días de almacenamiento congelado hay una disminución de la acidez producida por el cultivo. Sin embargo, el tiempo de almacenamiento congelado no produce un daño adicional a la actividad metabólica bacteriana. La Figura 40 B muestra que sacarosa 0,3 M es un buen crioprotector para esta bacteria pues luego de 7 días de almacenamiento a -80°C la actividad metabólica evaluada es la misma. Luego de 6 meses de almacenamiento su actividad metabólica disminuye demostrando que la sacarosa no protege del daño ocasionado por el almacenamiento. Cuando el crioprotector es trehalosa 0,3 M (Figura 40 C) se observa una disminución del ΔpH obtenido para cada porcentaje de inóculo que se acentúa notablemente luego de 6 meses de almacenamiento.

Es importante destacar que los resultados obtenidos luego de 7 días de almacenamiento son semejantes a resultados obtenidos inmediatamente después de congelar-descongelar. Por lo tanto los mismos se pueden atribuir al efecto del proceso de congelación-descongelación. Se puede decir que la lactosa (Figura 40 A) no protege a la célula durante el proceso de congelación-descongelación pero sí durante el almacenamiento, la sacarosa ejerce su efecto crioprotector durante la congelación descongelación y la trehalosa protege parcialmente a la célula durante esta etapa.

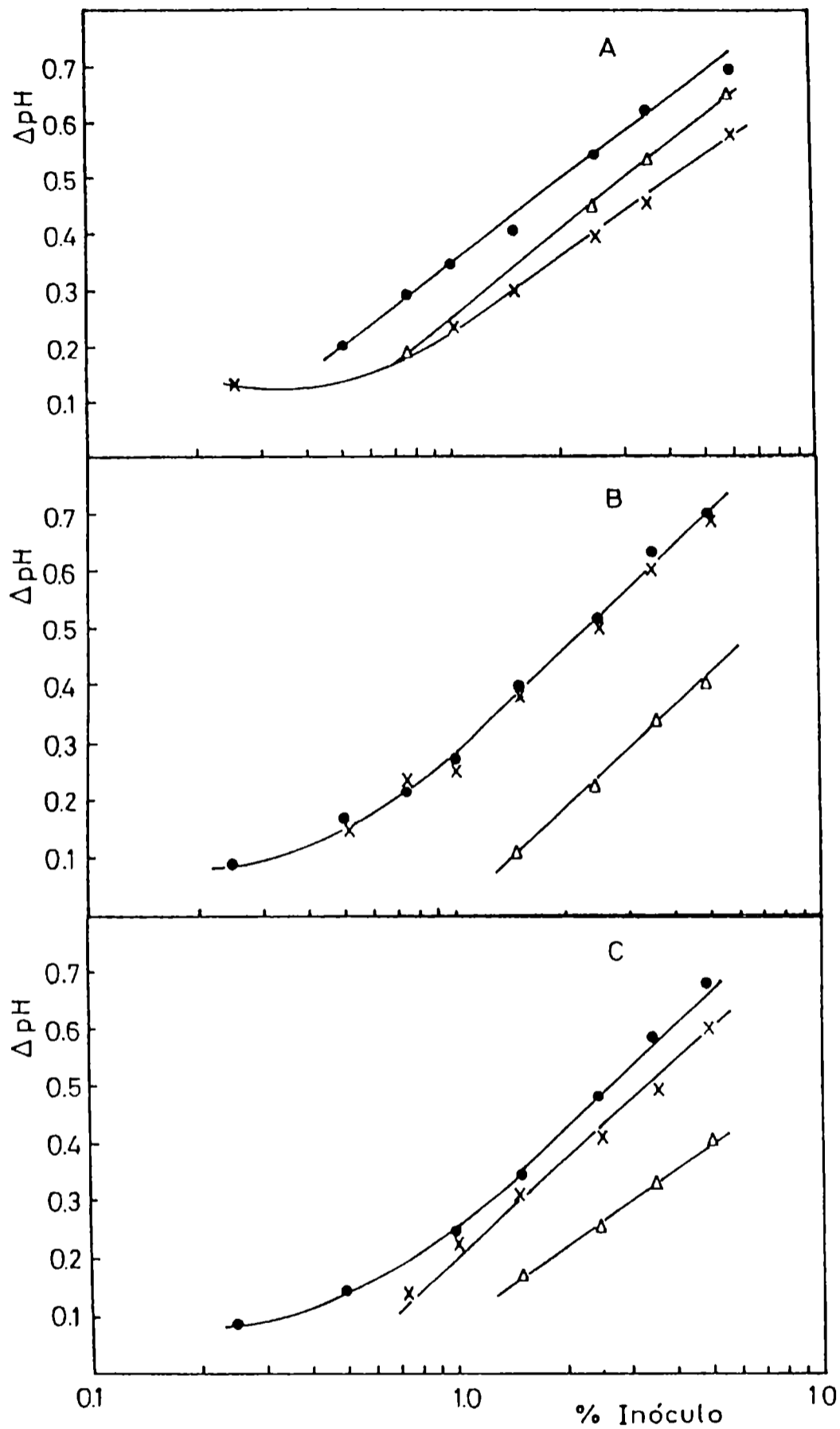


Figura 40: Test de actividad de *Lactobacillus bulgaricus* LBB congelado en presencia de lactosa (A), sacarosa (B) y trehalosa (C). Control antes de congelar (●). Después de 7 días de almacenamiento a -80°C (x). Después de 6 meses de almacenamiento a -80°C (Δ).

$$\Delta pH = pH_{\text{medio sin sembrar}} - pH_{\text{después de 4 hs de incubación}}$$

Estos resultados se pueden explicar sugiriendo que los azúcares estudiados actúan a distinto nivel, la lactosa protegería a la célula del daño producido durante el reordenamiento cristalino que se produce durante el almacenamiento, mientras que los otros azúcares ejercerían su efecto protector durante el proceso de congelación-decongelación, ya sea a nivel de membrana o minimizando los efectos de concentración de solutos (Mazur, 1970; Anchordoguy y col., 1987).

Se puede concluir que los tres azúcares resultan eficientes para la conservación de *L. bulgaricus* siendo mejor la lactosa para almacenamientos prolongados.

5.6. Influencia del calcio en el medio de crecimiento en la congelación de *Lactobacillus bulgaricus*

Otra variable importante en la viabilidad obtenida después de la congelación-descongelación es el medio en el cual las bacterias se crecen antes de ser congeladas. La presencia de Tween 80 en el medio de crecimiento mejora la supervivencia de *L. bulgaricus* luego de la congelación en nitrógeno líquido (Smittle y col., 1972) porque modifica la composición en ácidos grasos de la membrana (Smittle y col., 1974). El mismo efecto protector se obtiene adicionando Span 80 (derivado del ácido oleico) que también otorga mayor resistencia a *L. bulgaricus* durante el almacenamiento a 5°C de cultivos líquidos concentrados (Kaneko y col., 1987).

Wright y Klaenhammer (1983a) demostraron que ciertas cepas de *L. bulgaricus* desarrolladas en MRS y luego congeladas en leche 1% p/v presentan mayor resistencia a la congelación-descongelación si al medio se le adiciona CaCl_2 0,0045 M. Este efecto positivo del calcio también se observa con cepas de *L. acidophilus* (Wright y Klaenhammer, 1981).

En base a estos resultados se evaluó el efecto ejercido por el calcio en el medio de crecimiento sobre dos cepas de *L. bulgaricus* LBB y LBR. Para ello los cultivos se procesaron según se indica en Materiales y Métodos y Esquema 2 y la resistencia a la congelación-descongelación fue evaluada mediante la determinación de bacterias viables, el tiempo de latencia de las cinéticas de crecimiento en caldo 1.1.1. y la producción de acidez.

La Figura 41 muestra las cinéticas obtenidas con *L. bulgaricus* LBB antes de congelar y después de ser sometido a congelación-descongelación en glicerol 1 M.

Las células desarrolladas en caldo 1.1.1. con calcio y sometidas a la congelación-descongelación muestran una fase de latencia mayor que el control sin congelar y a las 2 horas de incubación comienzan su fase de crecimiento exponencial. Por su parte, las células provenientes de 1.1.1. sin calcio presentan una fase de latencia mayor de 8 horas.

Es importante resaltar que la concentración inicial de bacterias en ambas cinéticas es similar. Esto significa que las células crecidas en medio con calcio recuperan su actividad más rápido que aquéllas provenientes de medio 1.1.1..

La Tabla 15 muestra el porcentaje de células viables después de la congelación-descongelación de cepas desarrolladas en presencia o ausencia de calcio y congeladas con glicerol 1 o 2 M.

Las células congeladas en glicerol 1 M y cosechadas en fase estacionaria temprana o estacionaria tardía resultan más resistentes a la congelación si previamente se las desarrolla en 1.1.1. con calcio. Cuando las células se cosechan en fase estacionaria temprana y se descongelan después de 7 días de almacenamiento, no se observa diferencia entre las bacterias provenientes de medio con o sin calcio. Sin embargo, a los 70 días de almacenamiento las células crecidas en presencia de calcio resultan más

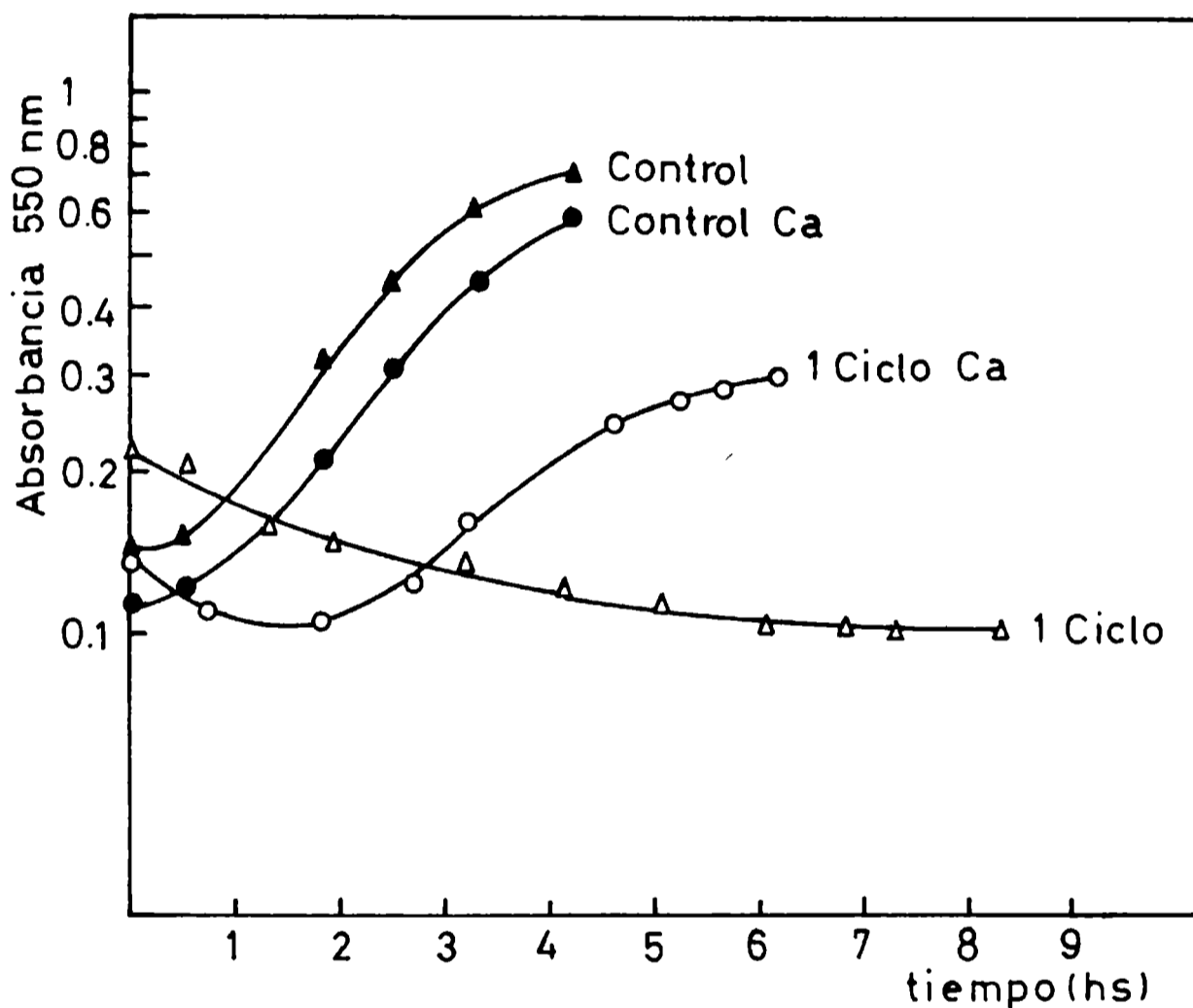


Figura 41: Cinética de crecimiento en caldo 1.1.1. de *Lactobacillus bulgaricus* LBB antes de congelar y después de un ciclo de congelación-descongelación en glicerol 1 M.

Medio de crecimiento previo a la congelación	Control antes de la congelación	Un ciclo de congelación-descongelación
1.1.1.	▲	△
1.1.1.+ Ca	●	○

Tabla 15: Porcentaje de células viables luego de la congelación-descongelación de *Lactobacillus bulgaricus* LBB desarrollado con y sin Ca.

Crioprotector	Medio de crecimiento	Porcentaje de células sobrevivientes*			
		Células cosechadas en fase estacionaria temprana		Células cosechadas en fase estacionaria tardía	
		7 días	70 días	7 días	160 días
Glicerol 1 M	1.1.1.	75	10	36	ND
	1.1.1. + Ca	82	50	53	ND
Glicerol 2 M	1.1.1.	34	30	30	0,5
	1.1.1. + Ca	37	40	26	18

* Los resultados son el promedio de 2 o más determinaciones con una desviación estándar de ± 1 a $\pm 6\%$. El porcentaje de células sobrevivientes se calculó con respecto a un control sin congelar. La desviación entre diferentes experimentos fue 5% o menos.

ND: no determinado.

resistentes a la congelación. El porcentaje de células viables luego de descongelar es de un 50% mientras que sólo se recupera un 10% de las bacterias provenientes de medio 1.1.1.. Con las células congeladas en fase estacionaria tardía a los 7 días de almacenamiento ya se observan diferencias entre las células provenientes de ambos medios, siendo más resistentes las células crecidas con calcio.

Cuando las bacterias cosechadas a partir de medio 1.1.1. o 1.1.1. con calcio se congelan con glicerol 2 M no se observan diferencias en el porcentaje de células que permanecen viables después de 7 o 70 días de almacenamiento a -80°C . En células cosechadas en fase estacionaria tardía la influencia positiva ejercida por el calcio es evidente ya que después de 160 días de almacenamiento a -80°C en glicerol 2 M el porcentaje de células sobrevivientes es 18%. Sin embargo, cuando las bacterias provienen de caldo 1.1.1. es solamente 0,5%.

Estos resultados son coincidentes con los obtenidos al evaluar la producción de acidez de células sometidas a ciclos de congelación-descongelación. En la Figura 42 se observa que las bacterias desarrolladas en presencia de calcio son más resistentes que las desarrolladas en ausencia de calcio cuando se conservan en agua o glicerol 1 M.

Se puede concluir entonces que *L. bulgaricus* LBB desarrollado en medio de cultivo con calcio presenta mayor resistencia a la congelación con glicerol como crioprotector. Sin embargo, este efecto no se aprecia cuando se utiliza leche como crioprotector. En la Tabla 16 puede apreciarse que después de 7 días de almacenamiento a -80°C en leche 12% p/v la pérdida de viabilidad es 1,5 veces mayor cuando las bacterias provienen de cultivos desarrollados en presencia de calcio. Después de 160 días de almacenamiento a -80°C dicha diferencia se acrecienta, siendo 10 veces mayor cuando las células crecen en medio 1.1.1. con calcio. En este caso la presencia de calcio en el medio de crecimiento de la bacteria no ejerce un efecto

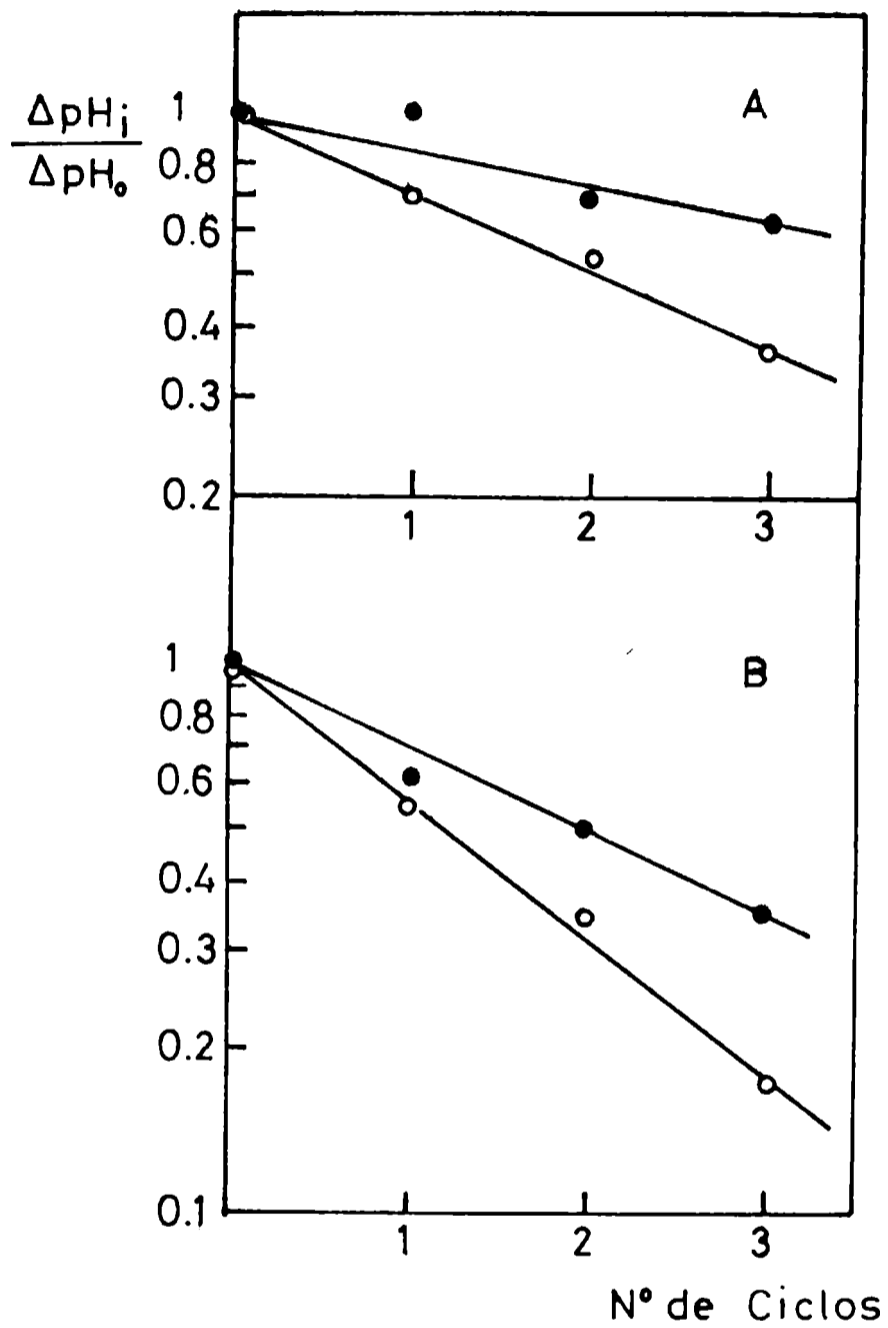


Figura 42: Producción de acidez en leche por *Lactobacillus bulgaricus* LBB después de la congelación en glicerol 1 M (A) o agua (B). ● bacterias crecidas en caldo 1.1.1. con calcio. ○ bacterias crecidas en caldo 1.1.1..

Tabla 16: Efecto de la concentración de leche en la congelación de *Lactobacillus bulgaricus* LBB desarrollado en presencia y ausencia de calcio.

Crioprotector	Almacenamiento	Porcentaje de células sobrevivientes después de la congelación*	
		Medio de crecimiento Caldo 1.1.1.	Caldo 1.1.1. + Ca
LPR 12%	7 días	62	39
	160 días	6,1	0,59
LPR 6%	7 días	68	39
LPR 0,1%	7 días	53	30

* Todos los resultados son el promedio de 2 o más determinaciones con una desviación estándar de $\pm 2\%$.

protector, por el contrario, perjudica la viabilidad de las células luego de la congelación-descongelación. Los mismos resultados obtenidos con leche 12% como crioprotector se obtienen con leche 0,1 y 6%. Esto indica que el efecto negativo ejercido por el calcio en la congelación-descongelación usando leche como crioprotector, no depende de la concentración de sólidos de leche dado que se observa en todas las concentraciones ensayadas.

Para confirmar estos resultados en tiempos más cortos se realizaron nuevos experimentos sometiendo las células a ciclos de congelación-descongelación. La presencia de calcio en el medio de crecimiento (Figura 43) produce un efecto negativo sobre la capacidad crioprotectora de la leche a las dos concentraciones ensayadas. Las células crecidas en 1.1.1. con calcio exhiben una reducción del número de células en función de los ciclos. Dicha reducción es menor cuando las células se desarrollan en 1.1.1. sin calcio. Las diferencias existentes entre los cultivos crecidos en presencia y ausencia de calcio se ven incrementadas con los ciclos de congelación-descongelación confirmando los resultados de la Tabla 16. Esto significa que el calcio en el medio de cultivo induce a una mayor susceptibilidad a la congelación-descongelación cuando el crioprotector usado es leche. La evaluación de la eficiencia crioprotectora mediante el recuento de bacterias viables puede llevar a conclusiones erróneas dado que el crecimiento en el medio con calcio produce acortamientos de cadenas de *L. bulgaricus* (Wright y Klaenhammer, 1983b). Por lo tanto, para corroborar los resultados obtenidos con los crioprotectores se realizaron nuevas experiencias donde se evaluó la eficiencia crioprotectora sobre la capacidad de acidificación de las bacterias. Este parámetro fue evaluado comparando la acidez producida por el cultivo después de ser sometido a congelación-descongelación y la acidez producida por ese mismo cultivo antes de congelar.

En la Figura 44 se observa que las células propagadas con calcio y congeladas en LPR 0,1 y 6% son más susceptibles al daño durante este proceso

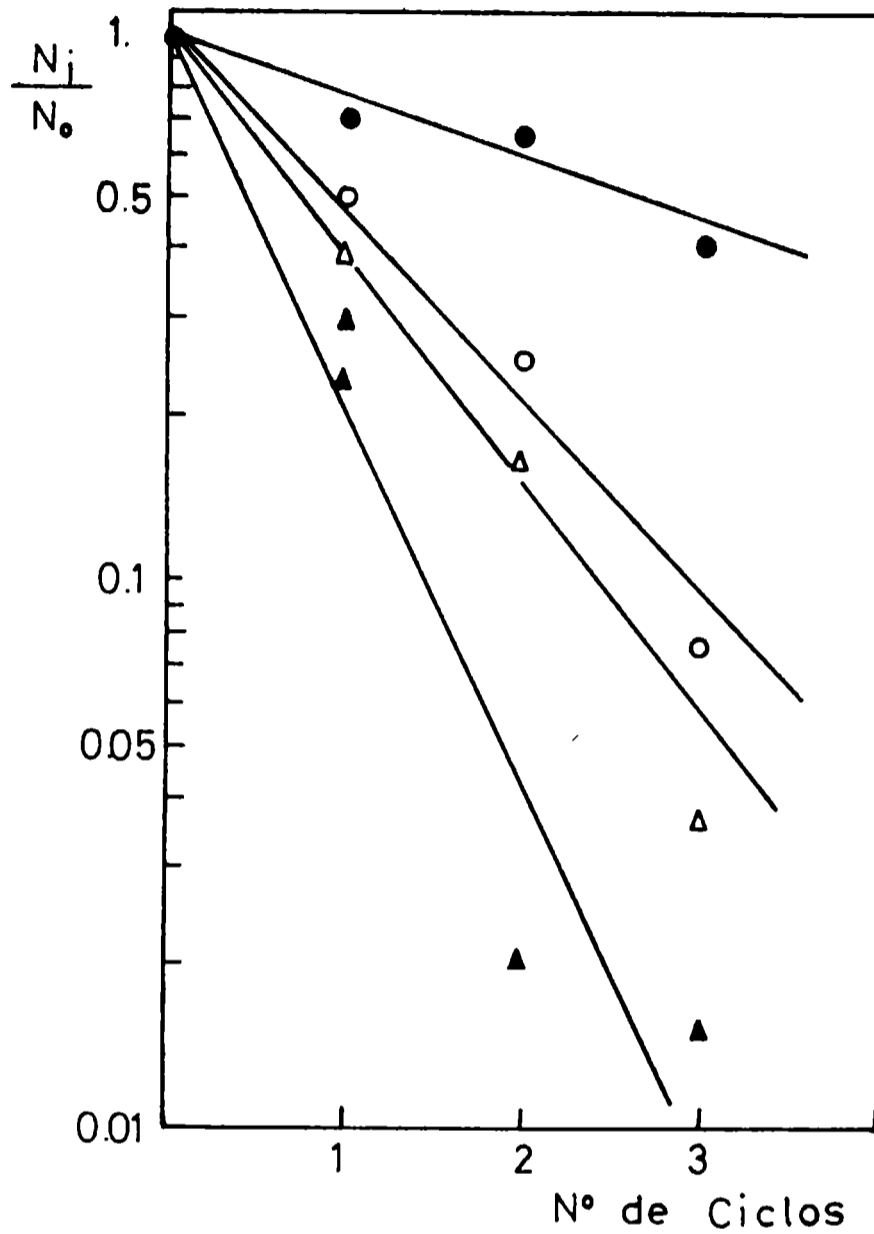


Figura 43: Fracción de células viables de *Lactobacillus bulgaricus* LBB en función del número de ciclos de congelación-descongelación.

Crioprotector	Medio de crecimiento	Simbolo
LPR 0,1%	1.1.1. + Ca	▲
	1.1.1.	○
LPR 6%	1.1.1. + Ca	△
	1.1.1.	●

N_0 = UFC/ml antes de congelar

N_i = UFC/ml después de i ciclos de congelación-descongelación.

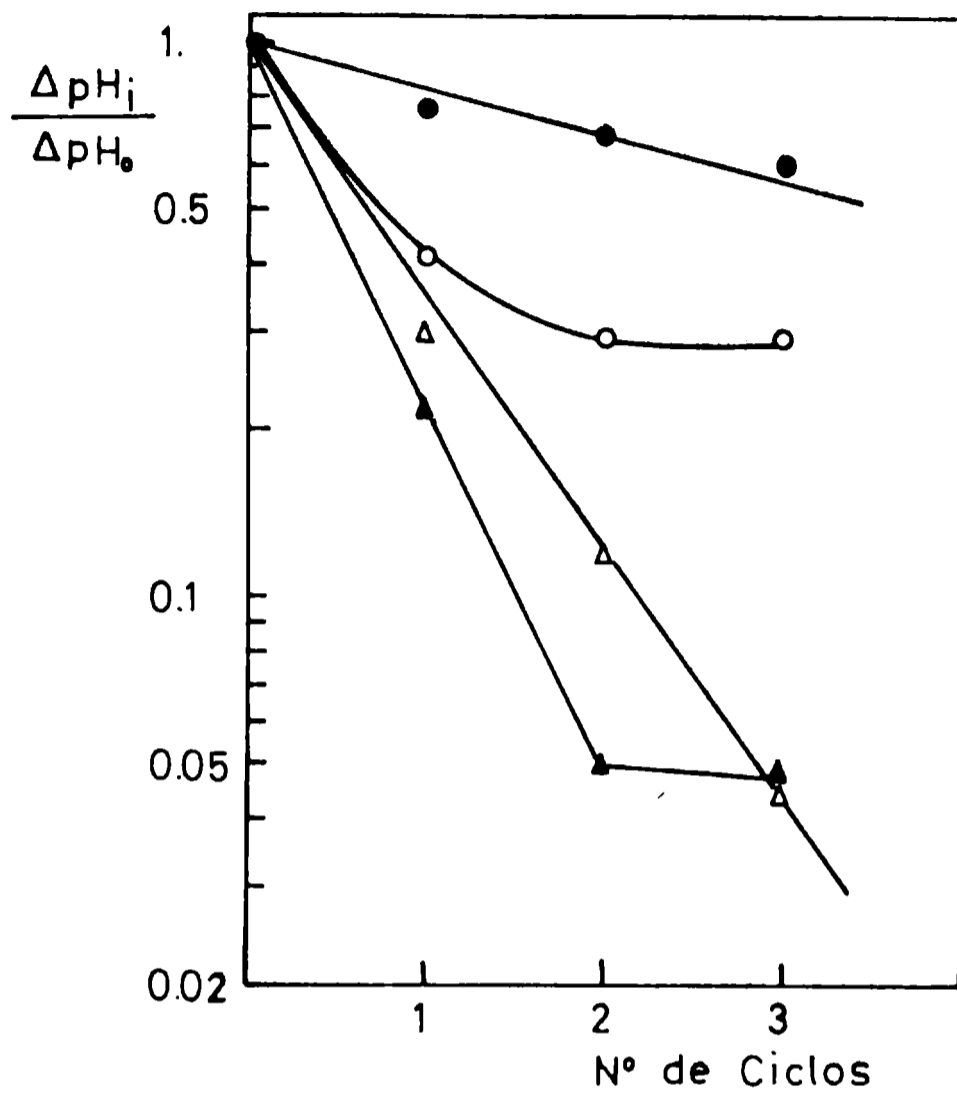


Figura 44: Acidez producida en leche por *Lactobacillus bulgaricus* LBB sometido a ciclos de congelación-descongelación referidos a un control sin congelar.

Crioprotector	Medio de crecimiento	Símbolo
LPR 0,1%	1.1.1. con Ca	▲
	1.1.1.	○
LPR 6%	1.1.1. con Ca	△
	1.1.1.	●

$\Delta p H_0$ = $\Delta p H$ obtenido con LBB sin congelar.

$\Delta p H_i$ = $\Delta p H$ obtenido con LBB después de i ciclos de congelación-descongelación.

que las provenientes de caldo 1.1.1., coincidiendo con los resultados presentados en la Figura 43.

El mismo estudio de crioprotección se realizó con *L. bulgaricus* LBR. En la Figura 45 se observa la fracción de células viables obtenidas después de congelar y descongelar a *L. bulgaricus* LBR en agua, glicerol o leche.

La presencia de calcio en el medio de crecimiento ejerce un efecto crioprotector positivo sobre esta cepa en las tres condiciones ensayadas. La presencia de calcio en el medio de crecimiento y glicerol o leche como crioprotectores resultan las condiciones de conservación más eficientes (Figura 45).

Lactobacillus bulgaricus LBR desarrollado en 1.1.1. sin calcio es muy susceptible a la congelación-descongelación. En estas condiciones, la leche resulta la mejor condición de conservación y glicerol es tan inefectivo como el agua (Figura 45).

La eficiencia crioprotectora del calcio también se evaluó mediante el estudio de la capacidad acidificante antes y después de la congelación-descongelación.

En la Tabla 17 se observa que las bacterias desarrolladas en 1.1.1. con calcio y congeladas en agua, glicerol o leche, producen una acidez en leche después de dos ciclos de congelación entre 30 y 80% con respecto al control sin congelar. Sin embargo, las bacterias desarrolladas en 1.1.1. y congeladas en las mismas condiciones no acidificaron la leche después de cuatro horas de incubación. Los controles correspondientes produjeron una acidez comparable a la obtenida por bacterias desarrolladas en 1.1.1. con calcio. Los resultados de esta tabla indican que el orden de crioprotección para bacterias provenientes de 1.1.1. con calcio es glicerol, leche y agua confirmando los resultados de la Figura 45.

De los resultados presentados surge que la resistencia a la congelación-descongelación de *L. bulgaricus* depende de la presencia de calcio en

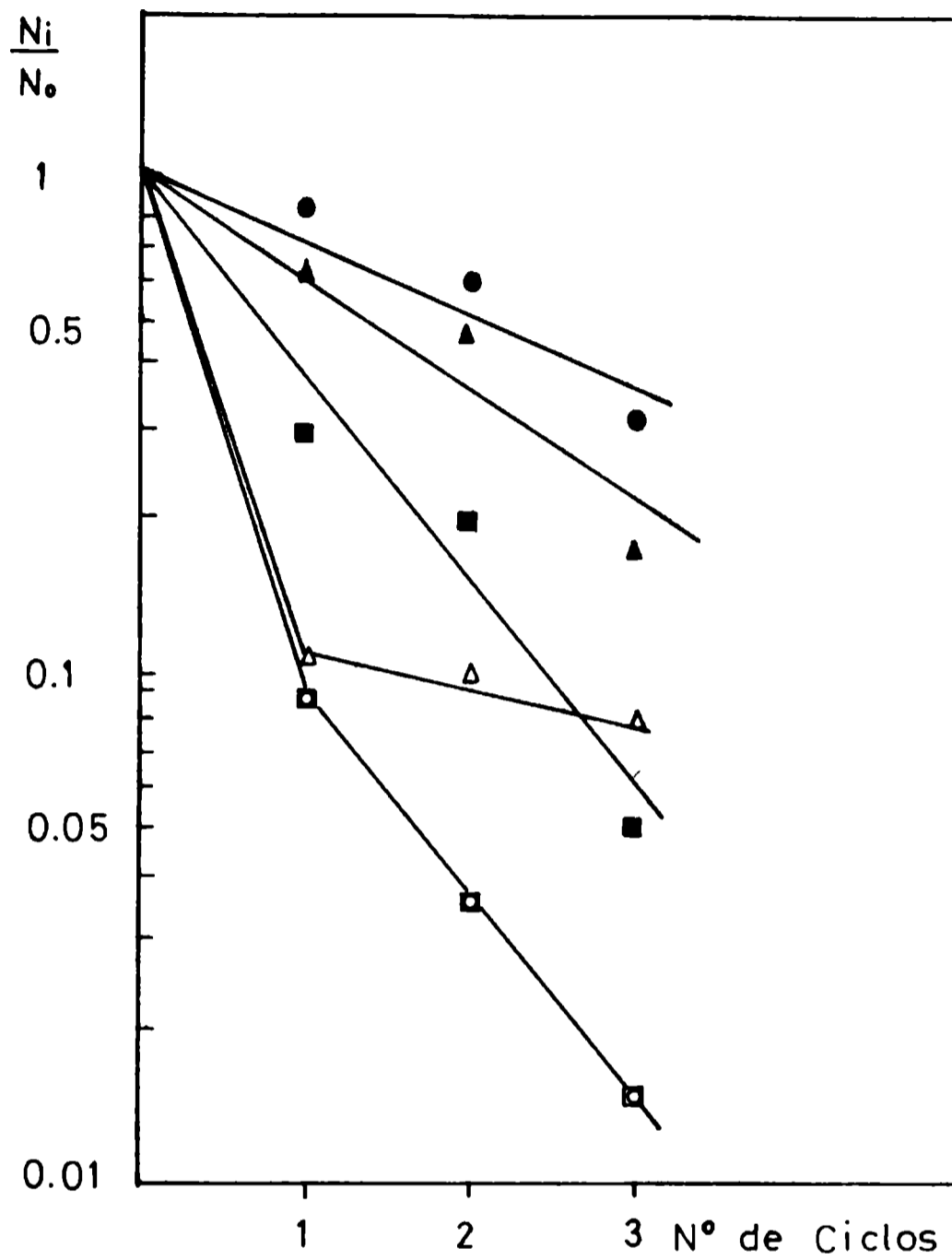


Figura 45: Fracción de células viables luego de la congelación-descongelación de *Lactobacillus bulgaricus* LBR.

Crioprotector	Medio de crecimiento	
	1.1.1.	1.1.1. + Ca
Agua	□	■
Glicerol 1 M	○	●
LPR 6%	△	▲

Tabla 17: Acidez producida en leche por *Lactobacillus bulgaricus* LBR después de dos ciclos de congelación-descongelación.

Crioprotector	$\Delta pH_2 / \Delta pH_0$	
	Medio de crecimiento	
	1.1.1.	Caldo 1.1.1. con Ca
Agua	NA	0,3
Glicerol 1 M	NA	0,8
Leche 6%	NA	0,6

ΔpH = pH medio - pH después de la incubación (4 hs).

ΔpH_0 = ΔpH producido por LBR sin congelar

ΔpH_2 = ΔpH producido por LBR después de dos ciclos de congelación-descongelación

NA = No acidificó en el tiempo de evaluación.

el medio de crecimiento, la cepa evaluada y el crioprotector usado. Cuando ambas cepas se desarrollan en 1.1.1. con calcio y se congelan en agua o glicerol resultan más resistentes a este proceso que las células provenientes de 1.1.1.. Sin embargo, cuando el crioprotector es leche, las dos cepas presentan respuestas diferentes al ser desarrolladas en presencia de calcio previo a su congelación. En esta condición de crecimiento *L. bulgaricus* LBR muestra una resistencia mayor a la congelación-descongelación. En cambio los cultivos de *L. bulgaricus* LBB en iguales condiciones (1.1.1. con calcio) son más sensibles a la congelación-descongelación. Este efecto se acentúa con el número de ciclos.

Por lo tanto podemos concluir que la elección de una condición de congelación depende de la cepa, del crioprotector, de la presencia de calcio en el medio y de la combinación de estas variables.

5.7. Discusión

De los resultados presentados surge que la congelación es un método muy eficaz para conservar microorganismos. La congelación en nitrógeno líquido (-196°C) ha sido considerada como una de las condiciones óptimas para mantener bacterias viables, sin embargo optimizando algunas variables como composición del medio de crecimiento o crioprotector usado se pueden obtener buenos resultados congelando a temperaturas superiores (-20°C a -80°C).

Lactobacillus bulgaricus es muy sensible a las condiciones de conservación, sin embargo mantiene un buen porcentaje de células viables cuando se congela en freezer a -80°C con leche o trehalosa. Sacarosa también es un buen crioprotector de la capacidad acidificante de esta cepa a tiempos cortos de almacenamiento. En cambio, en períodos prolongados la lactosa es un crioprotector más eficiente.

Por otro lado, la composición del medio de crecimiento es otro parámetro a tener en cuenta para optimizar las condiciones de conservación de fermentos. La composición de iones calcio en el medio de crecimiento juega un rol importante incrementando la resistencia a la congelación de las bacterias, si el crioprotector es agua o glicerol.

Cuando el crioprotector usado es leche, la presencia de calcio en el medio de crecimiento, ejerce un efecto diferente dependiendo de la cepa. *Lactobacillus bulgaricus* LBB crecida en presencia de calcio y congelada en leche es más susceptible al daño durante la congelación-descongelación mientras que *L. bulgaricus* LBR, en estas condiciones es más resistente que las células crecidas sin calcio. Esto nos permite decir que se puede lograr una buena condición de conservación por congelación para cada cepa teniendo en cuenta el medio de crecimiento y el crioprotector.

La fase de crecimiento en la cual se cosechan las bacterias es otra variable a tener en cuenta. En *L. bulgaricus* la cosecha en fase exponencial o estacionaria no modifica la sensibilidad de la bacteria a la congelación-descongelación con glicerol 2 M. En glicerol 1 M las células cosechadas en fase estacionaria son más sensibles a la congelación que las células cosechadas en fase exponencial.

La eficiencia crioprotectora se ha evaluado siguiendo distintos parámetros, como porcentaje de bacterias viables luego de la congelación-descongelación, cinéticas de crecimiento en medio de cultivo, acidificación de leche o medio a un tiempo fijo y test de actividad. De cada uno de estos parámetros se obtiene una información diferente y complementaria. Por ejemplo, el recuento informa el número de bacterias que permanecen viables, las cinéticas de crecimiento dan indicio de la capacidad de recuperación que tiene un cultivo sometido a congelación-descongelación, la acidez a un tiempo fijo nos indica cómo se mantuvo metabólicamente la bacteria. Este dato está relacionado con el número de células viables. Podría ocurrir que

el número de bacterias descienda durante la congelación-descongelación pero esas células mantengan su capacidad acidificante, por lo tanto la disminución en el valor de ΔpH es debido a la disminución de la concentración de células viables. Podría darse el caso inverso, que las células pierdan su capacidad acidificante pero que no disminuya el número de células viables. Otro método de evaluación que tiene en cuenta la acidez producida a un tiempo fijo por cultivos sembrados con distintos porcentajes de un mismo inóculo son los tests de actividad. En los mismos se grafica el ΔpH en función del porcentaje de inóculo en escala logarítmica dando una recta como se observó en las Figura 40. Si el número de bacterias antes y después de la congelación-descongelación es el mismo, los resultados del test de actividad graficados en función del porcentaje de inóculo son comparables, ya que la acidez producida da un indicio de la actividad metabólica bacteriana, por lo tanto, si esta actividad está dañada se obtendrán rectas paralelas tales como las de la Figura 40. Sin embargo, si el número de bacterias varía es más apropiado graficar el ΔpH en función de la concentración de bacterias viables (UFC/ml). De esta manera con el test de actividad evaluamos si la condición de conservación mantiene la capacidad acidificante de un cultivo.

De todos los resultados podemos concluir que la conservación de *L. bulgaricus* a -80°C es conveniente si optimizamos el crioprotector usado y las condiciones de crecimiento para cada cepa.

Para evaluar la eficiencia crioprotectora los parámetros más importantes serían el número de bacterias viables y el ΔpH a un tiempo fijo. Para la aplicación a procesos fermentativos industriales, el segundo parámetro se transforma en el más importante, dado que la capacidad acidificante de un cultivo, permite optimizar los tiempos de coagulación a partir de fermentos congelados.


CONCLUSIONES

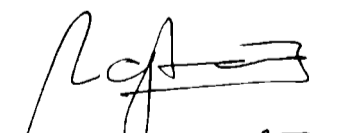
CONCLUSIONES

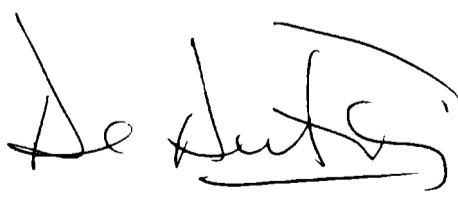
Los resultados expuestos en este trabajo permiten extraer las siguientes conclusiones:

- * Las tres cepas aisladas, *L. bulgaricus* LBA, LBB y LBR, muestran diferencias en su capacidad de fermentación de azúcares, acidificación de la leche, actividad proteolítica y en su respuesta a las condiciones de conservación por congelación.
- * La actividad proteolítica específica de *L. bulgaricus* LBA y LBB crecidas en leche es mayor que la actividad específica de células crecidas en caldo 1.1.1. *L. bulgaricus* LBR presenta la misma actividad en los dos medios de crecimiento.
- * El método de obtención de las células libres de leche mediante la disolución del coágulo con Na_2EDTA alcalino no afecta el ensayo enzimático y los resultados obtenidos con distintos cultivos son reproducibles.
- * La actividad proteolítica de *L. bulgaricus* LBB está afectada por la concentración de nitrógeno soluble y la temperatura a la cual se desarrolla el cultivo.
- * Las células crecidas en caldo 1.1.1. presentan un nivel basal de proteasas que se incrementa cuando la bacteria se repica en leche y se incuba a 37°C. Este incremento no se observa cuando las células crecen a 42°C.

- * La influencia de la concentración de nitrógeno TCA soluble de la leche sobre la actividad proteolítica de *L. bulgaricus* LBB depende de la temperatura de crecimiento. A 37°C la actividad específica disminuye con el incremento de nitrógeno soluble. A 42°C esta actividad es baja y constante para todas las concentraciones de aminoácidos solubles ensayadas.
- * *Lactobacillus bulgaricus* LBB desarrollado en leche con bajo nivel de aminoácidos presenta una actividad proteolítica específica alta a temperaturas de crecimiento entre 34 y 48°C que desciende 4-5 veces a temperaturas superiores.
- * Cultivos en leche con alto nivel de aminoácidos muestran la misma actividad específica para un rango de temperatura entre 32 y 48°C.
- * La congelación a -80°C resulta un método de conservación adecuado para estas bacterias. Leche, lactosa, sacarosa y trehalosa ejercen una crioprotección eficiente sobre las cepas de *L. bulgaricus* ensayadas.
- * El crecimiento en presencia de calcio antes de la congelación afecta la susceptibilidad de *L. bulgaricus* a la conservación dependiendo de la cepa y del crioprotector utilizado.


ANALÍA G. ABRAHAM


DR. M.C. ANÓN


G. De Antoni

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-bar, N.; Harris, N. and Riel, R. (1987) Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Food Sci.* 52:411-415.
- Allison, C. and Mac Farlane, G. (1990) Regulation of protease production in *Clostridium sporogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:3485-3490.
- Anchordoguy, T.; Rudolph, A.; Carpenter, J. and Crowe, J.H. (1987). Modes of interaction of cryoprotectant with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 24:324-331.
- Argyle, P.; Mathison, G. and Chandan, R.C. (1976). Production of cell bound proteinase by *Lactobacillus bulgaricus* and its location in the bacterial cell. *J. Appl. Bacteriol.* 41:175-184.
- Atlan, D., Laloi, P. and Portalier, R. (1989) Isolation and characterization of aminopeptidase deficient *Lactobacillus bulgaricus* mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1717-1723.
- Auclair, J. and Accolas, J.P. (1983) Use of thermophilic lactic starters in the dairy industry. *Antonie van Leeuwenhoek* 49:313-326.
- Barbour, E. and Priest, F.G. (1986) The preservation of lactobacilli: A comparison of three methods. *Lett. Appl. Microbiol.* 2:69-71.
- Bergey's Manual (1986). Bergey's manual of Systematic Bacteriology 9th edition. Editado por Sneath y col. Williams and Wilkins Co. Baltimore USA.
- Bouillanne, C. and Desmazeaud, M.J. (1981) Classement de souches de *Lactobacillus bulgaricus* selon quelques caracteres utilises en fabrication du yoghourt. Association avec *Streptococcus thermophilus*. *Science des Aliments* 1:7-17.
- Castberg, H.B. and Morris, H.A. (1976) Degradation of milk proteins by enzymes from lactic acid bacteria used in cheese making. A review. *Milchwissenschaft* 31:85-90.
- Cerning, J; Bouillanne, C.; Desmazeaud, M.J. and Landon, M. (1986). Isolation and characterization of exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *Biotechnol. Lett.* 8:625-628.
- Citti, J.; Sandine, W. and Elliker, P. (1963) Some observations on the Hull method for measurement of proteolysis. *J. Dairy Sci.* 46:337.

Código Alimentario Argentino (1986) Editado por De la Canal y Asociados, Buenos Aires.

Coutinho, C.; Bernardes, E.; Felix, D. and Panek, A. (1988) Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast strains. *J. Biotechnol.* 7:23-32.

Crowe, L.; Mouradian, R.; Crowe, J.H.; Jackson, S.A. and Womersley, C. (1984) Effects of carbohydrates on membrane stability at low water activities. *Biochem. Biophys. Acta* 769:141-150.

Chandan, R.; Argyle, P. and Mathison, G. (1982) Action of *Lactobacillus bulgaricus* proteinase preparation on milk proteins. *J. Dairy Sci.* 46:1408-1413.

Cheftel, J.C. and Cheftel, H. (1976) Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Volumen I. Editorial Acribia, Zaragoza, España.

De Antoni, G.; Pérez, P.; Abraham, A. and Añón, M.C. (1989) Trehalose: a crioprotectant for *Lactobacillus bulgaricus*. *Cryobiology* 26:149-153.

Driessen A.J.M. (1989) Secondary transport of aminoacids by membrane vesicles derived from lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 56:139-160.

Eggiman, B. and Bachmann, M. (1980) Purification and partial characterization of an aminopeptidase from *Lactobacillus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 10: 876-882.

El Soda, M.; Bergere, J. and Desmazeaud, J.M. (1978a) Detection and localization of peptide-hydrolases in *L. casei*. *J. Dairy Res.* 45:519-524.

El Soda, M.; Desmazeaud, J.M. and Bergere, J. (1978b) Peptide hydrolases of *Lactobacillus casei*: isolation and general properties of various peptidases activities. *J. Dairy Res.* 45:445-455.

El Soda, M. and Desmazeaud, J.M. (1982) Les peptides hidrolases des lactobacilles du groupe Thermobacterium. I. Mise en evidence de ces activites chez *Lactobacillus helveticus*, *L. acidophilus*, *L. lactis* et *L. bulgaricus*. *Can. J. Microbiol.* 28:1181-1188.

Exterkate, F.A. (1975) An introductory study of the proteolytic system of *Streptococcus cremoris* HP. *Neth. Milk Dairy J.* 29:303-318.

Exterkate, F.A. (1976a) The proteolytic system of a slow variant of *Streptococcus cremoris* HP. *Neth. Milk Dairy J.* 30:3-8.

Exterkate, F.A. (1976b) Comparison of strains of *Streptococcus cremoris* for proteolytic activities associated with the cell wall. *Neth. milk Dairy J.* 30:95-105.

Exterkate, F.A. (1979a) Accumulation of Proteinase in the cell wall of *Streptococcus cremoris* AM1 and regulation of its production. *Arch. Microbiol.* 120:247-254.

Exterkate, F.A. (1979b) Effect of membrane perturbing treatments on the membrane bound peptidases of *Streptococcus cremoris* HP. *J. Dairy Res.* 46: 473-484.

Exterkate, F.A. (1984) Location of peptidases outside and inside the membrane of *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:177-183.

Exterkate, F.A. (1985) A dual-directed control of cell wall proteinases production in *S. cremoris* AM1: a possible mechanism of regulation during growth in milk. *J. Dairy Sci.* 68: 562-571.

Exterkate, F.A. and de Veer, G. (1985) Partial isolation and degradation of caseins by cell wall proteinases of *Streptococcus cremoris* HP. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:328-338.

Ezzat, N.; El Soda, M.; Desmazeaud, M.J. and Ismail, A. (1982) Peptide hidrolases for the thermobacterium group of lactobacilli. II. Physiological factors and enzyme production. *Milchwissenschaft* 37:666-668.

Ezzat, N.; El Soda, M.; Bouillanne, C.; Zevaco, C. and Blanchard, P. (1985) Cell wall associated proteinases in *Lactobacillus helveticus*, *L. bulgaricus* and *L. lactis*. *Milchwissenschaft* 40:140-143.

Ezzat, N.; El Soda, M.; Desmazeaud, M.J. and Ismail, A. (1986) Peptides hidrolases from the thermobacterium group of lactobacilli. III Characterization of the intracellular exopeptidases. *Le lait* 66:445-451.

Fox, P.F. (1989) Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *J. Dairy Sci.* 72:1379-1400.

Frankena, J.; Van Verseveld, H. and Stouthamer, A. (1989) A continuous culture study of the bioenergetic aspect of growth and production of exocellular protease in *Bacillus licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22:161-176.

Frey, J.P.; Marth, E.H.; Johnson, M. and Olson, N. (1986) Peptidases and proteases of lactobacilli associated with cheese. *Milchwissenschaft* 41:622-624.

Fujikawa, S. (1980) Freeze fracture and etching studies on membrane damage on human erythrocytes caused by formation of intracellular ice. *Cryobiology* 17:351-362.

Garvie, E. (1984) Taxonomy and identification of bacteria important in cheese and fermented dairy products. En Ad. Microbiol. Biochem. Cheese fermented milks. Davies and Law. Elsevier Applied Science Publisher. London.

Gazeau, C. and Dereuddre, J. (1986) Effects des substances cryoprotectrices au niveau cellulaire. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 133. Actual bot. 3:41-64.

Gilliland, S.E. and Rich, C.N. (1990) Stability during frozen and subsequent refrigerated storage of *L. acidophilus* grown at different pH. *J. Dairy Sci.* 73:1187-1192.

Giori, G.S; Valdez, G.F.; Ruiz Holgado, A.P. and Oliver, G. (1983) Microflora of Tafi cheese. Changes during manufacture and maturation. *J. Food Prot.* 46:518-521.

Giori, G.S; Valdez, G.F.; Ruiz Holgado, A.P. and Oliver, G. (1985) Effect of pH and temperature on the proteolytic activity of lactic acid bacteria *J. Dairy Sci.* 68:2160-2164.

Glenn, A.R. (1976) Production of extracellular proteins by bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 30:41-62.

Griffiths, M.W. and Phillips, J. (1984) Effect of aeration on extracellular enzyme synthesis by psychrotrophs growing in milk during refrigerated storage. *J. Food Protection* 47:697-702.

Hanlon, G. W.; Hodges, N.A. and Russell, A.D. (1982) The influence of glucose, ammonium and magnesium availability on the production of protease and bacitracin by *Bacillus liqueniformis*. *J. Gen. Microbiol.* 128:845-851.

Heckly, R.J. (1978) Preservation of microorganisms. En Advances in Applied Microbiology, W.W. Umbreit, Eds., vol. 24 Academic Press, San Diego.

Hemme, O.; Schmal, V. and Auclair, J.B. (1981) Effect of the addition of extract of thermophilic lactobacilli on acid production by *Streptococcus thermophilus* in milk. *J. Dairy Research* 48: 139-148.

- Hickey, M.; Hillier A. and Jago, G.G. (1983) Peptidase activity in lactobacilli. *Aust. J. Dairy Technol.* 38:118-123.
- Higashio, K.; Yoshioka, Y. and Kikuchi, T. (1977a) Isolation and identification of a growth factor of *Streptococcus thermophilus* produced by *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Agricul. Chem. Soc. Japan* 51:203-208.
- Higashio, K.; Yoshioka, Y. and Kikuchi, T. (1977b) Isolation and identification of a growth factor of *Lactobacillus bulgaricus* produced by *Streptococcus thermophilus*. *J. Agricul. Chem. Soc. Japan* 51:209-215.
- Hull, M.E. (1947) Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the protein in milk. *J. Dairy Sci.* 46:881-887.
- Jenness, R. (1988) Composition of milk. En: "Fundamentals of Dairy Chemistry", 3rd. Edition, editado por N. Wong y col. Van Nostrand Rienhold, New York.
- Juffs, H. (1973a) Proteolysis detection in milk. I. Interpretation of tyrosine value data for raw milk supplies in relation to natural variation, bacterial counts and another factors. *J. Dairy Res.* 40:371-382.
- Juffs, H. (1973b) Proteolysis detection in milk. II. The effect of preincubation of raw and laboratory pasteurized bulk milk samples on tyrosine value and its relationship with bacterial populations. *J. Dairy Res.* 40:383-392
- Kamaly, K.M. and Marth, E.H. (1989) Enzyme activities of lactic streptococci and their role in maturation of cheese. A review *J. Dairy Sci.* 78: 1945-1966.
- Kanasaki, M.; Breheny, S.; Hillier, A. and Jago, G. (1975) Effect of temperature on the growth and acid production of lactic acid bacteria. 1. A rapid method for the estimation of bacterial populations in milk. *Austral. J. Dairy Technol.* 30: 142.
- Kandler, O. (1983) Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49:209-224.
- Kaneko, T.; Susuki, H. and Takahashi, T. (1987) Influences of cellular components and redox potential of liquid concentrate cultures of *Lactobacillus bulgaricus* on acid producing activity and viability. *J. Dairy Sci.* 70:1128-1133.
- Khalid, N. and Marth, E. (1990) Lactobacilli. Their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese. A review. *J. Dairy Sci.* 73:2669-2684.

Khalid, N., El Soda, M. and Marth, E. (1991) Peptide hydrolases of *L. helveticus* and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *J. Dairy Sci.* 74:29-45.

Laan, H. and Konning, W. (1989) Mechanism of proteinase release from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Wg2. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3101-3106.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Laloi, P.; Atlan, D.; Blanc, B.; Gilbert, C. and Portalier, R. (1991) Cell wall-associated proteinase of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CNRZ397: differential extraction, purification and properties of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 196-204.

Larsen, R.; Pérez, P.; Abraham, A.; De Antoni, G.L. and Añón, M.C. (1986). Informe Técnico.

Law, B. and Kolstad, J. (1983) Proteolytic system in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* 49:225-245.

Lee, S., Vedamuthu, E.; Washam, C. and Reinhold, G. (1974) An agar medium for the differential enumeration of yogurt starter bacteria. *J. Milk Food Technol.* 37:272-276.

Lin, W.; Savaiano, D. and Harlander, S. (1989) A method for determining galactosidase activity of yogurt cultures in skim milk. *J. Dairy Sci.* 72:351-359.

Man, J.C.; Rogosa, M. and Sharpe, M. (1960) A medium for cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 23:130-135.

Marshall, V.M. (1987) Fermented milks and their future trends. I. Microbiological aspects. (review). *J. Dairy Res.* 54:559-574.

Marshall, V. and Law, B. (1984) The physiology and growth of Dairy lactic acid bacteria. En: Ad. Microbiol. Biochem cheese fermented milks. Davies and Law. Elsevier Appl. Sci. Publisher London.

Mazur, P. (1966) Physical and chemical basis of injury in single celled microorganism subjected to freezing and thawing. En Cryobiology ed. por Merriman Academic Press Inc., London.

Mazur, P. (1970) Cryobiology:the freezing of biological systems. *Science* 168:939-949.

- Merriman, H. (1966) Review of biological freezing. En "Cryobiology", ed. por Merriman, H. Academic Press Inc., London.
- Meyer, J.; Howald, D.; Jordi, R. and First, M. (1989) Location of proteolytic enzymes in *Lactobacillus lactis* and *Streptococcus thermophilus* and their influence on cheese ripening. *Milchwissenschaft* 44:678-681.
- Mills, O.E. and Thomas, T.D. (1978) Release of cell wall proteinases from lactic streptococci. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 13:209-215.
- Mills, O.E. and Thomas, T.D. (1981) Nitrogen sources for growth of lactic streptococci in milk. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 16:42-55.
- Moravcova, J. and Chaloupka, J. (1984) Repression of the synthesis of exocellular and intracellular proteinases in *Bacillus megaterium*. *Folia Microbiol.* 29:273-281.
- Muriana, P. and Klaenhammer, T. (1987) Conjugal transfer of plasmid encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *L. acidophilus*. *Appl. Environm. Microbiol.* 53: 553-560.
- Musset, G; Monnet, V. and Gripon, J.C. (1989) Intracellular proteinases of *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* NCDO 763. *J. Dairy Res.* 56:765-778.
- Neviani, E.; Muchetti, G.; Giraffa, G. and Carini, S. (1984) Attività caseinolitica alla parete di *Lactobacillus casei*. *Scienza e Tecnica Lattiero-casearia* 35:430-450.
- Pérez, P.; De Antoni, G. and Añón, M.C. (1990) An enzymatic method for formate production by *Streptococcus thermophilus*. *J. Dairy Sci.* 73:2697-2701.
- Pérez, P.; De Antoni, G. and Añón, M.C. (1991) Formate production by *Streptococcus thermophilus* cultures. *J. Dairy Sci.* 74:2850-2855.
- Pérez, P. (1991) *Streptococcus thermophilus*: metabolismo y conservación. Tesis Doctoral.
- Pimentel Gómez, F. (1978) Curso de Estadística Experimental. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina.
- Porubcan, R. and Sellars, R.L. (1979) Lactic starters cultures concentrates. En "Microbial Technology", 2nd edition vol 1. Academic Press.

Rajagopal, S. and Sandine, W. (1990) Associative growth and proteolysis of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in skim milk. *J. Dairy Sci.* 73:894-899.

Rasic, J. and Kurman, J. (1978) Yoghurt, scientific grounds, technology, manufacture and preparation. Tech. Dairy Pub. House Copenhagen. Denmark.

Rhee, S.K. and Pack, M.Y. (1980) Effect of environmental pH on fermentation balances of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.* 144:217-221.

Rudolph, A. and Crowe, J.H. (1985) Membrane stability during freezing. The role of two natural cryoprotectant, trehalose and proline. *Cryobiology* 22:367-377.

Sharp, R.J. (1984) The preservation of genetically unstable microorganism and the cryopreservation of fermentation seed cultures. En "Advances in Biotechnological Processes", vol 3. A.R. Liss. New York.

Singh, J.; Kuila, R.K. and Ranganathan, B. (1978) Study on casein degradation by gamma radiation induced mutant of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Food Sci.* 43:278.

Slocum, S.A.; Jasinski, E.M.; Ananthasvaran, R.C. and Kilara, A. (1988a) Effect of sucrosa on proteolysis in yogurt during incubation and storage. *J. Dairy Sci.* 71:589-595.

Slocum, S.A.; Jasinski, E.M. and Kilara, A. (1988b) Processing variables affecting proteolysis in yogurt during incubation. *J. Dairy Sci.* 71:596-603.

Smith, A. (1961) Effect of freezing and thawing on microorganisms. En Biological effects of freezing and supercooling. Edward Arnold Publ. Ltd., London.

Smittle, R.; Gilliland, S. and Speck, M. (1972) Death of *Lactobacillus bulgaricus* resulting from liquid nitrogen freezing. *Appl. Microbiol.* 24:551-554.

Smittle, R.; Gilliland, S.; Speck, M. and Walter, W. Jr (1974) Relationship of cellular fatty acid composition to survival of *Lactobacillus bulgaricus* in liquid nitrogen. *Appl. Microbiol.* 27:738-743.

Steponkus, P.L.; Wolfe, J. and Dowgert, M.F. (1981) Stresses induced by contraction and expansion during a freeze-thaw cycle: A membrane perspective. En: "Effect of low temperature on biological membranes", Editado por G.J. Morris & A. Clarke. Academic Press, London.

Strasser de Saad, G.; Nadra, M.M. and Ruiz Holgado, A.P. (1987) Effect of cultivation conditions on proteinase production by *Lactobacillus murinus*. *Folia Microbiol.* 32:85-88.

Susuki, I.; Kitada, T.; Kato, S.; Yano, N. and Morichi, T. (1986a) Growth of *Lactobacillus bulgaricus* in milk. 1. Cell elongation and role of formic acid in pasteurized milk. *J. Dairy Sci.* 69:311-320.

Susuki, I.; Kitada, T.; Kato, S.; Yano, N. and Morichi, T. (1986b) Growth of *Lactobacillus bulgaricus* in milk. 2. Characteristic of purine nucleotides, pyrimidine nucleotides and nucleic acid synthesis. *J. Dairy Sci.* 69:971-978.

Swaisgood, H.;(1985) Characteristic of edible fluids of animal origin. Milk. En: Food Chemistry, 2nd edition. Editado por Owen Fennema. Marcel Dekker, Inc., New York.

Tamime, A.Y. and Deeth, H.C. (1980) Yogurt: technology and biochemistry. *J. Food Protection* 43:939-977.

Tamime, A.Y. and Robinson, R.K. (1985). Yogurt Science and Technology. Pergamon Press Ltd., Oxford, England.

Thomas, T.D.; Jarvis, B. and Skipper, N. (1984) Localization of proteinase near the cell surface of *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 118:329-333.

Thomas, T.D. and Mills, O.E. (1981) Proteolytic enzymes of starter bacteria. *Neth. Milk Dairy J.* 35:255-273.

Tiburzi, M.; Tessi, M.; Sabbatini de Comini, L.; Giménez de Terenzani, S.; Gerard, R. and Moguilewski, M. (1985) Starters para yogur. I. Características acidificantes, proteolíticas y contenido bacteriano. *La Alimentación Latinoamericana* 153:67-75.

van Boven, A. and Konings, (1986) The uptake of peptides by microorganism. *Neth. Milk Dairy J.* 40:117-127.

Valdez, G.F.; de Giori, G.S.; de Ruiz Holgado, A.P. and Oliver, G. (1983) Protective effect of adonitol on lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:302-304.

Valdez, G.F.; de Giori, G.S.; de Ruiz Holgado, A.P. and Oliver, G. (1986) Composition of the recovery medium and its influence on the survival of freeze dried lactic acid bacteria. *Milchwissenschaft.* 41:286-288.

Vignolo, M.G.; Ruiz Holgado, A.P. and Oliver, G. (1988) Acid production and proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry sausages. *J. Food Prot.* 51:481-484.

Visser, S.; Exterkate, F.; Slangen, C. and de Veer, G. (1986) Comparative study of action of cell wall proteinase from various strains of *Streptococcus cremoris* on bovine β -caseins. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:1162-1166.

Visser, S.; Slangen, C.; Exterkate, F. and de Veer, G. (1988) Action of a cell wall proteinase (P_1) from *Streptococcus cremoris* HP on bovine β -caseins. *Appl. Environ. Microbiol.* 29:61-66.

Walstra, P. (1990) On the stability of casein micelles. *J. Dairy Sci.* 73: 1965-1979.

Weiss, N.; Schilinger, U. and Kandler, O. (1983) *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus leichmannii* and *Lactobacillus bulgaricus* subjective synonyms of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* conv. nov. and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* conv. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 4:552-557.

Whitney, R.M.L. (1988) Proteins of milk. En: "Fundamentals of Dairy Chemistry", 3rd. Edition, editado por N. Wong y col. Van Nostrand Reinhold, New York.

Wilkins, D.; Schmidt, R.; Shireman, R.; Smith, K. and Jezeski, J. (1986) Evaluating acetaldehyde synthesis from L-(^{14}C (U))threonine by *S. thermophilus* and *L. bulgaricus*. *J. Dairy Sci.* 69:1219-1224.

Williams, W.; Broquist, H. and Snell, E. (1947) Oleic acids and related compounds as growth factors for lactic acid bacteria. *J. Biological Chem.* 170:619-630.

Wright, C.T. and Klaenhammer, T.R. (1981) Calcium induced alteration of cellular morphology affecting the resistance of *Lactobacillus acidophilus* to freezing. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:807-815.

Wright, C.T. and Klaenhammer, T.R. (1983a) Survival of *Lactobacillus bulgaricus* during freezing and freeze drying after growth in the presence of calcium. *J. Food Sci.* 48:770-777.

Wright, C.T. and Klaenhammer, T.R. (1983b) Influence of calcium and manganese on dechaining of *Lactobacillus bulgaricus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:785-792.