

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS:

METABOLISMO Y CONSERVACION DE CEPAS

PABLO FERNANDO PEREZ

TESIS

1991

El presente trabajo para optar al título de Doctor en Bioquímica fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de las doctoras G. L. De Antoni y M. Cristina Añón.

AGRADECIMIENTOS

A las doctoras M. Cristina Añón y Graciela L. De Antoni por haberme dirigido a lo largo de estos años y por su apoyo constante, tanto en lo científico como en lo personal.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por haberme otorgado las becas que me permitieron la realización de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por la formación recibida.

A las autoridades y personal del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA) por las cepas ATCC 19258 y CRL 410, por facilitarme el acceso a material bibliográfico y por su hospitalidad durante mi estadía en S. M. de Tucumán.

A los Ingenieros Néstor Serena y José Luis Alonso por el valioso aporte realizado con la construcción y reparación de los equipos electrónicos utilizados.

A la Dra. Alicia Chaves por el asesoramiento estadístico.

Al Dr. Rodolfo Mascheroni y la Srta. Cecilia Mazzuca por el asesoramiento en aspectos informáticos.

A la Sra. Lucía Brandi por su apoyo técnico.

Al Sr. Arturo Colavita por su dedicación en la toma de las fotografías.

A la Bioqca. Analía G. Abraham por su colaboración en la discusión de los resultados experimentales.

Al Dr. Aníbal Disalvo por la lectura crítica de los manuscritos enviados para publicar.

A mis compañeros del CIDCA y de la Cátedra de Microbiología I de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP que de una u otra manera hicieron posible este trabajo.

A mis familiares y amigos que me alentaron durante estos años.

A Cecilia.

A mis padres.

A Federico y Rodolfo.

A Tía Blanca.

"El mayor desarreglo del espíritu consiste en creer que las cosas son como uno quiere que sean"

Louis Pasteur

INDICE

página

INTRODUCCION

Los productos lácteos fermentados.....	1
El yogurt.....	2
Las bacterias del yogurt.....	3
Interacción entre las bacterias del yogurt.....	7
Composición y características nutricionales.....	10
Efectos benéficos del yogurt.....	13

OBJETIVOS.....	15
----------------	----

CAPITULO I: Materiales y métodos

Cepas.....	16
Medio de Lee.....	17
Medio 1.1.1.....	17
Medio base.....	18
Medio API 50 CHL.....	18
Medio 1.1.1. β	19
Leche 12 %.....	19
Leche entera.....	19
Leche entera suplementada.....	19
Aislamiento de <i>S. thermophilus</i>	20
Caracterización de cepas.....	20
Recuento de bacterias viables.....	22
Curvas de crecimiento.....	22
Ensayos de conservación de cepas.....	22
Test de actividad.....	23
Ensayos de acidificación.....	23
Ciclos de congelación-descongelación.....	24
Determinación de ácido fórmico.....	24
Determinación de ácido láctico.....	27

Determinación de azúcares.....	28
Análisis estadístico.....	28

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO II: Aislamiento y caracterización de cepas.

Aislamiento y caracterización de cepas.....	30
Perfil bioquímico.....	33
Consumo de lactosa.....	35
Desarrollo en diferentes medios de cultivo.....	38
Conclusión.....	41

CAPITULO III: Aspectos metabólicos de interés.

Consideraciones generales.....	42
Determinación de formiato.....	45
Determinación de ácido láctico.....	58
Producción de formiato y lactato en diferentes cepas de <i>S. thermophilus</i>	60
Efecto del medio de cultivo y la temperatura sobre la producción de formiato y lactato.....	65
Rendimientos y cinéticas de producción de formiato y lactato.....	71
Influencia de la naturaleza y concentración de azúcares sobre la producción de formiato y lactato...	77
Conclusión.....	81

CAPITULO IV: Conservación de cepas.

Consideraciones generales.....	82
Congelación-descongelación: elección de la fase de crecimiento.....	91
Efecto crioprotector de disacáridos: almacenamiento y ciclos de congelación-descongelación.....	93
Conclusión.....	106

CONCLUSIONES GENERALES.....107

BIBLIOGRAFIA.....111

INTRODUCCION

Los productos lácteos fermentados.

La leche es uno de los alimentos más completos para los mamíferos y es necesaria en toda dieta equilibrada. El hombre, en sus primeros años de vida, consume leche de su propia especie y posteriormente la de otros mamíferos como vacas, cabras, ovejas, etc. Debido a sus cualidades nutritivas y a su alto contenido de agua, es un fluido de muy difícil conservación, ya que constituye un excelente medio de cultivo para la mayoría de los microorganismos. Esta particularidad dio lugar al desarrollo de diferentes métodos para mejorar la conservabilidad, tales como la pasteurización, la concentración, el secado y la refrigeración. Sin embargo, mucho antes del advenimiento de estos procesos, la observación de algunos hechos de la vida diaria, sentó las bases de una industria de singular importancia: la de los productos lácteos fermentados.

En algunas ocasiones, la leche sufría alteraciones que le impartían características organolépticas agradables y es así como surgió una gran variedad de quesos y leches fermentadas con características propias en diversas regiones del planeta. El hombre advirtió que esos productos podían ser conservados por más tiempo que el fluido que les dio origen, y aprendió a prepararlos deliberadamente mediante el agregado de restos de leche ácida, trozos de vegetales, etc.

Las causas de los cambios que daban lugar a los diversos productos lácteos permanecieron poco conocidas hasta el siglo XIX, cuando se descubrió que las fermentaciones eran debidas a seres vivos microscópicos. En este punto no pueden dejar de mencionarse los trabajos de Louis Pasteur (1822-1895) que a través de cui-

dadas observaciones concluyó que cada proceso fermentativo estaba asociado al crecimiento de un determinado microorganismo y realizó grandes aportes al conocimiento de las fermentaciones alcohólica, láctica y butírica (Vallery-Radot, 1945; Kosikowski, 1982; Dubos, 1985).

Con el avance de las técnicas microbiológicas pudo establecerse que son numerosos los géneros de microorganismos (bacterias y hongos) involucrados en la manufactura de productos lácteos. Entre las bacterias pueden mencionarse los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium*, etc y entre los hongos los géneros *Sacharomyces*, *Mucor*, *Penicillium*, etc (Garvie, 1984; Marshall, 1987).

En la actualidad existen dos tendencias para la fabricación de productos lácteos fermentados: el uso de fermentos naturales constituidos por la flora propia del lugar de producción y, por otro lado, el uso de fermentos definidos obtenidos a través de procesos en los cuales se cultivan los microorganismos deseados, luego se mezclan en las proporciones adecuadas, y se agregan a la leche. En estos últimos fermentos es posible incluir bacterias seleccionadas con aptitudes metabólicas adecuadas para obtener productos con determinadas características (Driessen and De Boer, 1989).

El yogurt.

Según el Código Alimentario Argentino (Art. 576- Resol. 879-5/6/85), yogurt o yoghurt "es el producto obtenido por la acidificación biológica de la leche o de la leche reconstituida

(con crema, entera, parcialmente descremada o descremada), previamente pasteurizada, hervida o esterilizada, por la 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 contribuyan a la determinación de las características del producto terminado..."

Debe aclararse que el término "leche", se refiere a la leche de vaca, aunque pueden utilizarse leches de otros animales siempre que se declare en el envase.

En la elaboración industrial de yogurt, se parte de leche a la cual se le estandariza el contenido de grasa, sólidos totales y se le agregan los aditivos necesarios (azúcar, estabilizantes, etc), luego se homogeiniza y se somete a un tratamiento térmico (generalmente 80° a 90°C durante 30 minutos). Posteriormente se enfría a alrededor de 42°C, se inocula con un fermento compuesto por *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, y se incuba a esta temperatura durante 3 ó 4 horas. Al cabo de este tiempo se produce la coagulación de la leche debido a la acidez producida por las bacterias, que desestabiliza las caseínas. El pH alcanzado es de aproximadamente 4,5 unidades.

Las bacterias del yogurt.

Género Streptococcus: el género Streptococcus (Hardie, 1986) está compuesto por microorganismos esféricos u ovoides, con un diámetro menor que 2 µm. Generalmente, cuando desarrollan en medio líquido se presentan de a pares o en cadenas. En la mayoría de los casos

no son móviles. No forman esporos y son Gram (+).

La mayoría son anaerobios facultativos pero algunos requieren CO₂ para crecer y otros pueden ser anaerobios estrictos. Son quimioorganótrofos y poseen metabolismo fermentativo. Los hidratos de carbono son fermentados con producción de ácido láctico como principal producto final y sin producción de gas. Algunas especies fermentan ácidos orgánicos (málico y cítrico) y aminoácidos (serina y arginina).

Son catalasa negativos y sus requerimientos nutricionales son complejos y variables.

La temperatura óptima de crecimiento es de alrededor de 37°C pero las máximas y mínimas varían de acuerdo a la especie.

Muchas especies viven como comensales o parásitos en el hombre o animales, algunas son altamente patógenas y unas pocas son saprófitas y se encuentran naturalmente en el medio ambiente.

El porcentaje de guanina + citosina de su ADN varía entre el 34 y el 46 % .

Streptococcus thermophilus: se presenta como células esféricas u ovoides de 0,7 a 0,9 µm de diámetro dispuestas en pares o en cadenas.

No ha demostrado poseer antígeno específico de grupo. El hábitat primario es desconocido y se sugiere que es una variante termorresistente de algún otro microorganismo.

Posee dos lactato deshidrogenasas que producen L-lactato, a diferencia de otras bacterias lácticas que con más de una enzima producen DL-lactato.

El pH final que alcanza en caldo con glucosa es de 4,0-4,5, y

también produce ácido a partir de lactosa, sacarosa y manosa. Algunas cepas fermentan débilmente la maltosa.

Cuando crece en medios con lactosa, utiliza sólo la glucosa de este disacárido y la galactosa es liberada al medio o débilmente fermentada. No fermenta arabinosa, dextrina, glicerol, inulina, manitol, ramnosa, salicina, sorbitol, almidón ni xilosa.

En ágar sangre produce α -hemólisis o bien no hemolisa.

Produce NH_3 a partir de arginina. No crece en ágar con 40 % de bilis ó 0,04 % de telurito de potasio. No reduce el tetrazolio.

Crece en caldo con 2,5 % de NaCl pero no con 4 %. No crece a pH 9,6 ni en leche con 0,1 % de azul de metileno. Sobrevive a calentamientos de 60°C durante 30 minutos. La temperatura mínima de crecimiento es de 19° a 21°C y la máxima 52°C. Crece muy bien a 37°C.

No ataca la gelatina ni la caseína. Normalmente desarrolla muy poco en medios con peptona de carne y lo hace bien en medios con hidrolizado de caseína.

La fuente es leche calentada o pasteurizada.

La cepa de referencia es NCDO 573 (ATCC 19258).

S. thermophilus puede ser reconocido por su rápido desarrollo en leche a 45°C. No crece en ágar bilis, lo cual lo diferencia de *S. bovis* y *S. equinus*. Para distinguirlo de *S. lactis* y *S. raffinolactis* puede considerarse el hecho de que *S. thermophilus* no crece a 10°C y los primeros sí.

Se ha propuesto reclasificar a *S. thermophilus* como *S. salivarius* subesp. *thermophilus* (Farrow and Collins, 1984). Esta propuesta está basada en estudios de hibridación de ácidos nucleicos y de perfiles de ácidos grasos de cadena larga.

Género Lactobacillus: Los microorganismos del género *Lactobacillus* se presentan en forma de células largas y delgadas, a veces curvadas pero también pueden ser cocobacilos corineformes. Es común la formación de cadenas. Normalmente no son móviles pero si lo son, es a través de flagelos peritricos.

No forman esporos y son Gram (+).

El metabolismo es fermentativo y al menos la mitad de los productos finales está representada por lactato. Son microaerófilos. Generalmente no reducen NO_3^- ni licuan la gelatina.

Son catalasa negativos.

Sus requerimientos nutricionales son complejos y característicos de cada especie y, a menudo difieren en distintas cepas.

El rango de temperatura de crecimiento es de 15° a 53°C y el óptimo está entre 30° y 40°C . Son acidúricos: su pH óptimo está entre 5,5, y 6,2.

El contenido de guanina + citosina de su ADN está entre 32 y 53% .

***Lactobacillus bulgaricus*:** en la bibliografía más reciente (Kandler and Weiss, 1986; Audet y col, 1989) está clasificado como *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus* debido a sus características feno y genotípicas.

Se presenta como bacilos de 0,5 a 0,8 μm por 2 a 9 μm agrupados en cortas cadenas. Sin embargo, ante condiciones adversas las cadenas se hacen largas y curvadas, y se observan numerosos gránulos metacromáticos que se tiñen de color rojizo con azul de metileno.

Fermenta unos pocos carbohidratos (glucosa, fructosa y lactosa)

produciendo principalmente ácido láctico (forma D).

NOTA: En el presente trabajo se ha adoptado el nombre tradicional para los microorganismos del yogurt: **Streptococcus thermophilus** y **Lactobacillus bulgaricus**.

Interacción entre las bacterias del yogurt.

La relación que se establece en los cultivos mixtos entre **S. thermophilus** y **L. bulgaricus** ha sido comunicada por muchos investigadores. Según Tamime y Robinson (Tamime and Robinson, 1985a), los primeros registros se remontan al año 1931 (Orla-Jensen, 1931). Posteriormente otros investigadores se ocuparon del tema (Bautista y col., 1966; Veringa y col., 1968; Galesloot y col., 1968; Accolas y col., 1971; Shankar and Davies, 1976; Higa-shio y col., 1977 a y b; Accolas y col., 1980; Hemme y col., 1981; Driessen y col., 1982; Radke-Mitchell and Sandine, 1984; Suzuki y col., 1986; Radke-Mitchell and Sandine, 1986; Juillard y col., 1987).

La explicación de las causas de la asociación entre estas bacterias es la siguiente: el lactobacilo, a través de su actividad proteolítica, libera aminoácidos necesarios para el desarrollo del estreptococo que, a su vez, estimula el crecimiento del bacilo debido a la producción de lactato, que disminuye el pH y otros compuestos como el piruvato, el CO₂ y el formiato. Esta asociación, en la cual se verifica un beneficio mutuo pero no imprescindible para ninguno de los dos microorganismos se denomina protooperación (Driessen y col., 1982) aunque en muchos trabajos se la

denomina simbiosis.

Considerando los productos estimulatorios producidos por *S. thermophilus*, se ha visto que el piruvato también estimula a *L. bulgaricus* aunque en menor medida que el formiato, pero una combinación de ambos potencia significativamente la acción estimulatoria. Sin embargo, aunque el piruvato puede ser reemplazado por oxalacetato, fumarato, malato y α -cetoglutarato, no ocurre lo mismo con el formiato (Higashio y col., 1977a).

La acción estimulatoria del ácido fórmico, es un hecho bien establecido y hay evidencias que el carbono del formiato se incorpora a las purinas del lactobacilo y que es indispensable para una adecuada septación durante el desarrollo, ya que en su ausencia o ante bajas concentraciones se forman cadenas muy largas (Suzuki y col., 1986). El *Lactobacillus bulgaricus* no puede producir suficientes cantidades de formiato para la síntesis de bases nitrogenadas debido, probablemente, a que la reacción en la cual se genera está reprimida (Suzuki y col., 1986):



PFL: piruvato-formiato liasa.

Tal vez los resultados obtenidos por Higashio y col. (Higashio y col. 1977a) con respecto a la acción estimulatoria del piruvato, puedan explicarse considerando un desplazamiento de la reacción que antecede hacia la derecha para dar lugar a más cantidad de formiato.

El requerimiento de formiato por parte de *L. bulgaricus* podría

ser el resultado de una pérdida de la capacidad de sintetizarlo en cantidades suficientes, debido a la adaptación al crecimiento junto con bacterias que lo produzcan (Suzuki y col., 1986). Esta explicación "evolutiva" no puede ser confirmada.

Con respecto al CO₂, se ha demostrado que ejerce un efecto estimulador sobre el lactobacilo y que es producido en cantidades suficientes en cultivos de *S. thermophilus* (Driessen y col., 1982).

En la selección de cepas industrialmente útiles de *S. thermophilus* se han tenido en cuenta características tales como la capacidad acidificante, la producción de sustancias espesantes y aromas (Bouillane et Desmazeaud, 1980; Robinson, 1988) pero no se ha considerado la capacidad de producir sustancias estimulantes para el lactobacilo, tales como el formiato.

Existe escasa información acerca de la producción de formiato en cultivos de *S. thermophilus* en leche (Veringa y col., 1968; Galesloot y col., 1968) y sólo se han hallado trabajos realizados con cultivos continuos con limitación de lactosa (Thomas y col., 1984) y, más recientemente en medios a base de suero de leche (Audet y col., 1989, 1990). Tal como lo señalan Juillard y colaboradores (Juillard y col., 1987) resulta necesario un estudio más detallado de este aspecto del metabolismo de *S. thermophilus* en especial en el medio natural para este microorganismo: la leche.

Composición y características nutricionales.(Shahani and Friend, 1983; Tamime and Robinson, 1985b).

La composición del yogurt es cualitativamente similar a la de la leche pero se observan algunas variaciones debidas a la adición de sólidos no grasos y a la acción de los fermentos utilizados.

En la siguiente tabla se pueden observar algunos valores típicos para leche y yogurt:

Tabla 1: Componentes principales de la leche y el yogurt enteros.

componente(unid./100)	leche	yogurt
calorías	67,5	72
proteínas (g)	3,5	3,9
lípidos (g)	4,25	3,4
carbohidratos (g)	4,75	4,9
calcio (mg)	119	145
fósforo (mg)	94	114
sodio (mg)	50	47
potasio (mg)	152	186

A continuación se dan algunos detalles sobre los componentes fundamentales:

a) Hidratos de carbono:

El único azúcar presente en cantidades importantes es la lactosa, cuya concentración en el yogurt es de 4-5 % . Aunque durante la fermentación se consume lactosa, el agregado de leche en polvo descremada para aumentar el contenido de sólidos no

grasos, explica este valor tan similar al de la leche.

A pesar de lo expuesto anteriormente, las personas con problemas en el metabolismo de la lactosa, toleran bien el yogurt debido a que las enzimas bacterianas presentes en el mismo siguen desdoblándola luego de la ingestión y por otro lado, la estructura del coágulo enlentece la difusión hacia las paredes intestinales.

b) Proteínas:

El contenido proteico del yogurt está elevado con respecto al de la leche, debido a la adición de sólidos no grasos.

Es importante mencionar que las proteínas del yogurt son más digeribles que las de la leche (Breslaw and Kleyn, 1973), lo cual podría ser debido a una hidrólisis parcial llevada a cabo por las bacterias de los fermentos y al hecho que el coágulo tiene una estructura laxa que posibilita la acción de las enzimas digestivas. Esto contrasta con lo que ocurre al ingerir leche, que se coagula por acción de la acidez estomacal, dando un coágulo mucho más compacto y difícil de digerir.

c) Lípidos:

El contenido de lípidos varía entre 3,5 % para el yogurt entero y 1,5 % para el parcialmente descremado. Estos contribuyen a la palatabilidad y son fuente de ácidos grasos y de energía.

d) Vitaminas y minerales:

El nivel de iones inorgánicos por unidad de peso es mayor que el de la leche. Además, el calcio provisto por el yogurt se absorbe mejor que el de otros alimentos.

Con respecto a las vitaminas, es mucho más difícil dar valores debido a que las mismas se ven afectadas por los diferentes pasos del proceso industrial, así como también por los requerimientos de las bacterias de los fermentos. En la tabla 2 se dan algunos valores de referencia.

Tabla 2: Contenido de vitaminas de la leche y el yogurt enteros.

vitamina (unid./100g)	leche	yogurt
vitamina A (UI)	148	140
tiamina (B1)(μg)	37	30
riboflavina (B2)(μg)	160	190
piridoxina (B6)(μg)	46	46
cianocobalamina (B12)(μg)	0,39	-
vitamina C (mg)	1,5	-
vitamina D (UI)	1,2	-
vitamina E (UI)	0,13	-
ácido fólico (μg)	0,25	-
ácido nicotínico (μg)	480	-
ácido pantoténico (μg)	371	-
biotina (μg)	3,4	1,2
colina (mg)	12,1	-

Efectos benéficos del yogurt. (Rasic and Kurmann, 1978; Tamime and Robinson, 1985b).

Los efectos benéficos del yogurt han sido estudiados por muchos autores. En 1910 E. Metchnikoff (1845-1916), habiendo observado la longevidad de ciertas tribus búlgaras, propuso una teoría en la cual sostenía que el envejecimiento se debía al pasaje de compuestos nocivos desde el intestino grueso al torrente sanguíneo y que estas sustancias se producían por la acción de las bacterias presentes en el tubo digestivo.

Estas bacterias indeseables serían eliminadas o inhibidas por la acidez del yogurt y por otras sustancias antimicrobianas sintetizadas por las bacterias de los fermentos.

Mucho se ha discutido sobre la teoría de Metchnikoff, pero actualmente se sabe que las bacterias intestinales producen gran cantidad de compuestos fenólicos como el indol y el escatol y que estas sustancias pueden relacionarse con la aparición de tumores en el intestino grueso. Sin embargo, se duda que la acidez del yogurt pueda vencer el efecto neutralizante de los jugos biliares. Por otro lado, se ha demostrado la producción de glicopéptidos con potente acción antitumoral por parte de *L. bulgaricus* (Bogdanov y col, 1962; 1975).

El efecto inhibitorio del yogurt sobre bacterias tales como *K. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus spp*, etc, ha sido demostrado y se ha probado la producción de sustancias del tipo de las bacteriocinas por parte de *L. bulgaricus* (Shahani and Friend, 1983).

Otro aspecto benéfico del yogurt está relacionado con su capa-

cidad de reducir los niveles de colesterol en el suero (Hepner y col, 1979).

Aunque puedan existir controversias acerca de lo anteriormente tratado, el valor nutricional del yogurt justifica su inclusión en toda alimentación equilibrada.

NOTA: Se efectuará una introducción más detallada de cada tema en los capítulos correspondientes.

OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como principales objetivos el aislamiento de cepas de **Streptococcus thermophilus** a partir de productos lácteos, y el estudio de aptitudes metabólicas industrialmente útiles. Consecuentemente con esto se investiga la producción de formiato y lactato por diferentes cepas y en distintas condiciones de cultivo. Asimismo, teniendo en cuenta la notable importancia del mantenimiento de la viabilidad y las características metabólicas de los fermentos, se investiga el efecto crioprotector de lactosa, sacarosa y trehalosa para conservar suspensiones bacterianas a -80°C .

CAPITULO I: MATERIALES Y METODOS.

Materiales y métodos.

Cepas: Se utilizaron siete cepas de *S. thermophilus*. A continuación se detallan algunas de sus características.

CEPA	ORIGEN	OBSERVACIONES
CP1	fermento para yogurt (líquido)	aislada en el CIDCA.
CP2	fermento para yogurt (liofilizado)	aislada en el CIDCA.
CP3	fermento para yogurt (líquido)	aislada en el CIDCA.
CP4	yogurt comercial	aislada en el CIDCA.
CP5	fermento para biogurt(liofilizado)	aislada en el CIDCA.
CRL 410	-	provista por CERELA.
ATCC 19258	-	provista por CERELA.

Medios de cultivo:

Medio de Lee (Lee y col, 1974).

triptona	10	g/l	Difco
extracto de levadura	10	g/l	Difco
lactosa	5	g/l	Mallinckrodt
sacarosa	5	g/l	Mallinckrodt
carbonato de calcio	3	g/l	Mallinckrodt
fosfato ácido de dipotasio	0,5	g/l	Mallinckrodt
púrpura de bromocresol	0,02	g/l	Merck
ágar	18	g/l	Biopur

El pH se ajusta a 7 antes de autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Medio 1.1.1.

triptona	10 g/l	Difco
extracto de levadura	10 g/l	Difco
lactosa	10 g/l	Mallinckrodt

El pH se ajusta a 7 antes de autoclavar a 121°C durante 15 minutos. En caso de ser necesario el medio sólido, se le agrega 1,5% (p/v) de ágar.

Medio base.

triptona	10 g/l	Difco
extracto de levadura	10 g/l	Difco

El pH se ajusta a 7 antes de autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Los azúcares, esterilizados por filtración a través de un filtro de 0,45 µm de diámetro de poro, se agregan luego del autoclavado.

Medio API 50 CHL.

polipeptona	10	g/l
extracto de levadura	5	g/l
tween 80	1	ml/l
fosfato ácido de dipotasio	2	g/l
acetato de sodio. 3 H ₂ O	5	g/l
citrato de diamonio	2	g/l
sulfato de magnesio . 7 H ₂ O	0,20	g/l
sulfato de manganeso. 4 H ₂ O	0,05	g/l
púrpura de bromocresol	0,17	g/l

El pH luego de la esterilización es de 6,9- 7,0. El sistema de identificación API, provee el medio esterilizado.

Medio 1.1.1.β.

triptona	10 g/l	Difco
extracto de levadura	10 g/l	Difco
lactosa	10 g/l	Mallinckrodt
β-glicerofosfato de sodio	19 g/l	Mallinckrodt

El pH se ajusta a 7 y se autoclava a 121°C durante 15 minutos.

Leche 12 %.

Leche en polvo descremada (provista por Unión Gandarense, S.A.C.I.A.) se reconstituye al 12 % (p/v) en agua destilada y se esteriliza por tyndalización a 100 °C.

Leche entera.

Se utilizó leche entera esterilizada por el proceso UAT (Las Tres Niñas, SANCOR Cooperativas Ltda).

Leche entera suplementada.

A la leche entera se le agrega extracto de levadura (Difco) al 10 % (esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos) hasta alcanzar una concentración de 0,1 % (p/v).

Aislamiento de *Streptococcus thermophilus*.

Para el aislamiento de las cepas se utilizó el medio de Lee. Este medio, que contiene sacarosa y lactosa como azúcares fermentables y púrpura de bromocresol como indicador, basa su acción diferencial en que *S. thermophilus* fermenta ambos azúcares y *L. bulgaricus* sólo la lactosa. La acidez generada hace que las colonias del coco sean amarillas (debido al viraje del indicador) y las del bacilo blancas. Asimismo existen diferencias morfológicas entre las colonias de ambas bacterias ya que las de *S. thermophilus* son de alrededor de 1 mm de diámetro, elevadas, opacas y de borde entero mientras que las de *L. bulgaricus* miden de 1,5 a 2 mm de diámetro, son esparcidas, translúcidas y de borde irregular.

Se realizaron al menos dos pasajes por colonia aislada para cada cepa hasta asegurar la pureza de las mismas mediante observación macroscópica y microscópica (frotis teñidos mediante la coloración de Gram).

Las colonias aisladas se inocularon en leche 12% y se incubaron a 42°C hasta coagulación. Posteriormente se conservaron a 4°C.

Caracterización de las cepas.

Las bacterias fueron inoculadas en medio 1.1.1 sólido, se incubaron a 37°C durante 16 horas y se cosecharon lavando la superficie con 1 ml de agua destilada estéril.

Las suspensiones fueron inoculadas en el medio API 50 CHL y el

medio así inoculado fue repartido en las celdillas que contienen los sustratos. Posteriormente las mismas fueron selladas con vaselina estéril.

Las incubaciones se realizaron a 37°C durante 48 horas, registrándose como positivos los casos en que se observó viraje del indicador al amarillo. La excepción la constituye la hidrólisis de esculina que se pone de manifiesto por viraje a negro.

Los sustratos ensayados en este sistema fueron:

0 control	26 salicina
1 glicerol	27 celobiosa
2 eritritol	28 maltosa
3 D-arabinosa	29 lactosa
4 L-arabinosa	30 melibiosa
5 ribosa	31 sacarosa
6 D-xilosa	32 trehalosa
7 L-xilosa	33 inulina
8 adonitol	34 melezitosa
9 β -metil-D-xilósido	35 rafinosa
10 galactosa	36 almidón
11 glucosa	37 glucógeno
12 fructosa	38 xilitol
13 manosa	39 gentiobiosa
14 sorbosa	40 D-turanosa
15 ramnosa	41 D-lixosa
16 dulcitol	42 D-tagatosa
17 inositol	43 D-fucosa
18 manitol	44 L-fucosa

19 sorbitol	45 D-arabitol
20 α -metil-D-manósido	46 L-arabitol
21 α -metil-D-glucósido	47 gluconato
22 N-acetil glucosamina	48 2-ceto gluconato
23 amigdalina	49 5-ceto gluconato
24 arbutina	
25 esculina	

Recuento de bacterias viables.

Los recuentos se realizaron plaqueando diluciones seriadas de las muestras (triptona 0,1%) sobre la superficie de medio 1.1.1 sólido. Las incubaciones se efectuaron a 37°C durante 24 horas.

Curvas de crecimiento.

El crecimiento de las bacterias en medio 1.1.1 o medio base con distintos azúcares, se siguió a través de lecturas de densidad óptica a 550 nm y/o recuento de bacterias viables.

El crecimiento en leche se siguió mediante recuentos de bacterias viables.

Ensayos de conservación de cepas.

Las bacterias fueron inoculadas al 1% en medio 1.1.1. β e incubadas a 37°C. Los cultivos fueron cosechados en fase exponencial tardía o al cabo de 16 horas de incubación, centrifugadas a 3000 g durante 7 minutos a temperatura ambiente y resuspendidas

en los crioprotectores en la concentración deseada. Inmediatamente las suspensiones fueron envasadas en porciones de 1 ml en tubos Eppendorf y congeladas a -80°C en baño de etanol. Los crioprotectores utilizados fueron lactosa, sacarosa y trehalosa (concentración final de 0,3 M).

Después de la resuspensión se realizaron recuentos de bacterias viables, ensayos de acidificación y tests de actividad.

Test de actividad.(Oberg y col, 1986)

Los test de actividad se realizaron inoculando diferentes porcentajes de las suspensiones a ensayar en medio 1.1.1 e incubando a 37°C durante un tiempo fijo. Al cabo de este tiempo se midió el pH de los cultivos y se calcularon las variaciones de pH con respecto al medio no inoculado, que fueron graficadas en función del logaritmo del porcentaje de inóculo.

Ensayos de acidificación.

Para realizar los ensayos de acidificación las suspensiones fueron inoculadas al 3% en leche 12% o medio 1.1.1. e incubadas a 37°C ó 42°C durante 4 horas. Posteriormente se midieron los valores de pH.

Ciclos de congelación-descongelación.

Los ciclos de congelación-descongelación se realizaron congelando las suspensiones en baño de etanol a -80°C durante 5 minutos y descongelando durante la misma cantidad de tiempo en baño de agua a 37°C .

Determinación de ácido fórmico.

Desproteínización de las muestras: Las muestras de medio o leche fueron acidificadas con HClO_4 (Hopner and Knappe, 1974) o TCA* hasta alcanzar concentraciones de 2% y 4,5% (p/v) respectivamente. Posteriormente se colocaron durante 5 minutos a 0°C para luego centrifugarse por 15 minutos a 1000 g (temperatura ambiente). Los sobrenadantes se neutralizaron hasta pH 6-7 con KHCO_3 , se dejaron flocular durante 16 horas a 4°C y se congelaron a -80°C hasta su análisis.

Antes de las determinaciones, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente y centrifugadas durante 10 minutos a 1000 g (temperatura ambiente). Con los sobrenadantes se efectuaron las determinaciones enzimáticas. El mismo procedimiento se siguió para la desproteínización de los patrones de las curvas de calibración.

Ensayo enzimático: Las determinaciones fueron realizadas con formiato deshidrogenasa (Johnson y col, 1964; Quayle, 1966; Hopner and Knappe, 1974). Esta enzima cataliza la siguiente reacción:

* ácido tricloroacético.



, que se sigue a través de lecturas de densidad óptica a 340 nm.

La composición de la mezcla de reacción fue: 20 μl de $\beta\text{-NAD}$ 0,05 M; 160 μl de muestra o patrón; 800 μl de buffer fosfato (KH_2PO_4 0,05 M; pH 7) y 20 μl de formiato deshidrogenasa (E.C. 1.2.1.2.; 20 unidades/ml). La unidad enzimática de formiato deshidrogenasa es la cantidad de enzima que, en presencia de formiato y $\beta\text{-NAD}$, libera 1 μmol de CO_2 por minuto a 37°C y pH 7.

Las determinaciones se efectuaron en cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico y la temperatura fue mantenida a 25°C mediante circulación de etilenglicol (criostato MGW. Lauda TUK 30). El curso de la reacción se siguió mediante un registrador (Sargent Recorder, Model SRG) conectado al espectrofotómetro (Shimadzu Double Beam Spectrophotometer UV-150-02).

Antes del agregado de la enzima, se leyó la densidad óptica a 340 nm y posteriormente este valor fue sustraído a las lecturas obtenidas.

Las velocidades iniciales de reacción (V_i), los valores de absorbancia máximos (A_m), y los valores correspondientes a A_o , se obtuvieron de las curvas de absorbancia a 340 nm en función del tiempo (Figura 1).

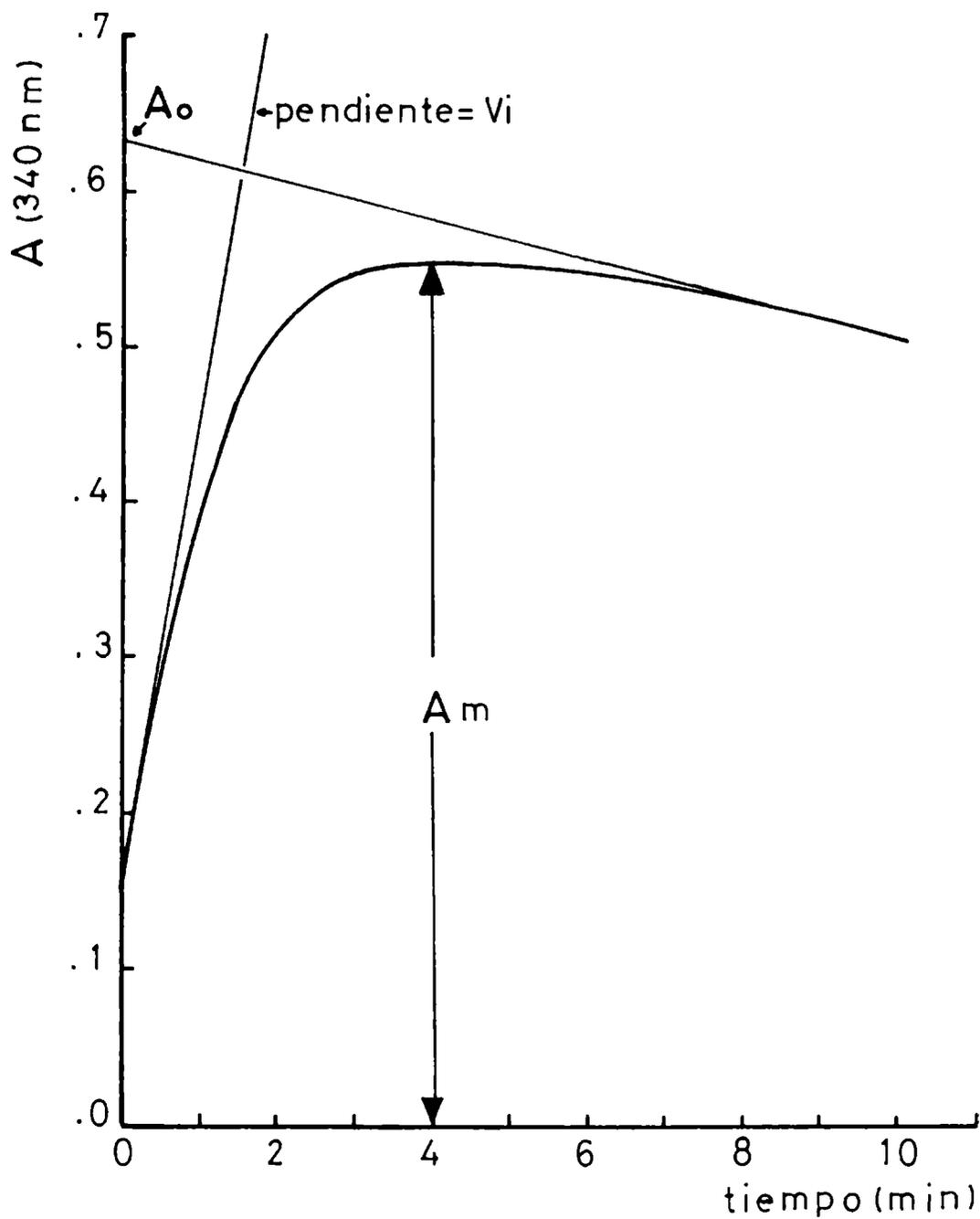


Figura 1: Curva de A_{340} en función del tiempo para la determinación enzimática de formiato con formiato deshidrogenasa. Concentración de formiato = $100\mu\text{M}$. En la figura se muestran A_0 , V_i y A_m .

Para construir las curvas de calibración, los patrones fueron preparados en agua, medio 1.1.1 o leche, con formiato de sodio secado con P_2O_5 .

Determinación de ácido láctico.

El ácido láctico se determinó colorimétricamente (Barker and Summerson, 1941).

En este método, el ácido láctico se convierte cuantitativamente en acetaldehído al ser calentado en medio sulfúrico concentrado y luego se hace reaccionar con p-hidroxí bifenilo para dar un color azul que se lee a 560 nm.

El procedimiento seguido fue el siguiente: a 0,1 ml de muestra (las muestras de leche fueron desproteinizadas con TCA y las de medio 1.1.1 no se desproteinizaron) se le agregaron 10 ml de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ al 2% (p/v) y 1 g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, se agitó y se dejó reposar durante 30 minutos. Este tratamiento sirve para evitar interferencias. Posteriormente se centrifugó a 1500 g durante 10 minutos (temperatura ambiente). Cuando las determinaciones no se realizaron inmediatamente, las muestras fueron conservadas a -80°C . Los patrones de ácido láctico fueron tratados de la misma manera.

Para la colorimetría se colocaron 200 μl de muestra cúprica (en los casos en que se utilizaron menores volúmenes, se llevó a 200 μl con el blanco correspondiente sometido al tratamiento cúprico), 10 μl de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ al 4 % (p/v) y 1,2 ml de H_2SO_4 concentrado. Se llevó a baño de agua a 100°C durante 5 minutos para que tenga lugar la conversión de ácido láctico en acetaldehído. Posteriormente se enfrió a una temperatura $< 20^\circ\text{C}$ y se agregaron 20 μl de p-hidroxí bifenilo (solución al 1,5 % (p/v) en NaOH 0,5 % (p/v)). El desarrollo del color se llevó a cabo a 30°C

durante 30 minutos y el exceso de reactivo se eliminó por calentamiento a 100°C durante 90 segundos.

Las lecturas de absorbancia se efectuaron a 560 nm (Shimadzu Double Beam Spectrophotometer UV-150-02).

Determinación de azúcares.

Los azúcares fueron determinados mediante cromatografía en capa fina utilizando placas de sílica gel 60 de 0,20 mm de espesor (Merck). Como patrones se usaron soluciones de azúcares (pro-análisis) de 1 µg/ml, como solvente de corrida se empleó n-propanol- acetato de etilo-agua (70:20:10) y como revelador una solución de ácido p-amino benzoico (0,7%) y ácido fosfórico (3%) disueltos en metanol. Luego de aplicada la mezcla reveladora las placas se colocaron a 110°C durante 10 minutos para que se produzca el desarrollo del color. La cuantificación se realizó mediante lecturas de reflectancia (Shimadzu Dual Wavelength TLC Scanner CS-910) utilizando longitudes de onda de 410 y 720 nm para la muestra y la referencia respectivamente.

Análisis estadístico.

Las líneas rectas se trazaron mediante cuadrados mínimos (Daniel, 1977).

En los casos en que se necesitó detectar diferencias entre rectas se utilizaron las pruebas F y T (Volk, 1958).

La producción de ácidos láctico y fórmico, así como también las relaciones fórmico/láctico, se estudiaron utilizando un

diseño factorial, se hicieron los correspondientes análisis de varianza y las diferencias entre promedios se ensayaron mediante tests t (Daniel, 1977; Volk, 1958).

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO II: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE CEPAS

Aislamiento y caracterización de cepas.

Se han propuesto varios medios para el aislamiento y recuento diferencial de las bacterias del yogurt; como ejemplos podemos citar el ágar Lee (Lee et al, 1974) y el ágar HYA (Porubcan and Sellars, 1973). En algunos casos se ha propuesto la utilización de dos medios simultáneamente, por ejemplo: ágar ST y ágar LB (Driessen et al, 1977), ágar LAPT s4 y LAPT g10 (Peral de Portillo et al, 1988), etc.

En el presente trabajo se utilizó el medio de Lee para realizar los aislamientos de *S. thermophilus*.

En la figura 2 se observan colonias de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* desarrolladas en ágar Lee. Las colonias del estreptococo son amarillas, de borde entero, elevadas y de alrededor de 1 mm de diámetro, mientras que el lactobacilo forma colonias translúcidas, de borde irregular, esparcidas y de 1,5 a 2 mm de diámetro.

Con respecto a la morfología microscópica, en la figura 3 se observa una coloración de Gram realizada a partir de un cultivo mixto de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* efectuado en leche: puede advertirse que la diferenciación entre los dos microorganismos es clara.

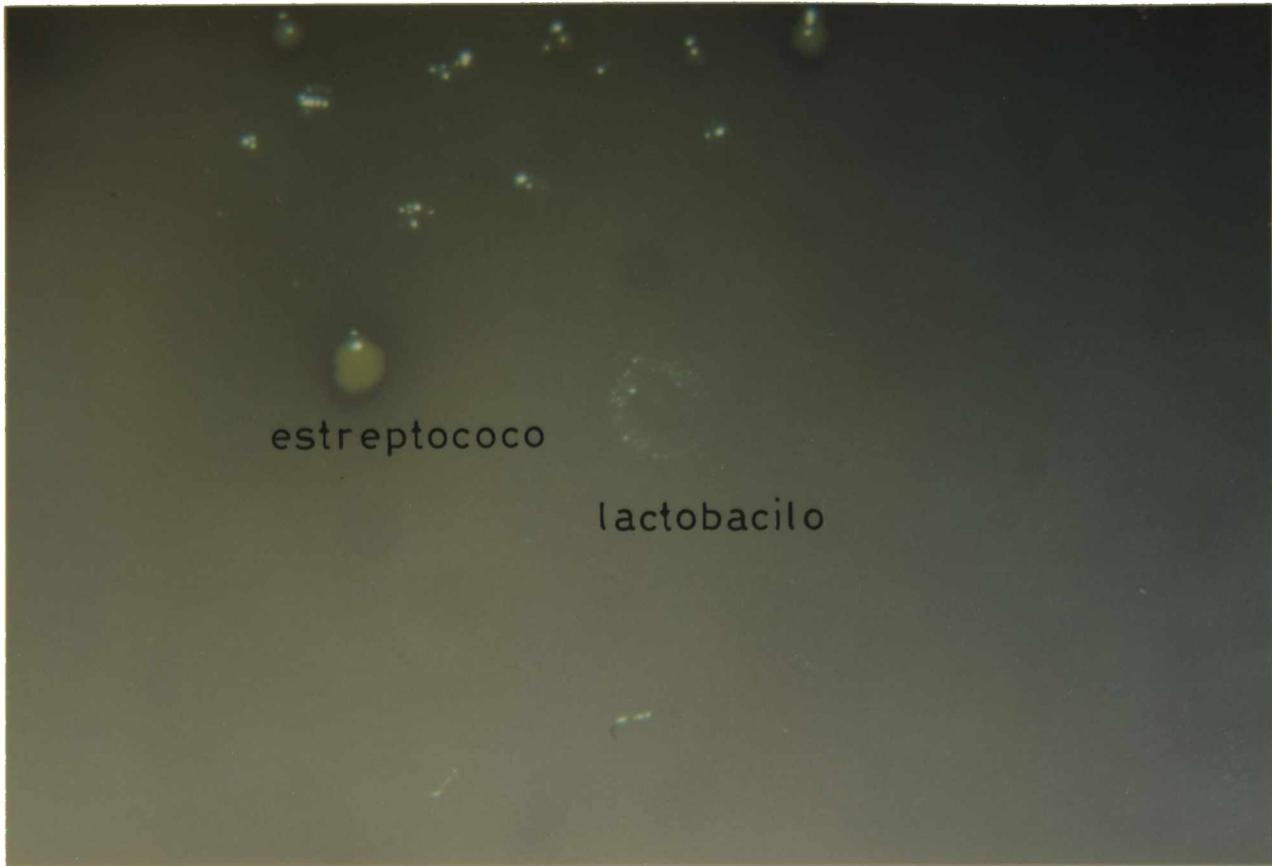


Figura 2: Colonias de **Streptococcus thermophilus** y **Lactobacillus bulgaricus** al cabo de 24 horas de incubación a 37°C en ágar Lee.

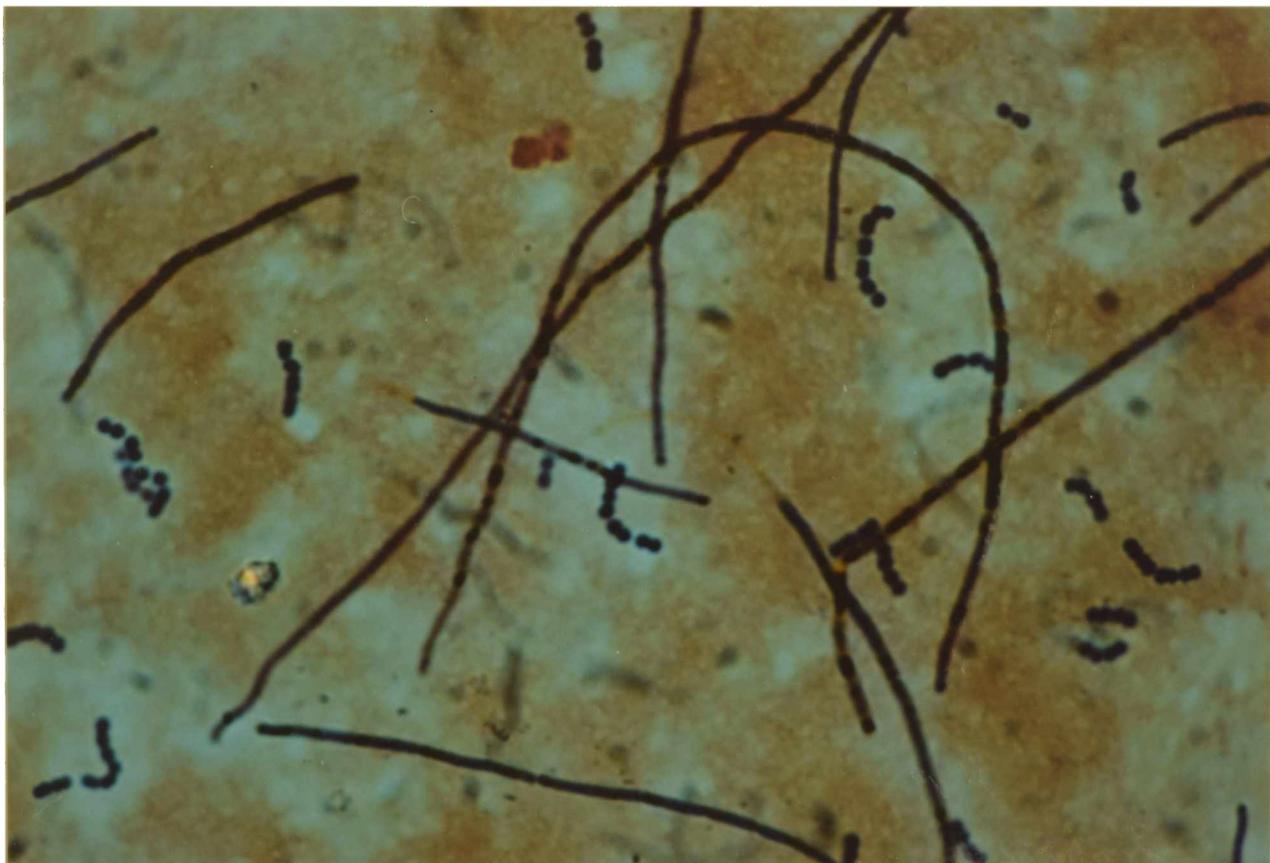


Figura 3: Coloración de Gram de un cultivo de **Lactobacillus bulgaricus** y **Streptococcus thermophilus** realizado en leche.

Sin embargo, cuando las células son crecidas en medio de Lee o 1.1.1, los estreptococos presentan un marcado pleomorfismo que da lugar a la aparición de numerosas formas bacilares (figura 4).

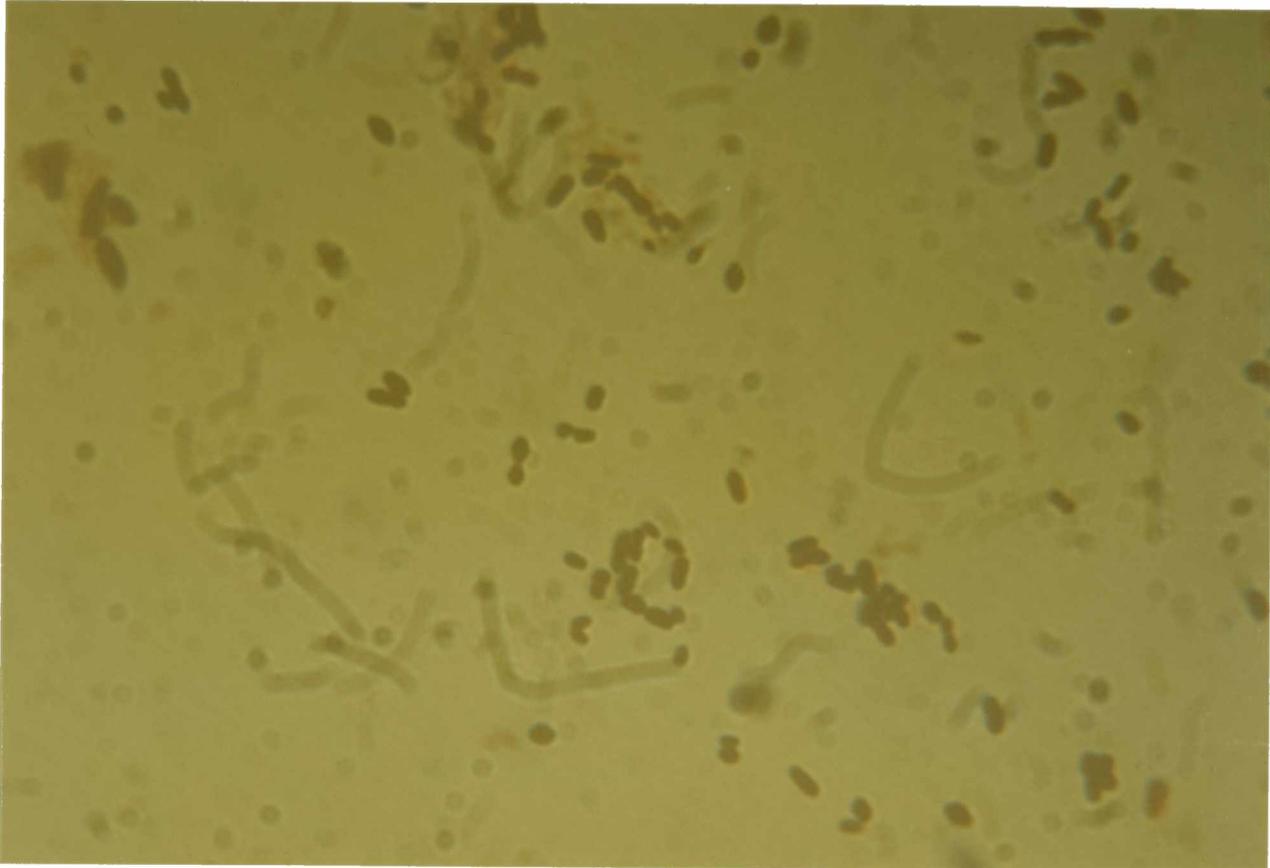


Figura 4: Coloración de Gram de colonias de *S. thermophilus* crecidas en ágar Lee a 37°C.

Esta característica debe tenerse en cuenta cuando se realizan observaciones microscópicas de colonias crecidas en los medios anteriormente citados, ya que podrían conducir a interpretaciones erróneas.

Se aislaron colonias de cinco muestras (fermentos para yogurt líquidos y liofilizados, fermentos para biogurt liofilizados y yogurts comerciales). En todos los casos las colonias en ágar Lee mostraron la morfología y coloración características de *S.*

thermophilus.

Al realizar coloraciones de Gram de las bacterias provenientes de las colonias aisladas se observaron cocos pleomórficos Gram (+) en cadenas. El pleomorfismo disminuyó cuando las bacterias crecieron en leche.

Perfil bioquímico.

Una de las características metabólicas de *S. thermophilus* es que fermenta pocos azúcares (Hutkins and Morris, 1987). En la tabla 3 se muestra el porcentaje de reacciones positivas extraídas de tablas del sistema API 50 CHL.

Tabla 3: Porcentaje de reacciones positivas (viraje del indicador por descenso de pH) obtenidas con cepas de *S. thermophilus* en el sistema API 50 CHL.

Sustrato	% de reacciones positivas.
ribosa	33
glucosa	100
fructosa	50
manosa	16
lactosa	100
sacarosa	100
trehalosa	16
D-turanosa	16
D-lixosa	16
5-cetogluconato	33
galactosa	0

La figura 5 muestra los resultados obtenidos con dos cepas de *S. thermophilus*. Puede observarse que la cepa CP4 sólo fermenta glucosa, lactosa y sacarosa mientras que la cepa ATCC 19258 ataca además galactosa, fructosa y manosa. La fermentación de galactosa por parte de la cepa ATCC 19258 es una característica que ya ha sido observada por otros investigadores (Somkuti and Steimberg, 1979).



Figura 5: Resultados obtenidos con el sistema API para las cepas ATCC 19258 y CP4 al cabo de 48 horas a 37°C. Viraje del indicador al amarillo indica resultado positivo.

Los resultados obtenidos para todas las cepas se exponen en la tabla 4.

Tabla 4: Patrones de fermentación de azúcares de las cepas aisladas.

Azúcar	Cepa						
	ATCC 19258	CRL 410	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
glucosa	+	+	+	+	+	+	+
fructosa	+	-	-	-	-	-	(+)
manosa	+	-	-	-	-	-	(+)
lactosa	+	+	+	+	+	+	+
sacarosa	+	+	+	+	+	+	+
galactosa	+	-	-	-	-	-	-

+ : indica viraje del indicador al amarillo.

(+): indica viraje al amarillo poco marcado.

Teniendo en cuenta el origen, las características morfológicas de las colonias aisladas, la morfología microscópica y las propiedades tintoriales, así como también los perfiles bioquímicos de los microorganismos aislados, podemos sostener que se trata de cepas de *S. thermophilus*.

Consumo de lactosa

El análisis ,para la cepa CP4, del consumo de lactosa en medios con distintas concentraciones ,(figura 6) confirma los resultados expuestos en la tabla 4.

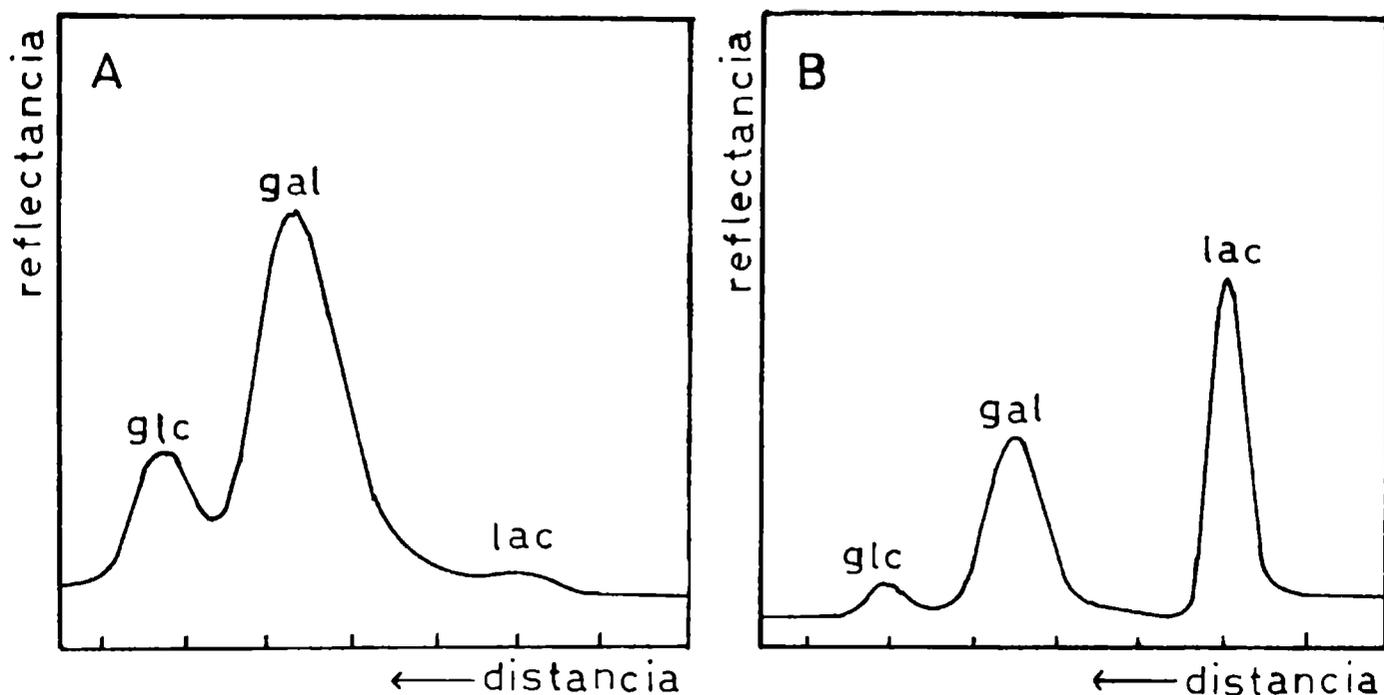


Figura 6: Densitogramas correspondientes a cromatografías en capa fina de cultivos de *S. thermophilus* CP4 realizados en medio base con diferentes concentraciones iniciales de lactosa a 37°C. A: lactosa 6 mM y B: lactosa 29,8 mM. En A se sembró 5 veces más muestra que en B.

Con una concentración inicial de lactosa de 6,0 mM prácticamente no se detecta azúcar remanente al cabo de 16 horas de incubación a 37°C (figura 6 A) y aparece un pico de galactosa. En la misma figura puede notarse que con una concentración inicial de 29,8 mM, aparece un pico de lactosa remanente y el correspondiente a galactosa aumenta considerablemente ya que este último azúcar no es metabolizado (figura 6 B).

En la tabla 5 se muestra un estudio más detallado del consumo de lactosa por *S. thermophilus* CP4.

Tabla 5 : Consumo de lactosa por *S. thermophilus* CP4 al cabo de 16 hs de incubación a 37°C en medios con diferentes concentraciones del azúcar.

lactosa (mM)		
inicial	final	consumido
1,5	0	1,5
3,0	0	3,0
6,0	0,1	5,9
11,9	3,5	8,4
14,9	4,6	10,3
17,9	6,4	11,5
23,8	10,0	13,8
26,8	12,6	14,2
29,8	16,3	13,5

Puede notarse que con bajas concentraciones de lactosa (1,5 y 3,0 mM) no queda azúcar remanente al cabo de 16 horas de incubación pero que al aumentar la concentración se alcanza un consumo máximo de 10-14 mM que se mantiene constante independientemente del contenido de lactosa del medio.

Desarrollo en diferentes medios de cultivo.

En la siguiente figura pueden advertirse las variaciones en el crecimiento de diferentes cepas en el mismo medio de cultivo.

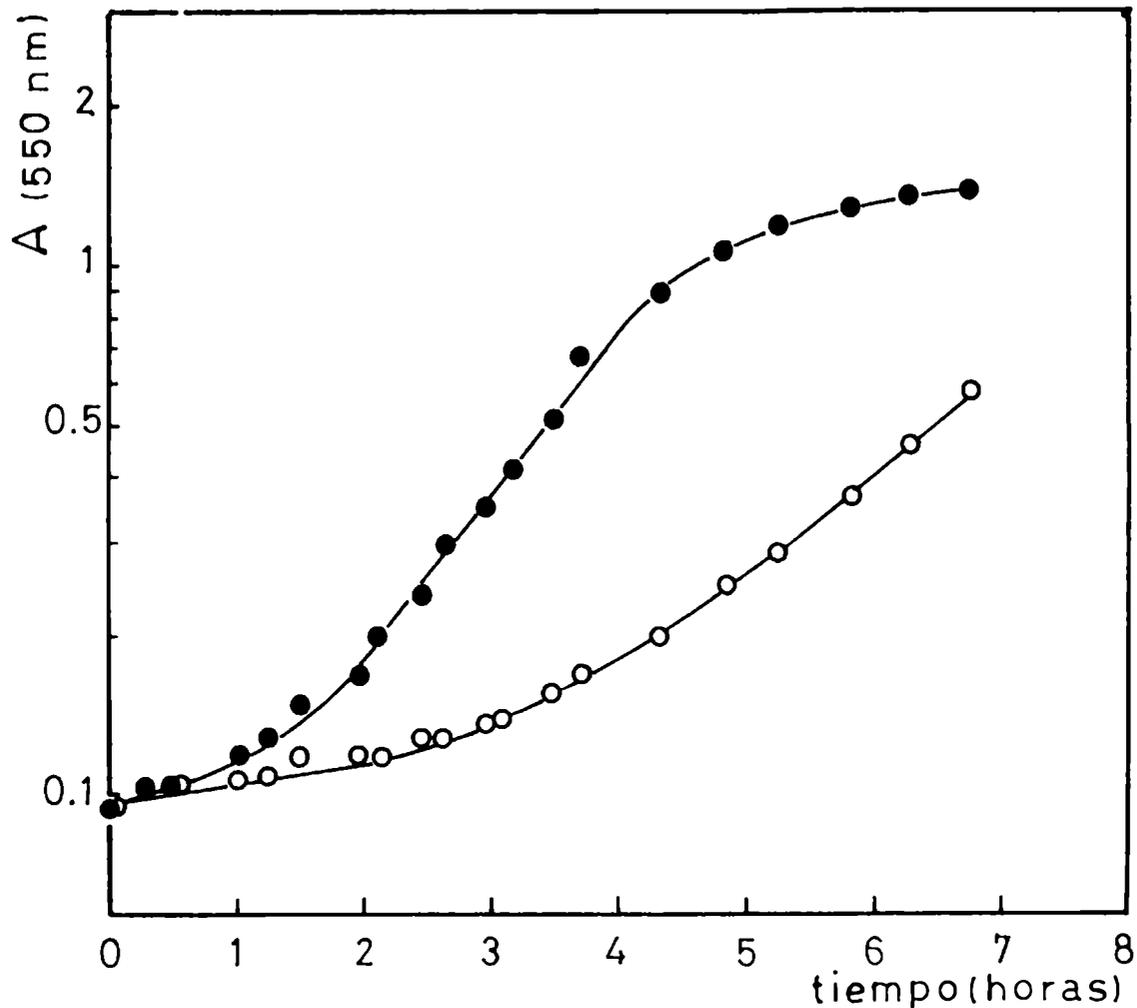


Figura 7: Cinéticas de crecimiento de dos cepas de *S. thermophilus* en medio 1.1.1 a 37°C. Referencias: CP1 (●), CP3 (○).

Los tiempos de latencia fueron de 64 y 172 minutos para las cepas CP1 y CP3 respectivamente. En cuanto a los tiempos de duplicación fueron también muy diferentes: 63 minutos para CP1 y 91 minutos para CP3. Otra diferencia importante en el desarrollo se hace evidente al observar que la cepa CP1 llegó a la fase estacionaria a las seis horas y media mientras que en ese tiempo la

otra cepa se encontraba aún en fase exponencial.

Cuando se compararon el crecimiento y la capacidad acidificante de una cepa en diferentes medios de cultivo se obtuvieron los resultados que se muestran a continuación.

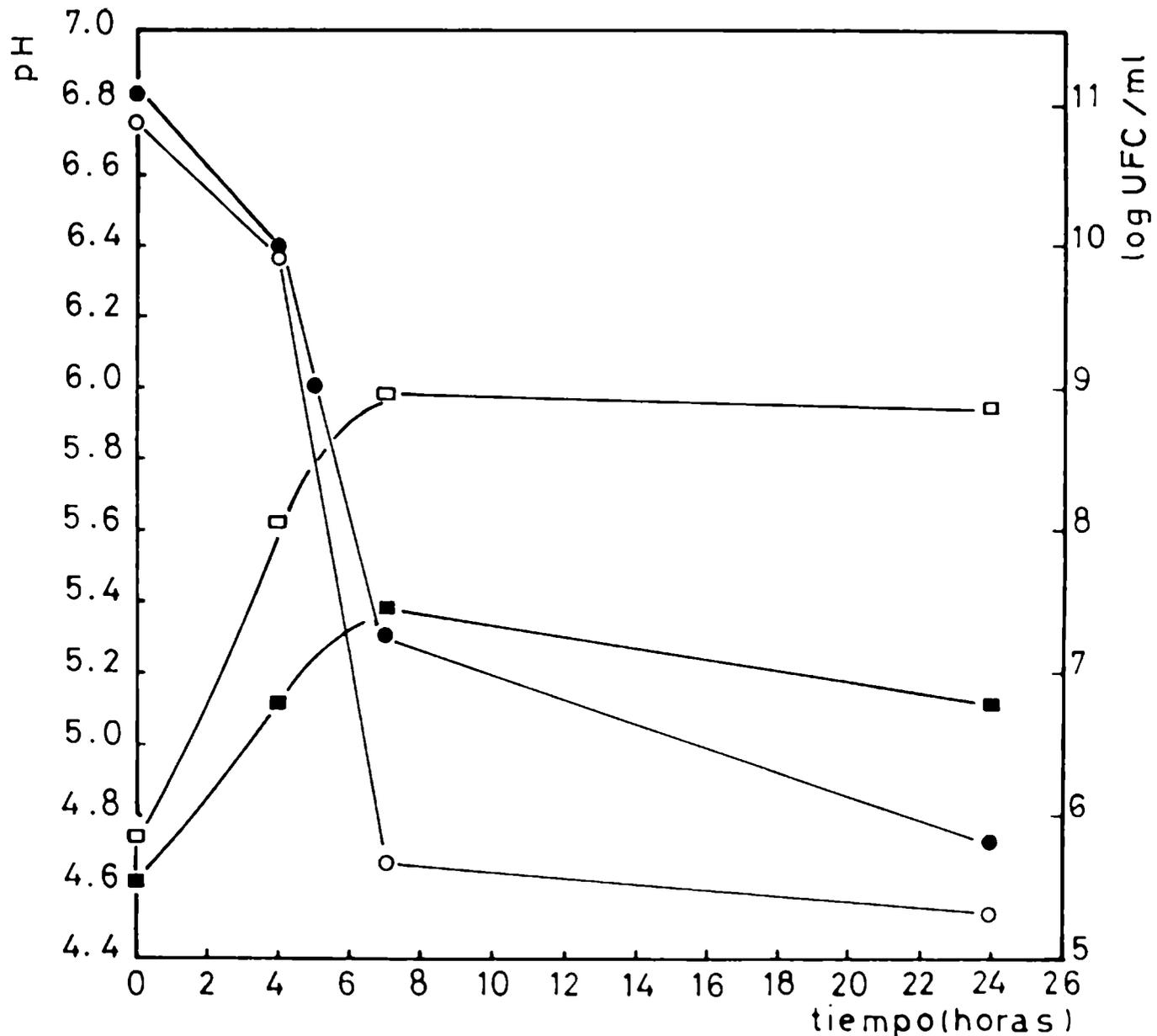


Figura 8: Cinéticas de crecimiento y acidificación de *S. thermophilus* CP4 a 37°C en medio 1.1.1 y leche suplementada. Referencias: log UFC/ml en medio 1.1.1. (■), log UFC/ml en leche suplementada (□), pH en medio 1.1.1 (●) y pH en leche suplementada (○).

El crecimiento en los dos medios estudiados es muy diferente (figura 8): en leche suplementada se alcanzan recuentos de bacterias viables de alrededor de 9×10^8 UFC/ml al cabo de 7 horas de incubación y el título se mantiene prácticamente constante a las 24 horas. En medio 1.1.1, por el contrario, se observa una disminución del número de microorganismos en el mismo período ya que se pasó de un valor de alrededor de 3×10^7 UFC/ml a las 7 horas a $6,3 \times 10^6$ UFC/ml a las 24 horas. Esta disminución, que se observó en todos los casos en que se realizaron cinéticas en medio 1.1.1, no puede ser atribuida al pH en sí mismo, ya que en leche el valor final es más bajo que en medio 1.1.1: luego de 24 horas de incubación los valores fueron de $4,52 \pm 0,01$ y $4,72 \pm 0,01$ unidades respectivamente. Sin embargo puede observarse (figura 8) que entre las 7 y las 24 horas de incubación, el pH desciende 0,60 unidades en medio 1.1.1 y 0,14 unidades en leche y por consiguiente, al final de la fase exponencial las células están sujetas a cambios más pronunciados en su entorno cuando crecen en medio 1.1.1 que cuando lo hacen en leche. Además, la sensibilidad de las células a condiciones subóptimas podría ser diferente en distintos medios.

Conclusión:

Los resultados presentados en este capítulo evidencian la variación que existe entre algunas de las características metabólicas de diferentes cepas de *S. thermophilus*, no sólo en lo que respecta al patrón fermentativo sino también al desarrollo en diferentes medios de cultivo. En lo que resta del presente trabajo se enfocarán los estudios hacia dos aspectos metabólicos industrialmente útiles: la producción de lactato y formiato.

CAPITULO III: ASPECTOS METABOLICOS DE INTERES

Consideraciones generales

S. thermophilus es una bacteria altamente adaptada a vivir en leche. En general fermenta pocos azúcares de los cuales prefiere los disacáridos como lactosa y sacarosa, a los monosacáridos como glucosa (Sherman, 1937; Garvie, 1984; Hardie, 1986).

En la siguiente figura se presenta un esquema simplificado de las rutas de utilización de la lactosa en *S. thermophilus* (Hutkins and Morris, 1987).

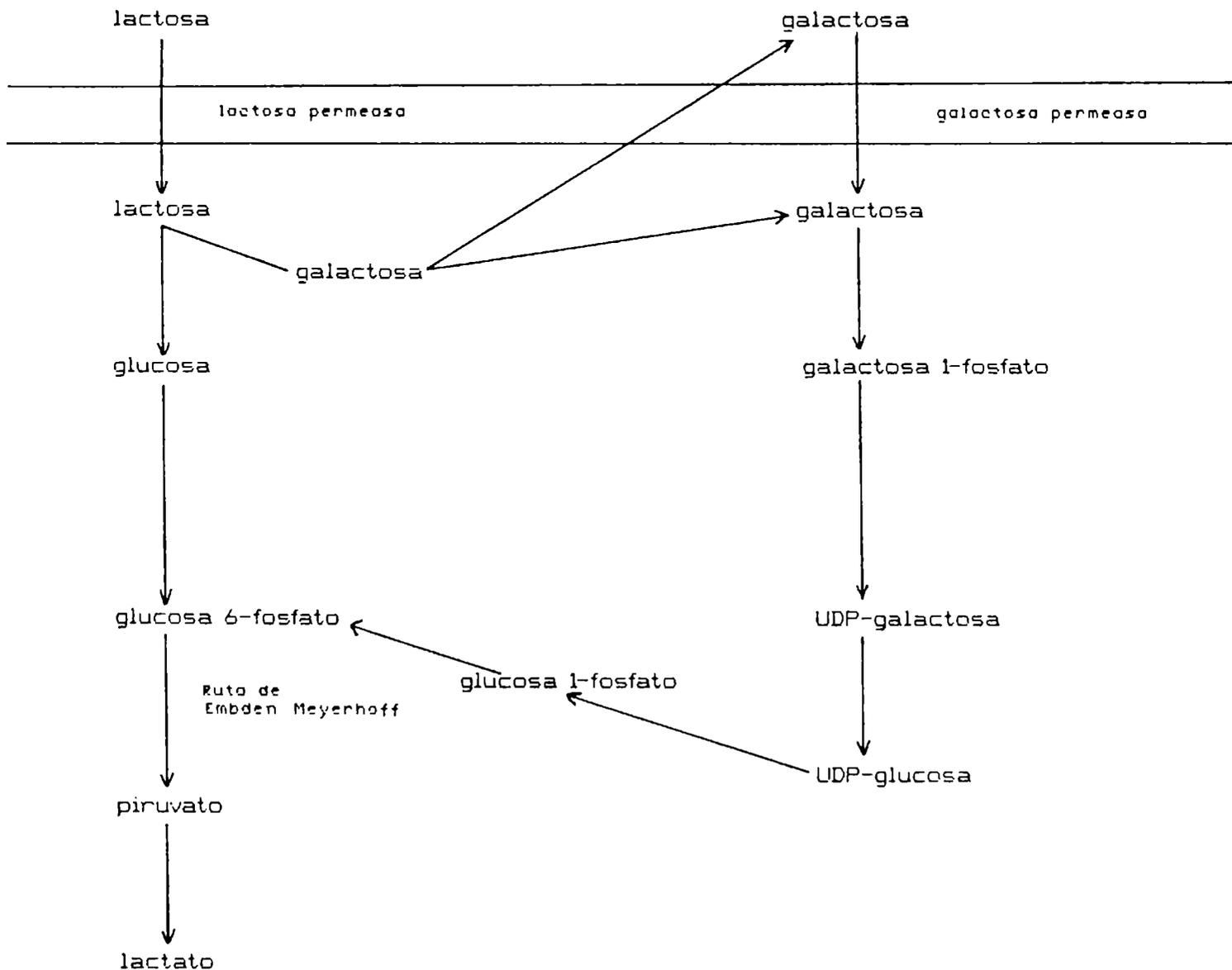


Figura 9: Vías de utilización de la lactosa en *S. thermophilus*.

Debe aclararse que la mayoría de las cepas no fermentan la galactosa (ver Capítulo II) y por lo tanto, este azúcar se libera al medio.

El principal producto del metabolismo de los azúcares es el ácido láctico por lo cual *S. thermophilus* es considerado homofermentativo. Sin embargo, también se pueden producir pequeñas cantidades de otras sustancias como piruvato, formiato y CO₂. Estas sustancias, tal como se indicó en la Introducción, tienen importancia en la simbiosis con *L. bulgaricus*.

En la figura 10 se muestran las distintas rutas metabólicas que puede seguir el piruvato en estreptococos lácticos homofermentativos.

En *S. thermophilus* tienen especial importancia las vías que conducen a lactato y formiato ya que el primero determina un descenso de pH que da lugar a la coagulación de las caseínas, y el segundo estimula al *L. bulgaricus*. Cabe mencionar que el descenso de pH también favorece el desarrollo del bacilo.

La conversión de piruvato en lactato está catalizada por la lactato deshidrogenasa (LDH). Esta enzima requiere, en algunos estreptococos lácticos, la presencia de fructosa 1,6 difosfato (FDP) para su activación (Wolin, 1964; Wittenberger and Angelo, 1970; Jonas y col., 1972) y una regulación similar ha sido hallada en otras especies (de Vries and Stouthamer, 1968; de Vries y col., 1970; Neimark and Tung, 1973). Lógicamente los cambios en los niveles intracelulares de FDP regularían la actividad de la LDH. Otros metabolitos involucrados en la regulación de la LDH son el fosfoenolpiruvato, el AMP, el ADP y el fosfato inorgánico, los cuales inhiben la acción de la enzima en *Streptococcus mutans*

(Yamada and Carlsson, 1975).

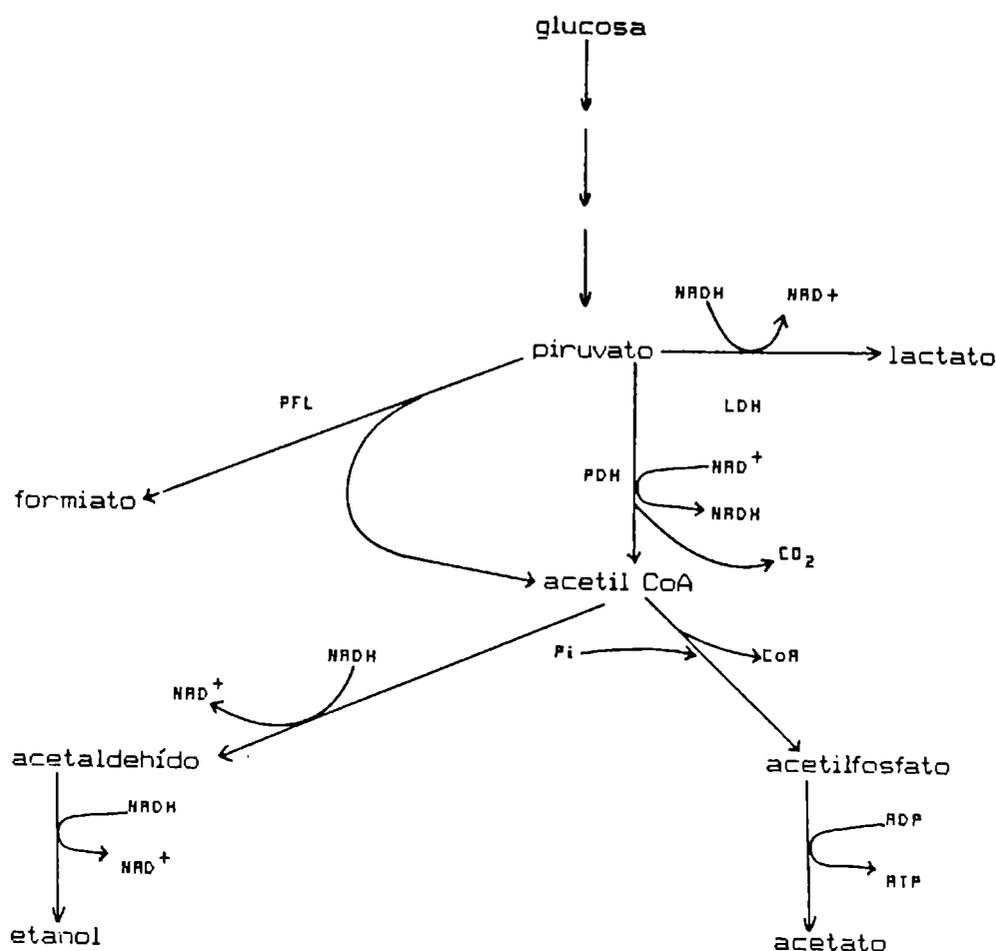


Figura 10: Rutas metabólicas para el piruvato en estreptococos lácticos homofermentativos (según Fordyce y col., 1984). En la figura se han señalado solamente las enzimas más importantes.

Referencias: PFL: piruvato-formiato-liasa, LDH: lactato deshidrogenasa, PDH: piruvato deshidrogenasa.

En lo que respecta a la conversión de piruvato en formiato, se ha visto que en ciertas especies la reacción es catalizada por la piruvato formiato liasa (Lindmark y col., 1969; Thauer y col., 1972; Knappe y col., 1974). En *Streptococcus mutans* la actividad de esta enzima se ve inhibida por fosfatos de triosas tales como fosfogliceraldehído y fosfato de dihidroxiacetona (Takahashi y

col., 1982) y por el O₂ (Abbe y col., 1982).

Teniendo en cuenta lo expuesto, puede suponerse que el medio y las condiciones de cultivo podrían afectar los niveles y/o la actividad de las enzimas claves para la síntesis de formiato y lactato. Asimismo diferentes cepas podrían estar sujetas a diferentes regulaciones.

Es importante destacar que, aunque se sabe desde hace más de 20 años que se produce formiato en cultivos de *S. thermophilus* y que éste es el principal estimulante de *L. bulgaricus* (Galesloot y col., 1968; Veringa y col., 1968) este aspecto del metabolismo, tal como se mencionó en la Introducción, ha sido muy poco estudiado, en especial en leche (Juillard y col., 1987), y no se ha tenido en cuenta para la selección de cepas para fermentos (Bouillane et Desmazeaud, 1980).

Determinación de formiato.

En general, las determinaciones de formiato en cultivos de bacterias lácticas se han efectuado usando métodos cromatográficos (Veringa y col., 1968; Rhee and Pack, 1980; Thomas y col., 1980), colorimétricos (Moletta et Albagnac, 1984) y enzimáticos (Fordyce y col., 1984; Thomas and Crow, 1984).

Debido a la especificidad y sensibilidad del método enzimático, que utiliza formiato deshidrogenasa (Johnson y col., 1964; Quayle, 1966; Hopner and Knappe, 1974), en el presente trabajo se ha estudiado la aplicación de dicho método para determinar la producción de formiato en cultivos de *S. thermophilus*.

La reacción catalizada por la formiato deshidrogenasa es la siguiente:



El aumento de la concentración de NAD reducido se puede seguir mediante la lectura de la absorbancia a 340 nm tal como se describió en Materiales y métodos (Capítulo I).

La figura 11 muestra una curva típica de absorbancia (340 nm) en función del tiempo para una determinación enzimática de ácido fórmico:

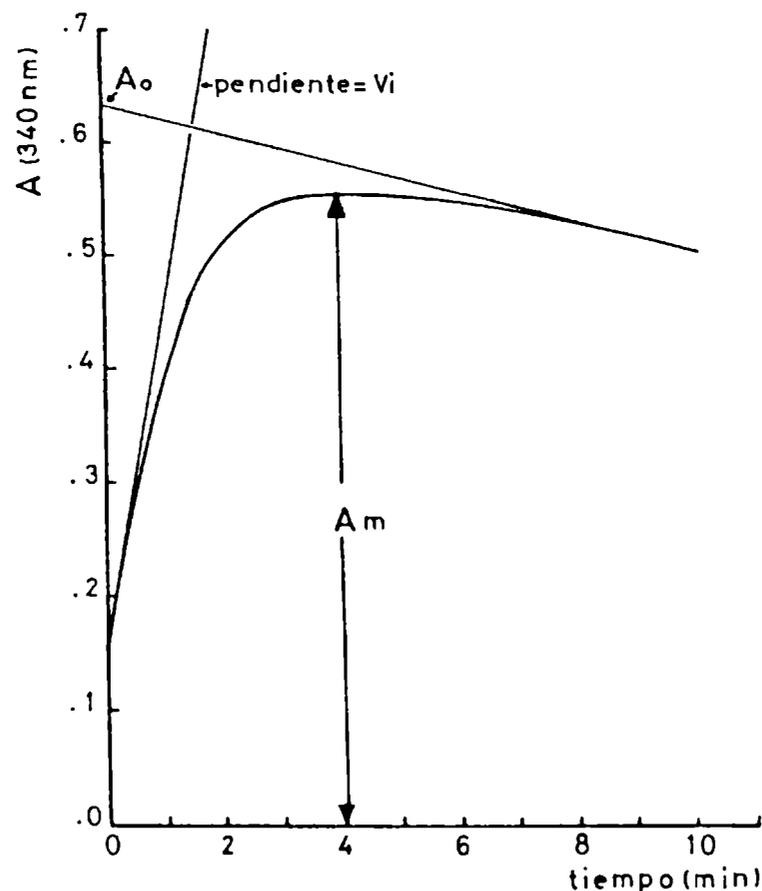


Figura 11: Curva de absorbancia a 340 nm (A_{340}) en función del tiempo para la determinación enzimática de formiato con formiato deshidrogenasa. La concentración de formiato fue de 100 μM . En la figura se muestran A_m , A_0 y V_i (ver Materiales y métodos).

Puede apreciarse que, luego de alcanzarse el valor máximo de absorbancia (A_m), se produce una disminución que puede atribuirse a la reoxidación del NAD reducido (Bergmeyer y col., 1974).

Para efectuar las curvas de calibración y/o las determinaciones puede utilizarse el valor de A_m a bien A_o ya que en ambos casos se obtienen curvas de calibración lineales (Figura 12).

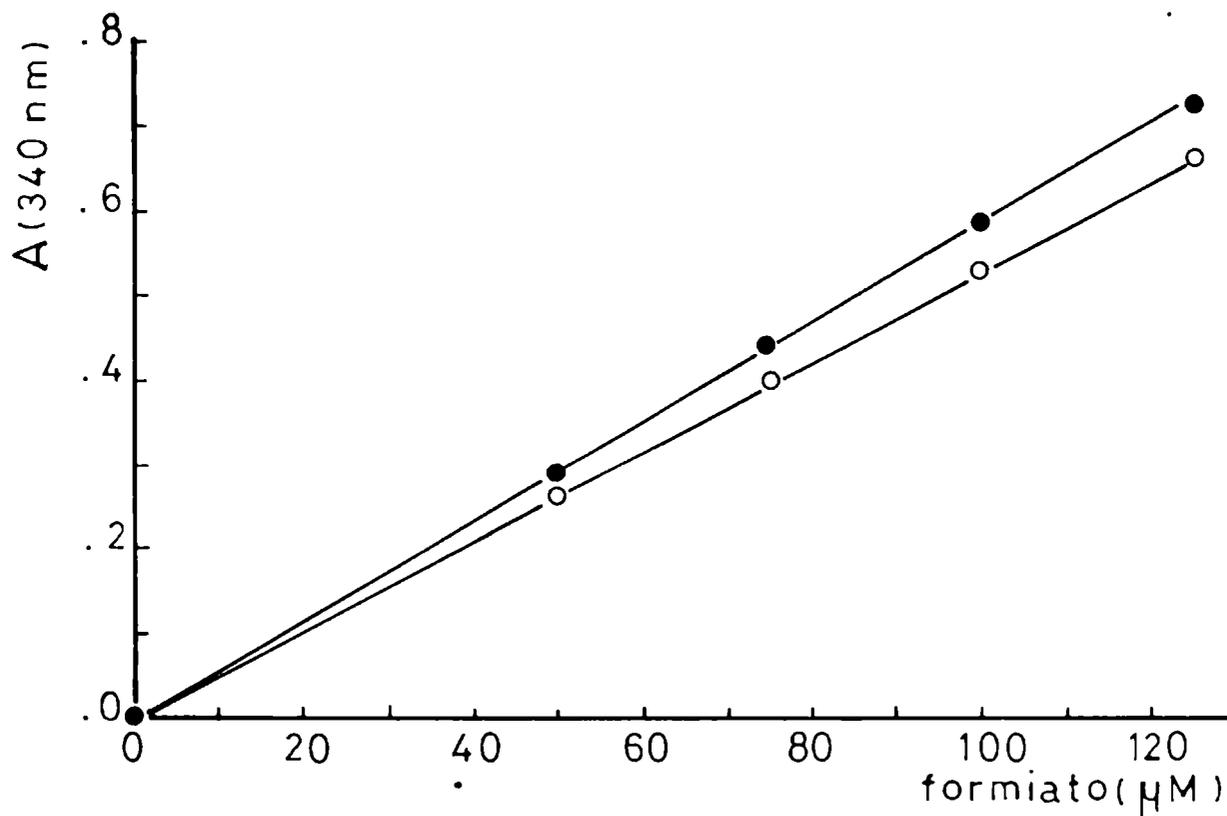


Figura 12: Curvas de calibración para la determinación enzimática de formiato con formiato deshidrogenasa utilizando los valores de A_o (●) y A_m (○).

Obviamente es conveniente trabajar con los valores de A_m debido a que de esta manera se reduce el tiempo necesario para las determinaciones.

Atendiendo a las características de la bacteria estudiada y sabiendo que el principal producto del metabolismo de los azúcares es el ácido láctico, era preciso investigar la posible interferencia de este ácido en la determinación. Con el objeto de dilucidar esta cuestión se efectuaron determinaciones en presencia y en ausencia de lactato. Las concentraciones de lactato utilizadas se eligieron teniendo en cuenta los niveles de este ácido que se producen normalmente en cultivos de *S. thermophilus*. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente figura:

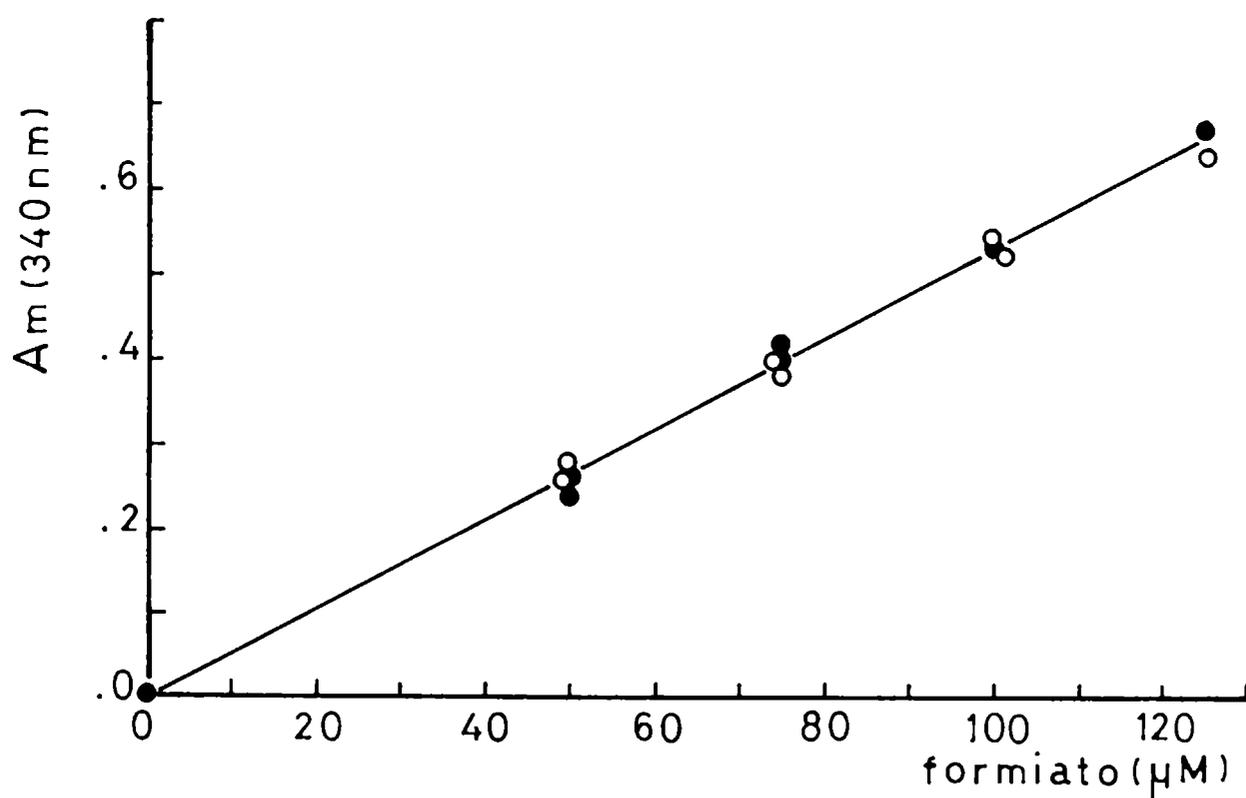


Figura 13: Influencia del lactato en la determinación enzimática de formiato. La concentración de lactato en la mezcla de reacción es de 14 mM. Referencias: sin lactato (●), con lactato (○).

La figura 13 nos indica claramente que, en las condiciones del ensayo, no existe interferencia por la presencia de lactato ya que no es posible establecer diferencias entre los valores obtenidos con y sin lactato. Asimismo es conveniente tener en cuenta que el valor de la pendiente obtenida es exactamente igual al que se encuentra en la bibliografía: $5,27 \times 10^{-3}$ (Hopner and Knappe, 1974).

Hasta aquí hemos considerado sólo algunos aspectos del método enzimático para determinar formiato; queda claro que las muestras de cultivos de *S. thermophilus* en medio 1.1.1 o en leche podrían traer aparejadas complicaciones adicionales. Un punto muy importante a tener en cuenta es la desproteínización de las muestras.

En la técnica original se recomienda la utilización de HClO_4 (2 % p/v) para precipitar las proteínas y KHCO_3 para neutralizar. De esta manera el ClO_4^- es eliminado, ya que precipita como KClO_4 . Las muestras provenientes de cultivos en medio 1.1.1 no mostraron precipitación al ser tratadas con ácido perclórico, y por lo tanto se pensó en la posibilidad de no desproteínizarlas. En la figura 14 se muestran los resultados obtenidos con patrones de formiato preparados en medio 1.1.1 y agua.

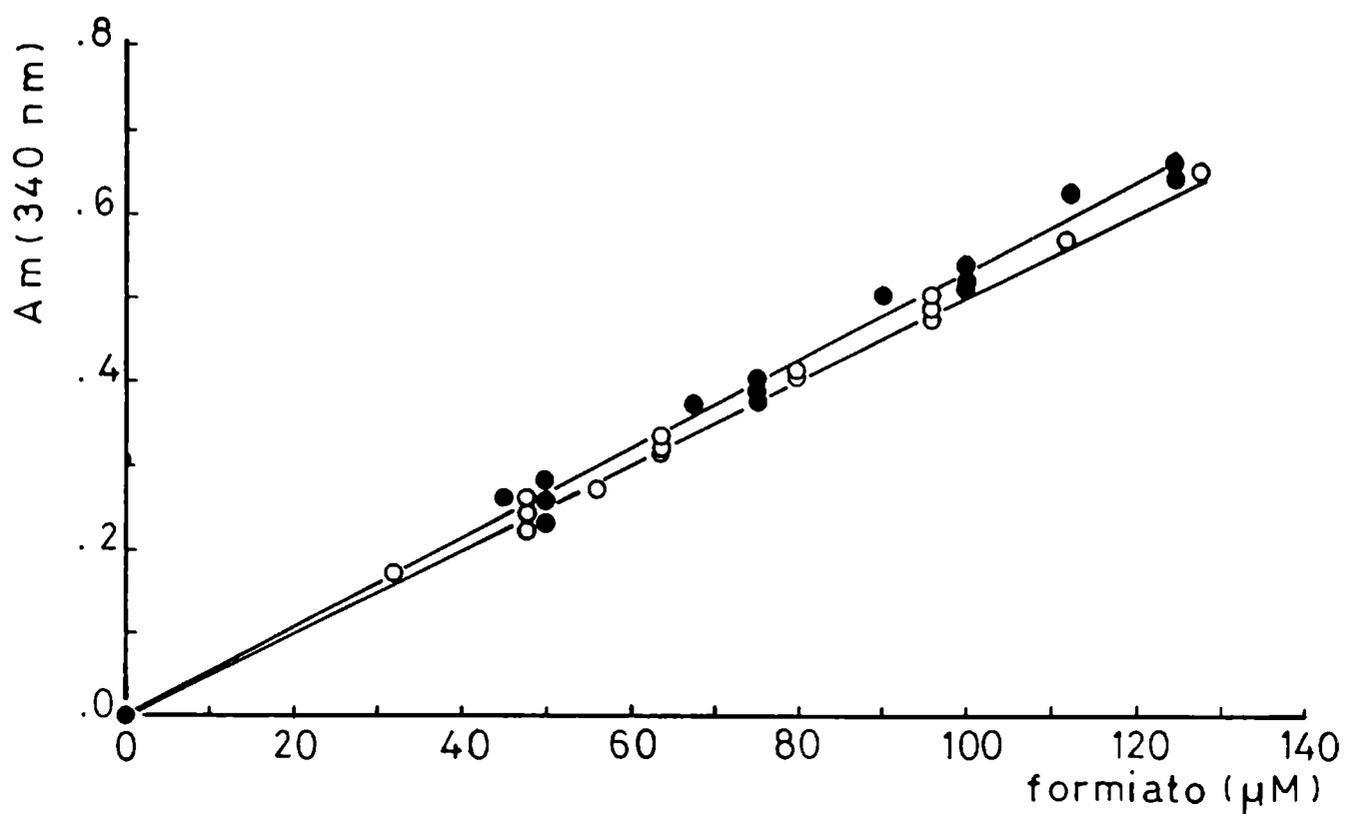


Figura 14: Curvas de calibración para la determinación enzimática de formiato en muestras no desproteinizadas. Referencias: agua (●) , medio 1.1.1 (○), Am: valor de absorbancia máximo a 340 nm.

El análisis de varianza de los resultados obtenidos, reveló una significativa mejora en la correlación ($P < 0,005$) al considerar rectas diferentes en lugar de una sola con todos los puntos. En la tabla 6 se dan los valores de las pendientes y los coeficientes de correlación determinados para las curvas de la figura 14.



Tabla 6: Pendientes y coeficientes de correlación para la determinación enzimática de formiato efectuada con patrones no desproteinizados.

	pendiente (x 10 ³)	DS (x 10 ³)	r	n
agua	5,26	0,18	0,991	18
1.1.1	5,05	0,09	0,997	22

DS: desviación standard.

r: coeficiente de correlación.

n: número de puntos de la recta.

Teniendo en cuenta los resultados que se muestran en la figura 14 y en la tabla 6, puede concluirse que no es necesaria la desproteínización para muestras en medio 1.1.1. Nótese (tabla 6) que se han obtenido excelentes correlaciones lineales tanto para patrones en agua ($r= 0,991$, $n= 18$) como en medio 1.1.1 ($r= 0,997$, $n= 22$). Como se mencionó anteriormente, el valor de la pendiente que figura en la bibliografía para patrones preparados en agua es de $5,27 \times 10^{-3}$ (Hopner and Knappe, 1974).

Ahora bien, para efectuar las determinaciones en muestras de cultivos de *S. thermophilus* en leche se hace necesaria una desproteínización. Teniendo en cuenta lo antedicho, se probó la técnica original con $HClO_4$ y $KHCO_3$ para patrones preparados en leche. Las reacciones fueron muy lentas, ya que para llegar a A_m con concentraciones de formiato de $100 \mu M$ fueron necesarios alrededor de 15 minutos. Si se tiene en cuenta que un patrón de esa concentración preparado en agua o medio 1.1.1 (y no desproteínizado) requiere para llegar a A_m , solamente 4 ó 5 minutos, resulta

evidente que existe alguna interferencia.

Considerando que el perclorato es un anión oxidante y que la reacción enzimática implica la reducción de NAD, resulta lógico suponer que si quedaran restos de ClO_4^- luego de la desproteínización, se crearía un entorno que dificultaría la acción de la formiato deshidrogenasa.

Si lo dicho anteriormente fuera cierto, al utilizar un ácido no oxidante en la desproteínización, la reacción tendría que transcurrir más rápidamente. Consecuentemente con estas ideas se ensayó la desproteínización con TCA al 4,5 % (p/v).

En la figura 15 se muestra la comparación entre las reacciones realizadas con patrones desproteínizados con TCA y con HClO_4 .

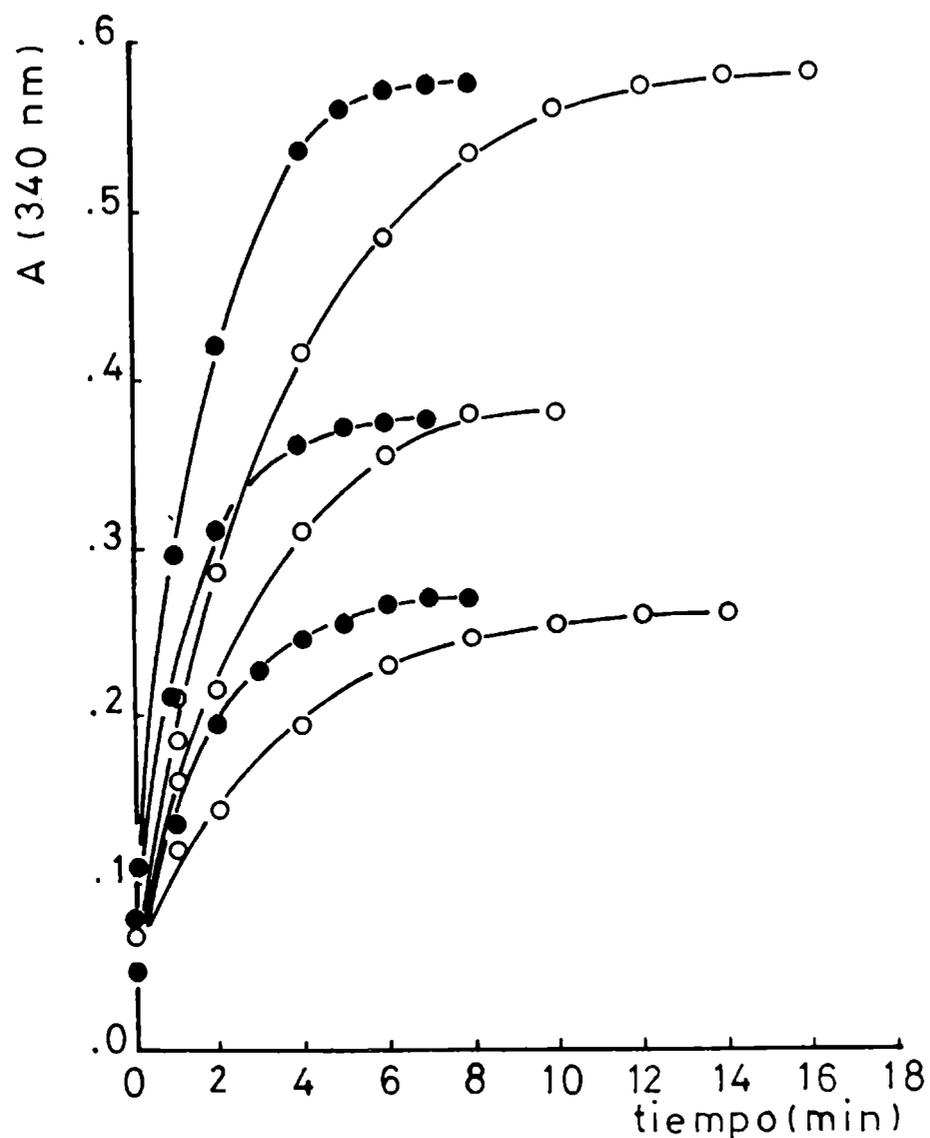


Figura 15: Curvas de $A_{340 \text{ nm}}$ en función del tiempo, para determinaciones enzimáticas de formiato realizadas sobre patrones preparados en leche y desproteinizados con TCA (●) o con HClO_4 (○). Las concentraciones de formiato fueron $115 \mu\text{M}$ (HClO_4) y $107 \mu\text{M}$ (TCA) para las curvas superiores, $58 \mu\text{M}$ (HClO_4) y $59 \mu\text{M}$ (TCA) para las curvas medias, y $50 \mu\text{M}$ (HClO_4) y $48 \mu\text{M}$ (TCA) para las curvas inferiores.

Resulta claro que la desproteínización con TCA da lugar a reacciones más rápidas que con HClO_4 ya que se obtuvieron disminuciones de 3 a 7 minutos en los tiempos necesarios para llegar a A_m .

Cuando se graficaron las velocidades iniciales de reacción (V_i) en función de los correspondientes valores de A_m se constató que la relación entre estas dos variables era lineal, tal como se puede observar en la figura 16.

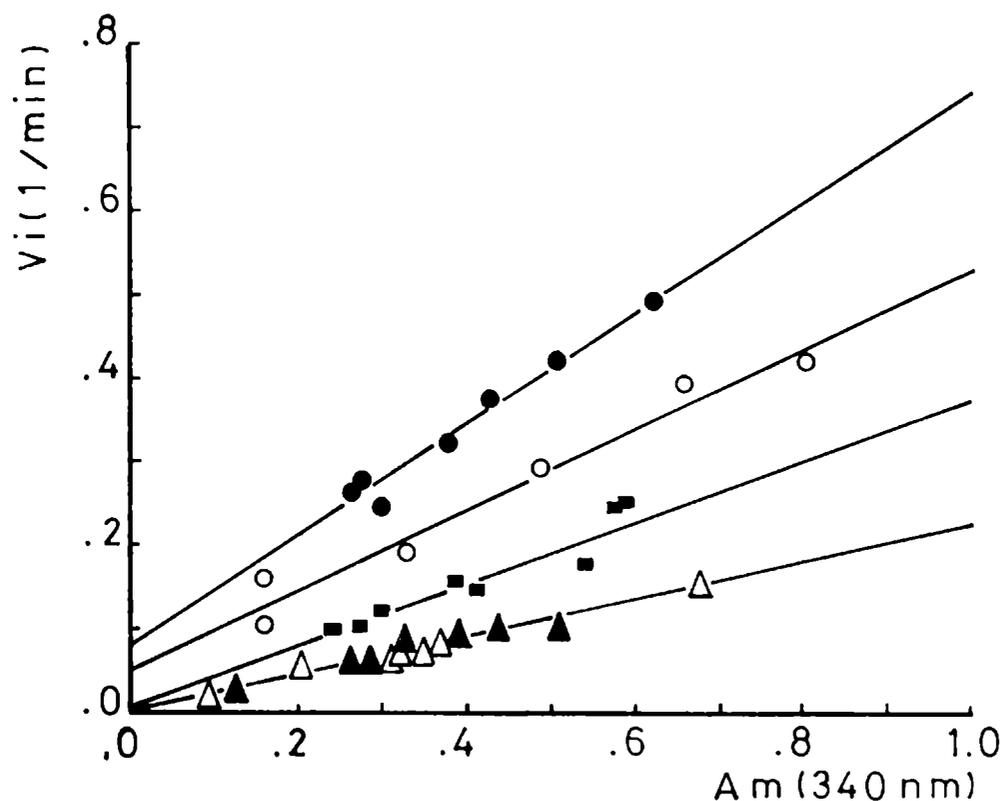


Figura 16: Velocidades iniciales de reacción en función de A_m (340nm) para determinaciones enzimáticas de formiato realizadas con patrones preparados en agua (●), medio 1.1.1 sin desproteínizar (○), leche (desproteínizados con TCA) (■), leche (desproteínizados con HClO_4) (▲) y medio 1.1.1 (desproteínizados con HClO_4) (△).

El análisis de la figura que antecede confirma la mayor velocidad de las reacciones utilizando muestras desproteinizadas con TCA comparadas con las tratadas con HClO_4 . Nótese además que no se observaron diferencias entre las velocidades correspondientes a patrones preparados en leche o en medio 1.1.1 cuando se desproteinizaron con HClO_4 .

Otro aspecto interesante de la figura 16, es que los patrones no desproteinizados presentan las mayores velocidades de reacción. Estos hechos están de acuerdo con lo referido en la bibliografía (Hopner and Knappe, 1974) acerca de ciertas sustancias que afectan la actividad de la formiato deshidrogenasa. En general se trata de sales, pero otros compuestos presentes en los medios utilizados también podrían tener influencia.

Las curvas de calibración para muestras desproteinizadas se muestran a continuación:

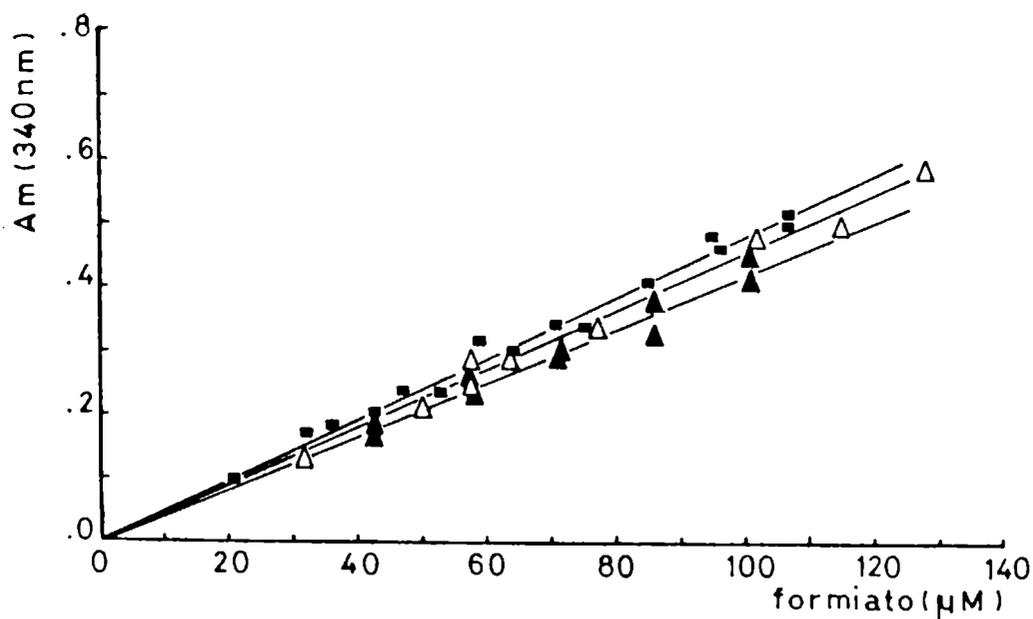


Figura 17: Curvas de calibración para la determinación enzimática de formiato en muestras desproteinizadas. Referencias: muestras de leche tratadas con TCA 4,5% (■), muestras de leche tratadas con HClO_4 2% (△) y muestras de medio 1.1.1 tratadas con HClO_4 2% (▲).

Puede notarse una muy buena correlación lineal que se confirma al observar la tabla 7.

Tabla 7: Pendientes y coeficientes de correlación para las curvas de calibración de la determinación enzimática de formiato con patrones desproteinizados con TCA 4,5 % o HClO₄ 2 %.

	pendiente (x 10 ³)	DS (x 10 ³)	r	n
1.1.1-HClO ₄ ¹	4,18	0,34	0,978	10
leche-HClO ₄ ¹	4,60	0,22	0,987	14
leche-TCA ²	4,84	0,14	0,994	15

DS: desviación standard.

r: coeficiente de correlación.

n: número de puntos de la recta.

1: desproteinizado con HClO₄.

2: desproteinizado con TCA.

Las pendientes variaron entre $4,18 \times 10^{-3}$ y $4,84 \times 10^{-3}$, y los coeficientes de correlación entre 0,978 y 0,994. El análisis de varianza reveló, al igual que para las curvas correspondientes a patrones no desproteinizados, que se mejora significativamente la correlación ($P < 0,005$) si se consideran rectas diferentes en lugar de una sola con todos los puntos.

Ahora bien, habría que considerar la posibilidad de una pérdida de formiato durante la desproteización. Para dilucidar esta cuestión se efectuó la experiencia cuyos resultados se muestran a continuación (figura 18).

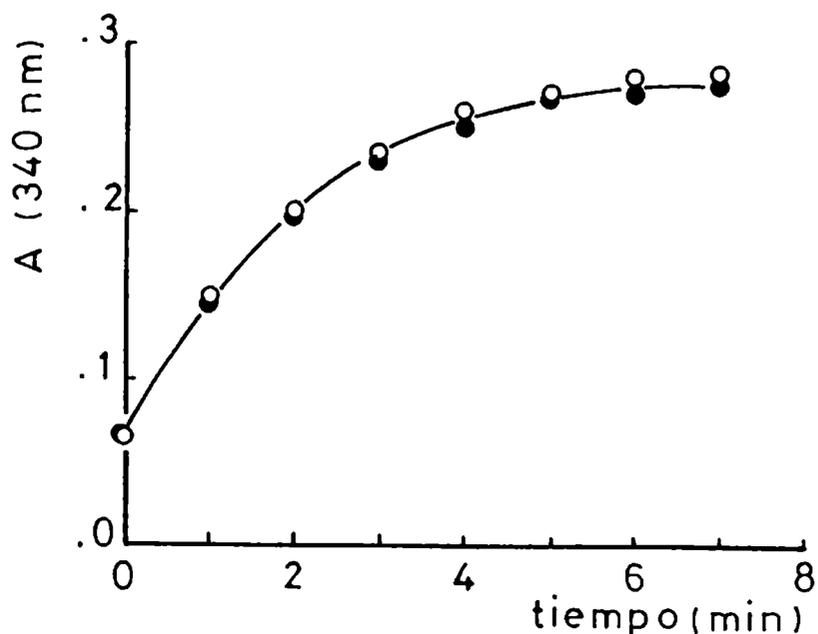


Figura 18: Influencia de la desproteínización en la recuperación de formiato. Uno de los ensayos (●) corresponde a un patrón de formiato preparado en leche y desproteínizado con HClO_4 2 %, el otro (○) corresponde a una muestra de la misma leche desproteínizada a la cual se agregó un patrón de formiato. En ambos casos la concentración de formiato fue $40 \mu\text{M}$.

Evidentemente durante la desproteínización con HClO_4 no hay pérdida de formiato y como la curva de calibración efectuada con patrones desproteínizados con TCA no difirió significativamente de la correspondiente a patrones desproteínizados con HClO_4 (figura 17), es razonable suponer que tampoco se pierde formiato al desproteínizar con TCA.

Los resultados expuestos muestran que la desproteínización con

TCA constituye una notable mejora con respecto a la técnica original, que utiliza HClO_4 , ya que se obtienen mayores velocidades de reacción. De acuerdo con esto, se utilizó TCA para la desproteinización de los cultivos de *S. thermophilus* efectuados en leche. Con respecto a los cultivos en medio 1.1.1, y considerando también los resultados de los ensayos efectuados, no fueron desproteinizados.

Determinación de ácido láctico.

Según los autores que desarrollaron este método colorimétrico (Barker and Summerson, 1941), algunas sustancias interferentes no son eliminadas por el tratamiento con $\text{CuSO}_4 / \text{Ca}(\text{OH})_2$. De estas sustancias, la que podría influir en mayor medida en nuestro sistema es el acetaldehído, ya que produce en igual concentración ($\mu\text{g/ml}$), una intensidad de color que es el doble que la correspondiente al lactato. Sin embargo, la concentración de acetaldehído en cultivos de *S. thermophilus* es lo suficientemente baja (1 a 8,3 $\mu\text{g/ml}$) (Tamime and Deeth, 1980) como para ser eliminada simplemente por dilución. Nótese que si consideramos una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ de esta sustancia en un cultivo, al cabo del tratamiento con $\text{CuSO}_4 / \text{Ca}(\text{OH})_2$ se diluirá cien veces, con lo que quedarán sólo 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Esta cantidad de acetaldehído produciría una intensidad de color equivalente a 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de lactato, que es demasiado baja para ser detectada pues los límites del método van desde 5 hasta 10 $\mu\text{g/ml}$ en la solución que queda luego del tratamiento cupro-cálcico.

En la figura 19 se muestra una curva de calibración obtenida para la determinación colorimétrica de lactato según el método de Barker y Summerson.

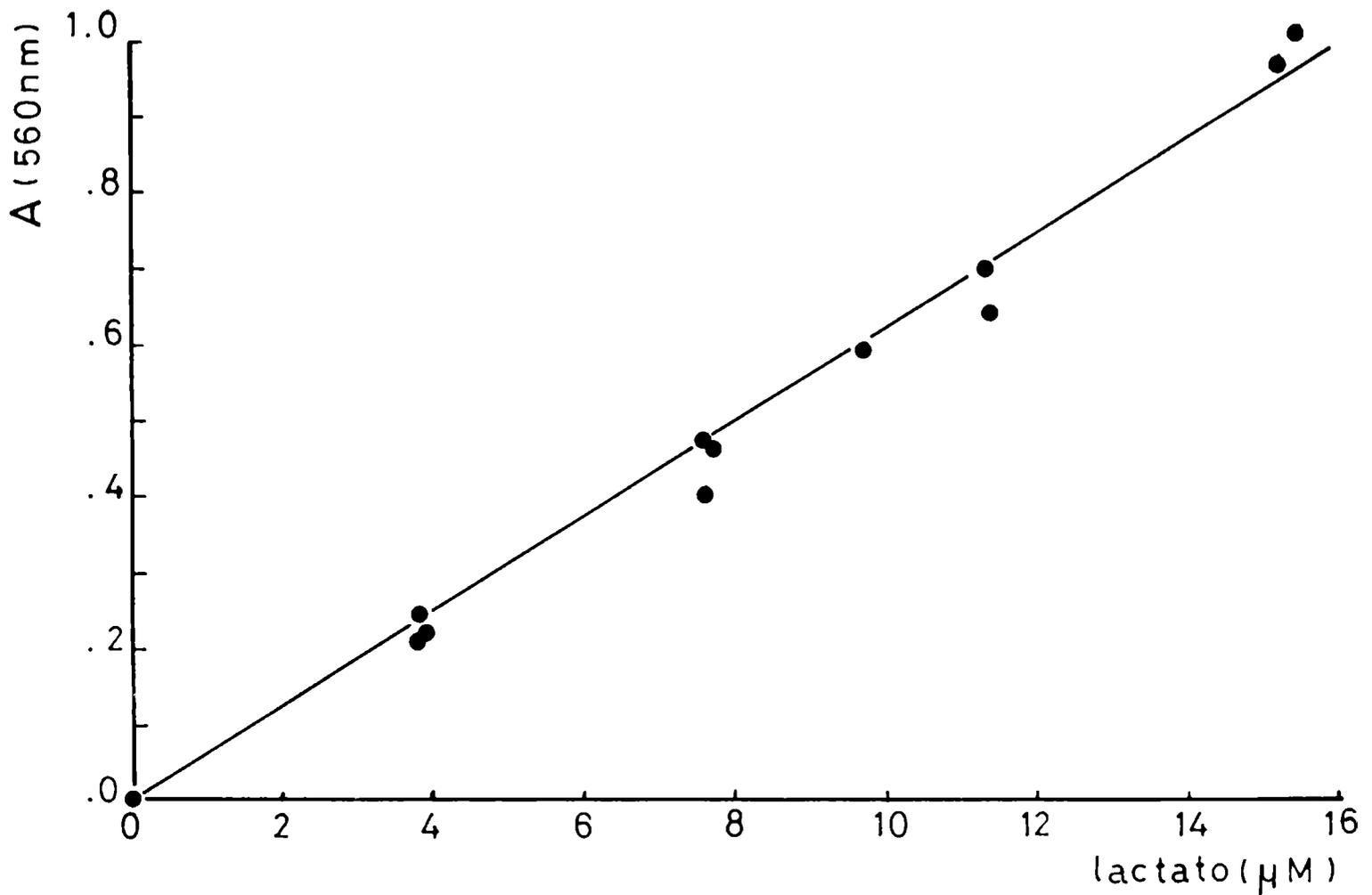


Figura 19: Curva de calibración para la determinación colorimétrica de lactato.

El coeficiente de correlación de esta curva de calibración es 0,954 ($n= 12$) y la pendiente 0,062. El rango de concentraciones en el que se observa una respuesta lineal es adecuado para efectuar determinaciones en cultivos de *S. thermophilus*.

Producción de formiato y lactato en diferentes cepas de *S. thermophilus*.

Una vez puestas a punto las técnicas analíticas, se procedió al estudio de la producción de formiato y lactato en cultivos de *S. thermophilus* efectuados en medio 1.1.1 y en leche entera suplementada. Se utilizó leche esterilizada por el proceso UAT debido a que la leche en polvo reconstituida y esterilizada por tyndalización posee niveles muy altos de formiato debido al tratamiento térmico (Wood and Gest, 1957).

La figura 20 muestra los niveles de formiato alcanzados por cultivos de 16 horas de diferentes cepas de *S. thermophilus*.

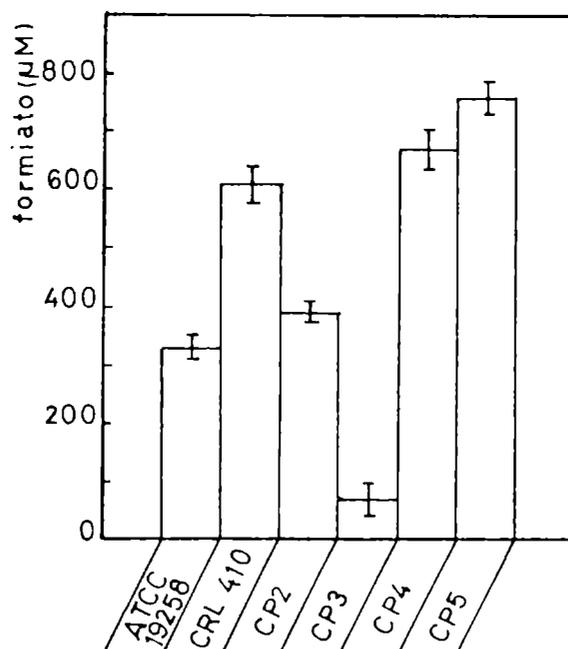


Figura 20: Niveles de formiato alcanzados por diferentes cepas de *S. thermophilus* incubadas a 42°C durante 16 hs en leche UAT suplementada con 0,1 % de extracto de levadura. Los resultados son promedios de 3 ó 4 cultivos. Los segmentos representan la desviación standard.

Cabe mencionar que el agregado de extracto de levadura a la leche respondió a la necesidad de uniformar los crecimientos, ya que en este medio, la cepa ATCC 19258 no desarrolla tan rápidamente como las demás cepas estudiadas.

Puede observarse (figura 20) que los mayores niveles de formiato fueron alcanzados por las cepas CP5 (758 μM) y CP4 (672 μM) mientras que el menor correspondió a la cepa CP3 (73 μM).

En este punto cabría preguntarse si los diferentes niveles de formiato producidos se pueden correlacionar con variaciones en la producción de lactato, ya que podríamos pensar que existe alguna relación entre las producciones de estos dos ácidos. Para responder a esta cuestión, se efectuaron determinaciones de lactato en muestras de los mismos cultivos en los que se había determinado formiato.

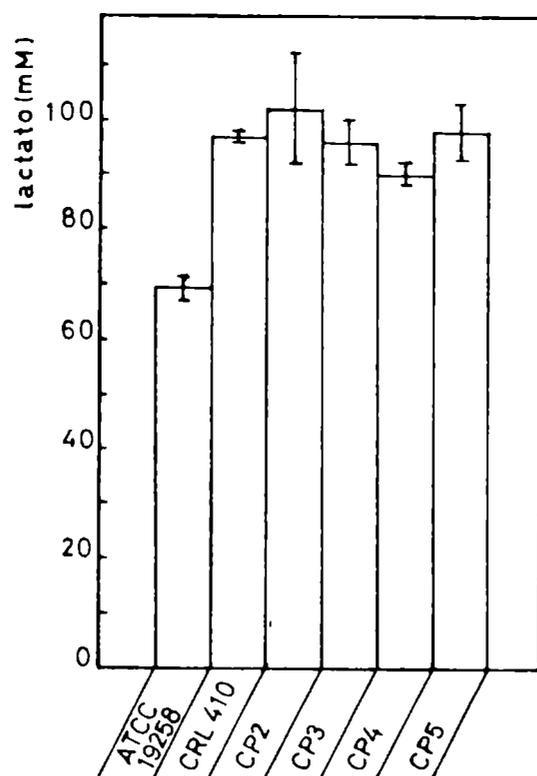


Figura 21: Niveles de lactato alcanzados por diferentes cepas de *S. thermophilus* incubadas a 42° C durante 16 hs en (continúa)

leche UAT suplementada con 0,1 % de extracto de levadura. Los resultados son promedios de 3 ó 4 cultivos. Los segmentos representan la desviación standard.

La observación de la figura 21 pone de manifiesto que el patrón de producción de lactato es diferente al de formiato. Los niveles de lactato alcanzados fueron similares en todas las cepas (entre 90 y 100 mM) y sólo se obtuvo un valor significativamente menor ($P < 0,01$) con la cepa ATCC 19258 (69 mM).

Corresponde aclarar que los recuentos de bacterias iniciales variaron entre $1,5 \times 10^7$ y $2,9 \times 10^7$ UFC/ml y que los valores finales oscilaron entre $5,1 \times 10^8$ y $9,8 \times 10^8$ UFC/ml por lo cual las diferencias entre los valores de formiato y lactato encontrados en los cultivos de las cepas estudiadas, no pueden ser atribuidas a diferencias en el número de bacterias.

La tabla 8 confirma lo antedicho:

Tabla 8: Rendimientos de formiato y lactato para diferentes cepas de *S. thermophilus* crecidas durante 16 hs a 42°C en leche UAT suplementada con 0,1 % de extracto de levadura.

Cepa	Rendimiento	
	formiato ($\mu\text{moles/UFC}$) $\times 10^{10}$	lactato (mmoles/UFC) $\times 10^{11}$
ATCC 19258	3,4 ^a \pm 0,4	7,1 ^b \pm 1,0
CRL 410	9,8 ^{a,b} \pm 2,1	15,6 ^{a,b} \pm 3,3
CP2	6,7 ^{b,c} \pm 2,8	17,4 ^a \pm 7,6
CP3	1,5 ^d \pm 0,5	19,9 ^a \pm 4,8
CP4	8,7 ^{a,b} \pm 0,4	11,6 ^{a,b} \pm 0,7
CP5	11,5 ^a \pm 4,1	13,4 ^{a,b} \pm 5,0

Los valores son promedios de 3 ó 4 cultivos \pm desviación standard. Valores con diferentes supraíndices difieren significativamente ($P < 0,01$).

Los rendimientos de formiato variaron de acuerdo con la cepa (tabla 8). Los mayores valores se obtuvieron con las cepas CP5, CP4 y CRL 410 y fueron del orden de 1×10^{-9} μmoles por UFC. Los rendimientos de lactato fueron mucho mayores que los de formiato. La cepa ATCC 19258 presentó el menor valor ($7,1 \times 10^{-11}$ mmoles de lactato/UFC) y la cepa CP3 el mayor ($19,9 \times 10^{-11}$ mmoles de lactato/UFC). Es destacable el hecho que la cepa CP3, que presentó la menor cantidad de moléculas de formiato/UFC, mostró rendimientos de lactato tan altos como las otras cepas.

Si observamos las relaciones fórmico/ láctico (tabla 9), vemos que las mayores relaciones se obtuvieron con las cepas CP4 y CP5

que presentaron valores de $7,5 \times 10^{-3}$ y $7,7 \times 10^{-3}$ respectivamente, siguiéndoles las cepas CRL 410, ATCC 19258, CP2 y CP3 en este orden. Es importante puntualizar que se produjeron cantidades de lactato del orden de 10^2 (y aún 10^3) veces superiores que de formiato (tablas 3 y 4) lo cual no es extraño, dado el carácter "homofermentativo" de *S. thermophilus*.

Tabla 9: Relaciones fórmico/láctico (\pm desviación standard) para diferentes cepas de *S. thermophilus* incubadas durante 16 hs a 42°C en leche UAT suplementada con 0,1 % de extracto de levadura.

Cepa	Relación fórmico/láctico ($\times 10^3$)
ATCC 19258	$4,8^c \pm 0,2$
CRL 410	$6,3^b \pm 0,3$
CP2	$3,8^d \pm 0,5$
CP3	$0,8^e \pm 0,3$
CP4	$7,5^a \pm 0,5$
CP5	$7,7^a \pm 0,3$

Los valores representan el promedio de 3 ó 4 cultivos \pm desviación standard.

Valores con diferentes supraíndices difieren significativamente ($P < 0,01$).

El análisis de los resultados expuestos revela que los niveles de formiato y lactato, así como también las relaciones fórmico/láctico, que se alcanzan en leche suplementada a 42°C al cabo de 16 hs de incubación, dependen de la cepa. Corresponde preguntarse aquí cuál será la influencia de la composición del medio y de la temperatura.

Efecto del medio de cultivo y la temperatura sobre la producción de formiato y lactato.

El crecimiento y el metabolismo de los microorganismos está notablemente influenciado por la composición del medio de cultivo así como también por las condiciones de incubación. Teniendo en cuenta lo antedicho se efectuaron estudios de la producción de formiato y lactato en leche y en medio 1.1.1 con tres cepas de *S. thermophilus*: ATCC 19258, CRL 410 y CP4. Los cultivos se realizaron a dos temperaturas: 37° y 42°C.

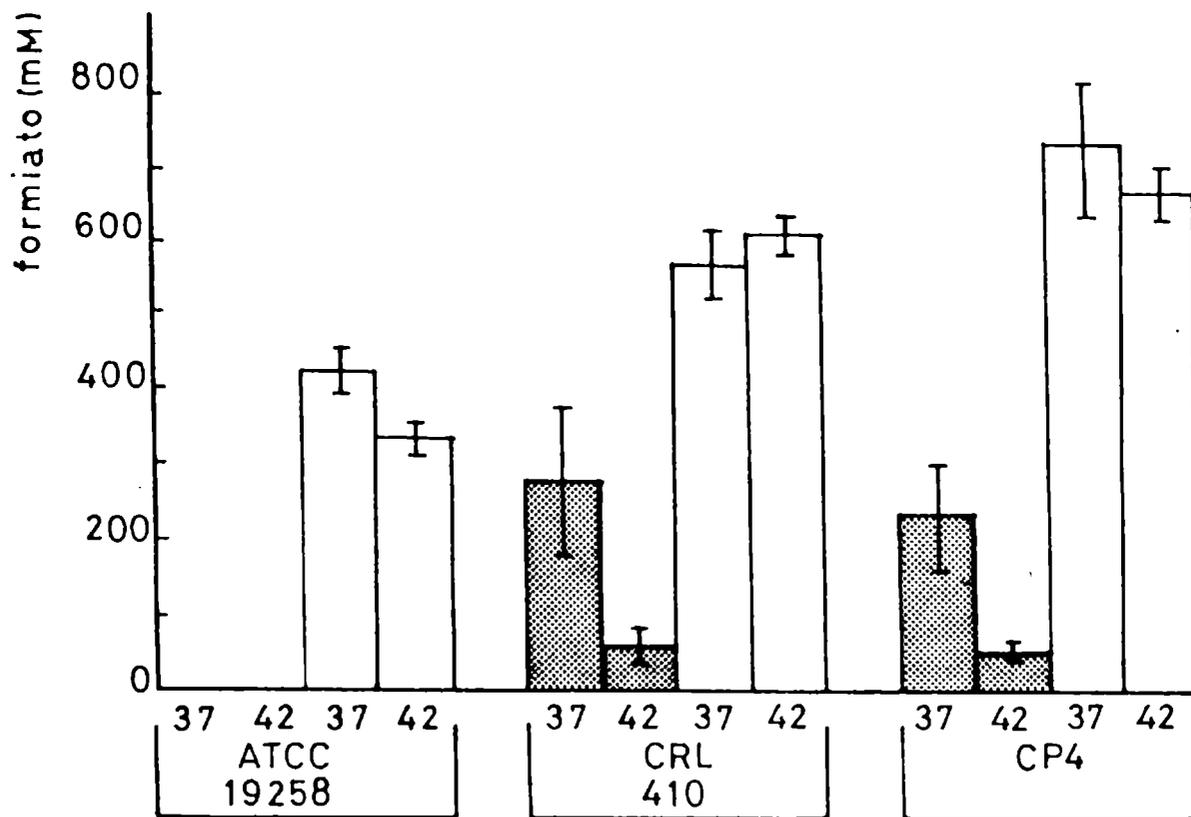


Figura 22: Niveles de formiato alcanzados al cabo de 16 hs a 37°C y 42°C, en medio 1.1.1 y leche suplementada, para diferentes cepas de *S. thermophilus*. Referencias: leche , medio 1.1.1 . Los valores representan promedios de 4 ó 7 cultivos y las barras representan la desviación standard.

Las tres cepas producen más formiato en leche que en medio 1.1.1. En este último, los niveles fueron más altos a 37° que a 42°C mientras que en leche las diferencias no fueron significativas ($P < 0,01$).

La cepa ATCC 19258 presentó la menor producción en todas las condiciones ensayadas, más aún, no se detectó formiato en medio 1.1.1 a ninguna de las temperaturas estudiadas. Sin embargo, en leche, esta cepa produjo concentraciones del orden de 400 μM .

Estos resultados ponen de manifiesto una marcada influencia del medio y la temperatura sobre la producción de formiato. Esto podría deberse a que alguna sustancia necesaria para la acción de la enzima que cataliza la producción de formiato (piruvato formiato-liasa), estaría presente o se generaría en leche suplementada pero no en medio 1.1.1. También podría pensarse que en este medio se produce alguna sustancia que inhibe a dicha enzima (tal como los fosfatos de triosas) o que suprime su síntesis (Takahashi y col., 1982).

Con respecto a la producción de lactato (figura 23), los mayores niveles se obtuvieron en leche suplementada a 42°C y fueron máximos para la cepa CRL 410 que alcanzó concentraciones de 97 mM. En medio 1.1.1, la cepa que dio mayor cantidad de lactato fue la ATCC 19258 a 42°C (24,9 mM). Resulta muy interesante el hecho que esta cepa no produjo formiato en este medio, lo que fue discutido anteriormente (figura 22).

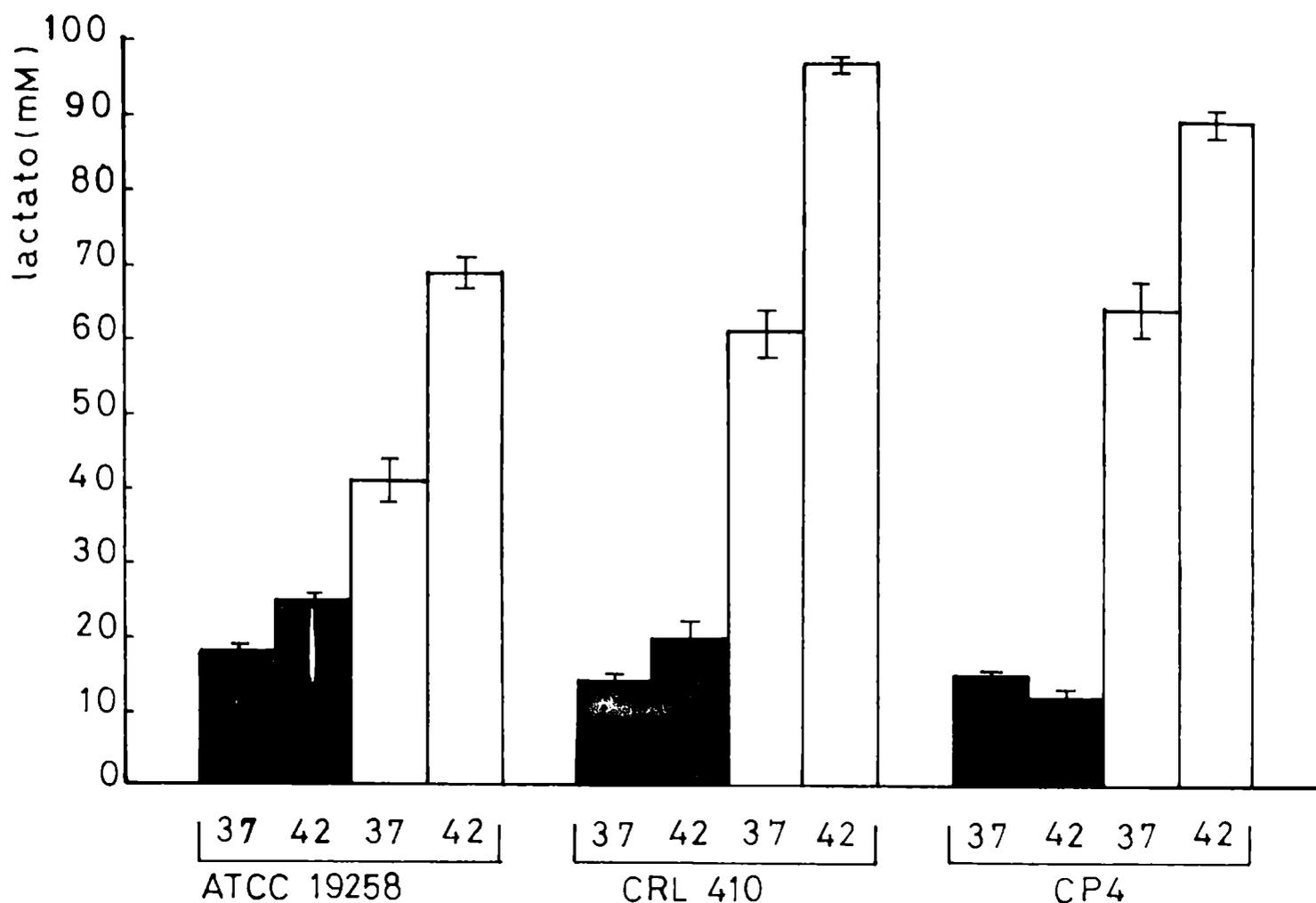


Figura 23: Niveles de lactato alcanzados al cabo de 16 hs a 37°C en medio 1.1.1 y leche suplementada, para diferentes cepas de *S. thermophilus*. Referencias: leche y medio 1.1.1 . Los valores representan promedios de 4 ó 7 cultivos y las barras representan la desviación standard.

Si analizamos las relaciones fórmico/láctico (tabla 10), podemos notar que también dependen del medio, la cepa y la temperatura, registrándose los mayores valores para las cepas CRL 410 y CP4 en medio 1.1.1 a 37°C con valores de 17×10^{-3} y $14,2 \times 10^{-3}$ respectivamente.

Tabla 10: Relaciones fórmico/láctico halladas en cultivos de 16 hs de *S. thermophilus* en leche suplementada y medio 1.1.1 a 37° y 42° C.

Relación fórmico/láctico ($\times 10^3$) ^{1.2}				
cepa	medio 1.1.1		leche	
	37	42	37	42
ATCC 19258	0,0 \pm 0,0 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	10,5 \pm 0,9 ^e	4,8 \pm 0,2 ^{bc}
CRL 410	17,0 \pm 1,8 ^a	3,4 \pm 1,1 ^b	9,2 \pm 0,9 ^d	6,3 \pm 0,3 ^{cd}
CP4	14,2 \pm 0,9 ^a	3,0 \pm 0,7 ^b	11,1 \pm 2,1 ^e	7,5 \pm 0,5 ^d

1: Los valores representan el promedio de 4 ó 5 cultivos \pm desviación standard.

2: Promedios con distintos supraíndices difieren significativamente ($P < 0,01$).

En general, las relaciones fórmico/láctico aumentaron de 1,5 a 5 veces al pasar de 42° a 37°C (tabla 10). Si observamos las figuras 22 y 23, notaremos que este aumento, en medio 1.1.1, puede ser atribuido a los niveles de formiato ya que la variación en la concentración de lactato es pequeña para la cepa CRL 410 y no significativa para la cepa CP4. En leche, por el contrario, las mayores variaciones con la temperatura se producen en los niveles de lactato que se ven notablemente incrementados al pasar de 37° a 42°C y esto daría cuenta de la disminución de la relación fórmico/láctico al aumentar la temperatura.

Los resultados expuestos en las figuras 22 y 23, y en la tabla 10, podrían ser explicados si se supone que en medio 1.1.1 la actividad de la lactato deshidrogenasa no se modifica en gran medi-

da, y la de la piruvato formiato-liasa disminuye al pasar de 37° a 42°C. En leche por el contrario, sería la actividad de la piruvato formiato-liasa la que no sufriría mayores cambios y aumentaría la actividad de la lactato deshidrogenasa ante la misma variación de la temperatura. Esto es lógico si se tiene en cuenta que las composiciones de los medios intracelular y extracelular están relacionadas y que el rango de temperaturas óptimas para las reacciones enzimáticas depende del entorno en el cual se verifica la misma (Laidler and Bunting, 1973). Habría que tener en cuenta asimismo, que las diferentes cepas podrían poseer enzimas con diferentes rangos de temperaturas óptimas o que se vean afectadas de distinta manera por el entorno. La siguiente figura ilustra las consideraciones efectuadas.

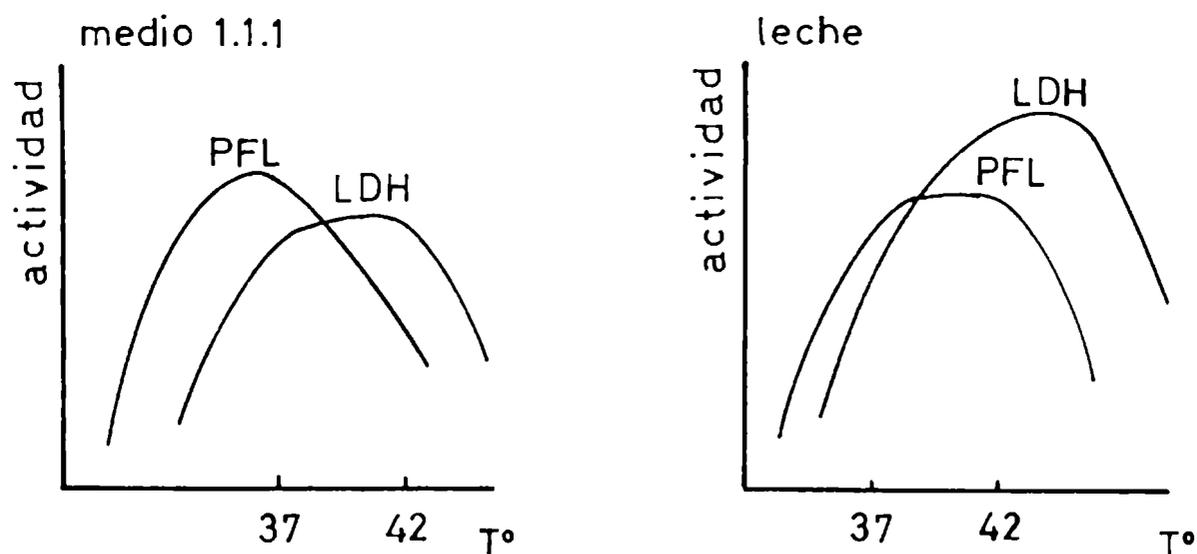


Figura 24: Posible explicación de los niveles de formiato y lactato hallados en medio 1.1.1 y leche suplementada a 37° y 42°C.

Corresponde mencionar aquí, que los niveles de lactato obtenidos en cultivos de *S. thermophilus* CP4 realizados en leche entera sin el agregado de extracto de levadura, fueron similares a los alcanzados en leche suplementada lo cual contrasta con lo hallado para el formiato ya que, la misma cepa, produjo cantidades mucho mayores en leche suplementada que en leche sin suplementar, confirmándose la notable influencia de la composición del medio sobre las vías metabólicas conducentes a lactato y formiato.

El estudio de los rendimientos de formiato y lactato por UFC contribuirá a interpretar los resultados obtenidos en la presente sección.

Rendimientos y cinéticas de producción de formiato y lactato.

Para analizar los rendimientos por UFC es preciso conocer las cinéticas de crecimiento en los medios utilizados. A continuación se muestra un estudio comparativo realizado en *S. thermophilus* CP4:

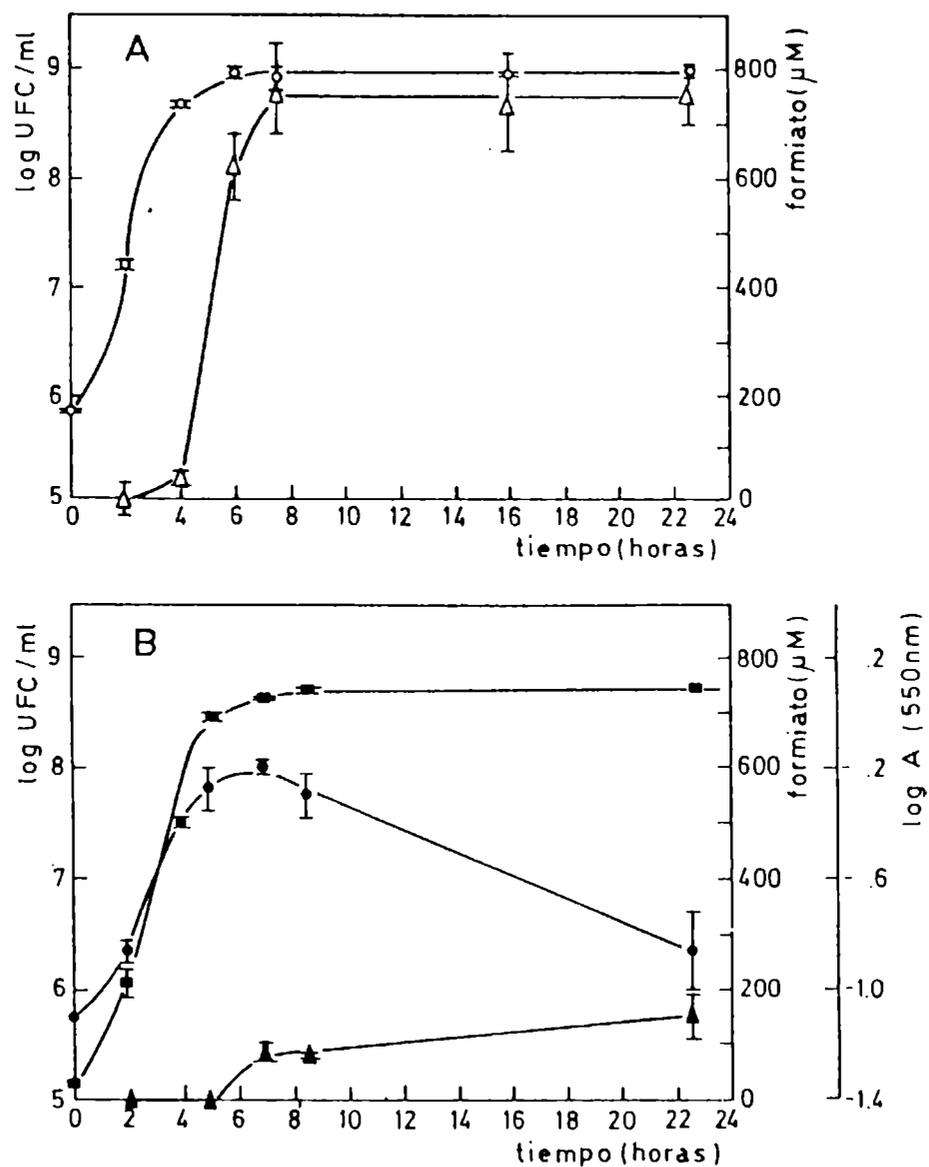


Figura 25: Cinéticas de crecimiento y de producción de formiato en *S. thermophilus* CP4 en leche suplementada (A) y medio 1.1.1 (B) a 37°C. Las barras representan la desviación standard. Símbolos: (o, ●) log UFC/ml; (Δ , \blacktriangle) formiato y (\blacksquare) log absorbancia a 550 nm.

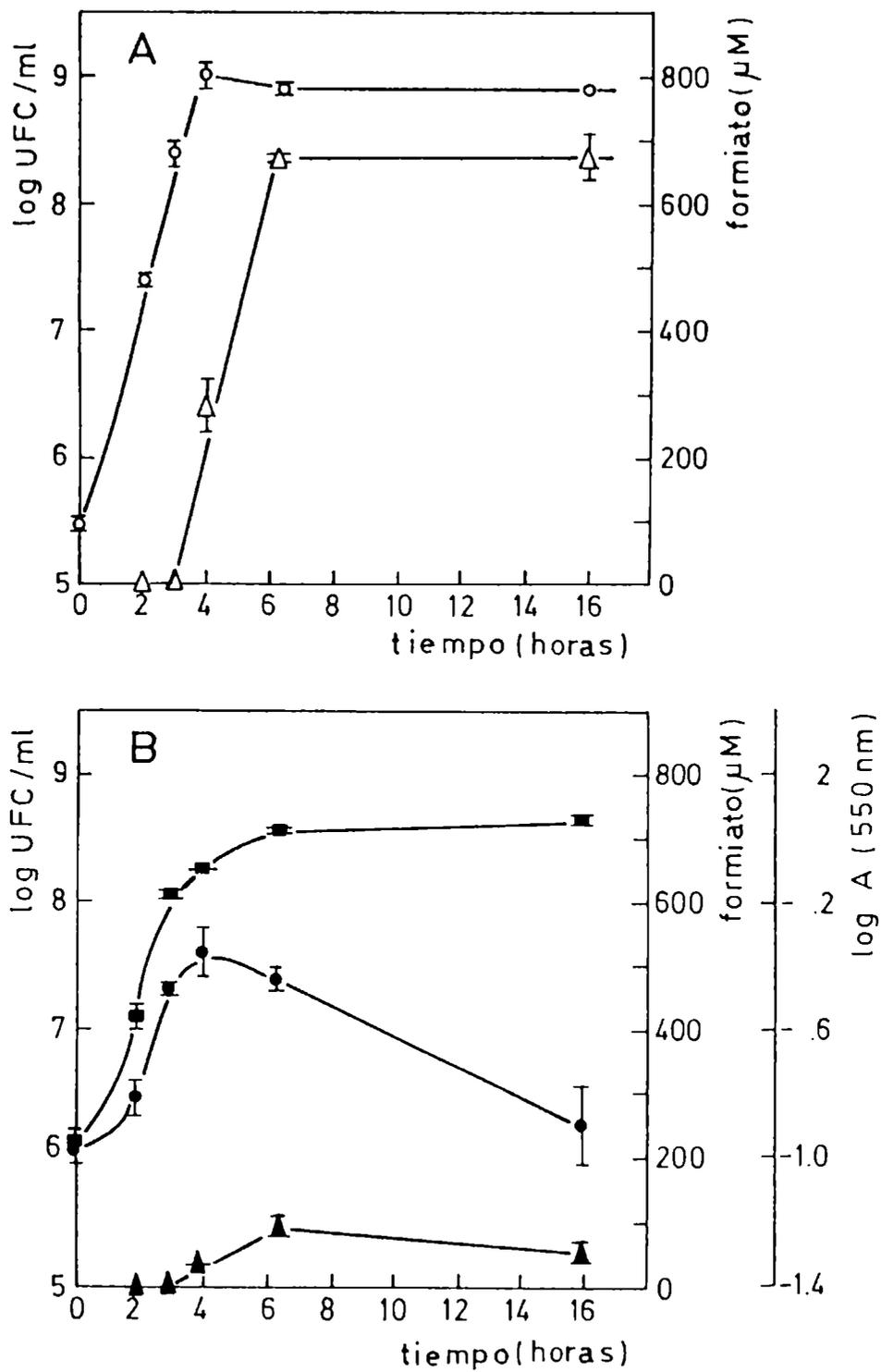


Figura 26: Cinéticas de crecimiento y de producción de formiato en *S. thermophilus* CP4 en leche suplementada (A) y medio 1.1.1 (B) a 42°C. Las barras representan la desviación standard. Símbolos: (○, ●) log UFC/ml; (Δ, ▲) formiato y (■) log absorbancia a 550 nm.

Las figuras 25 A y 26 A muestran que en leche, se alcanza la fase estacionaria luego de 7 hs a 37° y 4 hs a 42°C, y el número de bacterias viables permanece constante durante las próximas 10-12 hs. Sin embargo, en medio 1.1.1 (figuras 25 B y 26 B) la fase estacionaria comienza luego de 4 a 6 hs a partir de la inoculación y luego se observa una disminución en el número de UFC/ml. Esto significa que, luego de 16 hs los cultivos en medio 1.1.1 están en fase de muerte. El diferente comportamiento en estos medios fue analizado en el capítulo II.

Con respecto a los valores de formiato en medio 1.1.1: estos alcanzan un máximo a las 6 hs y luego se mantienen constantes hasta las 16 hs, independientemente de la viabilidad de los microorganismos.

A 37°C, el incremento máximo de formiato para la cepa CP4 fue de 750 μM al cabo de 8 hs de incubación en leche suplementada y 88 μM en medio 1.1.1. El comportamiento de los cultivos a 42°C fue similar: 672 μM en leche suplementada y 95 μM en medio 1.1.1.

Los micromoles de formiato/UFC se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 11: Micromoles de formiato por UFC^{1,2} en diferentes momentos del desarrollo de *S. thermophilus* CP4 en medio 1.1.1 y leche suplementada a 37°C y 42°C.

Micromoles de formiato/UFC (x 10 ¹⁰)				
t(hs:min)	medio 1.1.1		leche	
	37°C	42°C	37°C	42°C
0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
3	-	0 ± 0	-	0 ± 0
4	-	11,5 ± 6,4	0,7 ± 0,3	2.8 ± 0,4
5	0 ± 0	-	-	-
6	-	-	6,9 ± 0,2	-
6:20	-	37,2 ± 15,6	-	8.7 ± 0,6
7	9,0 ± 0,1	-	-	-
7:40	-	-	9,0 ± 2,8	-
8:35	14,6 ± 5,8	-	-	-
16	258,0 ± 111	400,0 ± 300	8,6 ± 1,1	8,6 ± 0,4
22:40	872,0 ± 812	-	-	-
23:50	-	-	7,6 ± 1,4	-

1: Los valores representan promedios de dos experimentos ± desviación standard.

2: En los casos en que no se detectó formiato los rendimientos se consideraron igual a cero.

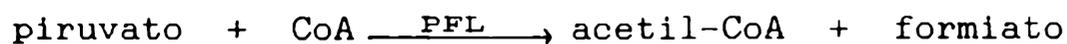
Para cultivos en leche suplementada a 37°C y 42°C, los micromoles de formiato/UFC alcanzan valores próximos a 9×10^{-10} y luego se mantienen constantes. Por el contrario, en medio 1.1.1, esta relación aumenta constantemente a causa de la muerte celular que hace que disminuya el número de UFC/ml.

Si se toman los rendimientos en el valor máximo de UFC/ml, no se obtienen diferencias entre los dos medios ensayados a ambas temperaturas y, por consiguiente, las altas concentraciones de formiato en leche pueden ser atribuidas al mayor número de células.

Audet y colaboradores (Audet y col., 1989) demostraron que en un medio a base de ultrafiltrado de suero incubado con agitación, se alcanzan valores de 10^{10} UFC/ml y niveles de formiato alrededor de 12 veces mayores que los correspondientes al presente trabajo. Puede advertirse que, en este caso, los rendimientos obtenidos fueron aproximadamente de 11×10^{-10} micromoles/UFC, siendo este valor muy similar al obtenido por nosotros en leche suplementada y medio 1.1.1 (tabla 11) con *S. thermophilus* CP4.

Con respecto a las cinéticas de crecimiento y de producción de formiato, podemos decir que el período de latencia para el desarrollo es tres veces menor que para la producción de formiato y que este metabolito comienza a detectarse cuando el cultivo está en fase exponencial.

Para explicar los resultados obtenidos hasta el momento debe tenerse en cuenta la reacción que produce formiato a partir del piruvato:



Esta reacción puede ser utilizada para la generación de ATP vía acetil-CoA, síntesis de compuestos que requieran grupos acetilo y/o fragmentos de C1 (Mahler and Cordes, 1971; Thauer y col., 1972) y por lo tanto una posible causa de variación en la produc-

ción de formiato podría ser el requerimiento de grupos acetilo o fragmentos de C1 para la síntesis que podrían variar de un medio a otro o en diferentes etapas del desarrollo en el mismo medio. Asimismo debe considerarse que los niveles de formiato detectados en distintas condiciones pueden depender también del grado de liberación de este metabolito al medio de cultivo.

En cuanto a la producción de lactato, puede apreciarse en la figura 27, que la misma comienza en etapas tempranas del crecimiento y que, en leche suplementada, los valores son mucho mayores que en medio 1.1.1. Al igual que para el formiato esto puede ser atribuido al mayor número de células alcanzado en leche, ya que los rendimientos alcanzados en el máximo número de UFC/ml son muy similares ($1,5$ y $1,1 \times 10^{-10}$ mmoles/UFC para medio y leche respectivamente).

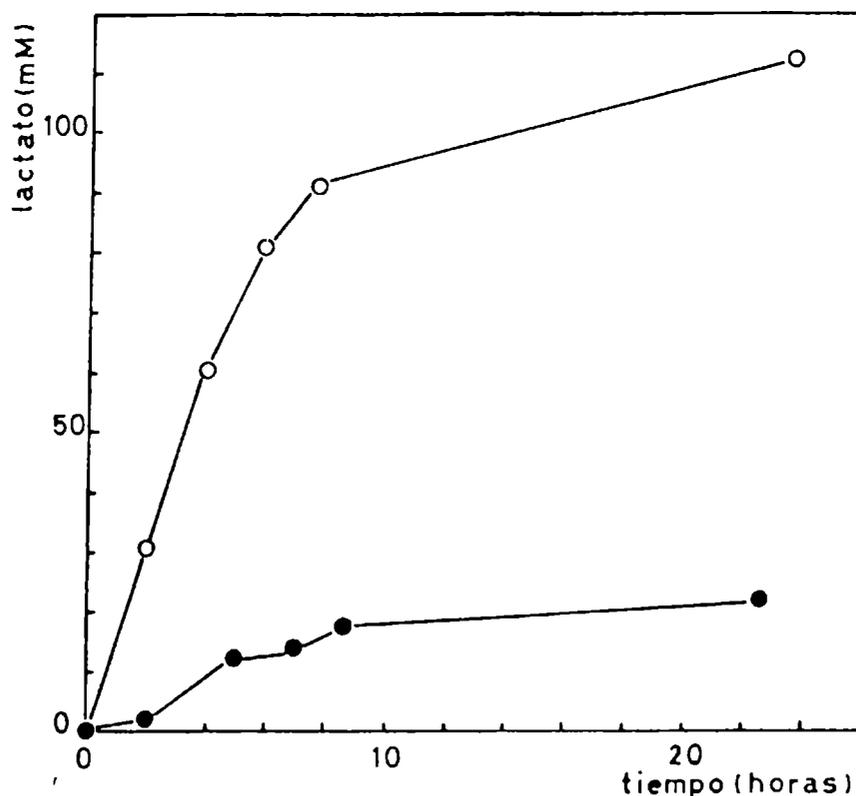


Figura 27: Cinéticas de producción de lactato en leche suplementada (o) y medio 1.1.1 (●) para *S. thermophilus* CP4.(37°C).

Influencia de la naturaleza y la concentración de azúcares sobre la producción de formiato y lactato.

La variación de la concentración de un sustrato trae aparejados cambios en la velocidad de crecimiento y/o en la cosecha máxima de los microorganismos (Brock, 1978). En el caso de *S. thermophilus*, cuyo crecimiento es dependiente de la presencia de algún azúcar fermentable, podría esperarse alguna diferencia en la cantidad de formiato o lactato en función de la naturaleza y la concentración del hidrato de carbono utilizado.

En el presente trabajo se ha estudiado la influencia de dos azúcares: lactosa y sacarosa. El primero es importante por ser el azúcar presente en leche y el segundo por ser utilizado como edulcorante en la fabricación de yogurt.

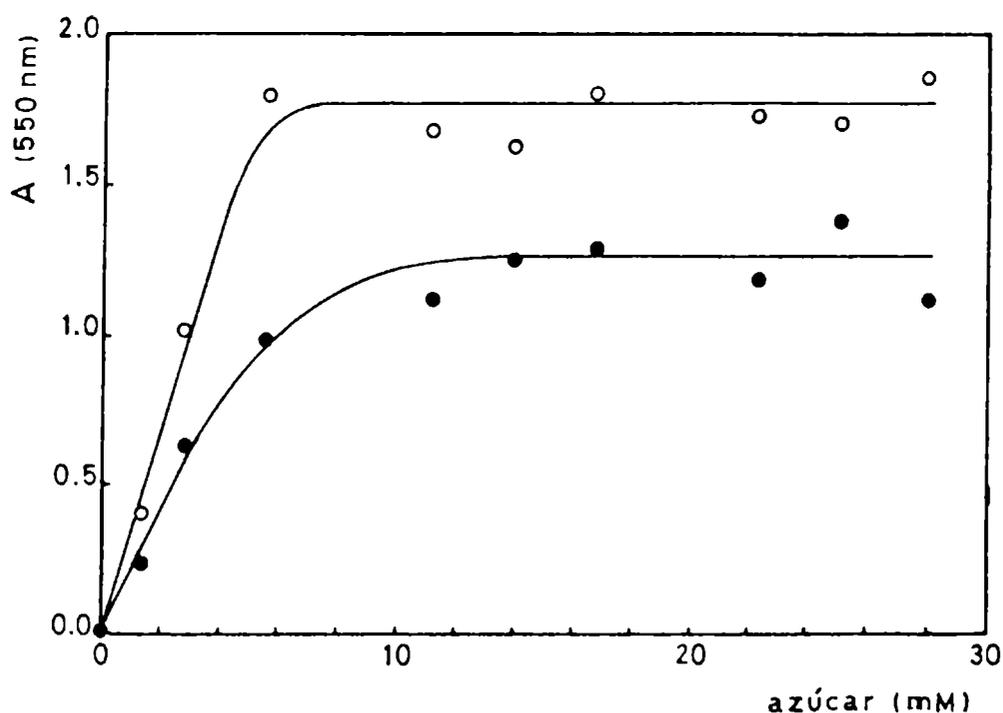


Figura 28: Cosecha máxima (absorbancia a 550 nm) al cabo de 16 hs de incubación a 37°C para *S. thermophilus* CP4 en medio base con lactosa (●) y sacarosa (○) en diferentes concentraciones iniciales.

La cosecha máxima, como era de esperar (figura 28), aumenta con la concentración de azúcar hasta un valor máximo que se mantiene constante. Este valor se alcanza a concentraciones más bajas con sacarosa (aproximadamente a 5,6 mM) que con lactosa (alrededor de 14 mM).

Con respecto a los niveles de formiato en medios con lactosa puede observarse (figura 29) que los mismos aumentan con la concentración del azúcar hasta alcanzar valores máximos (aproximadamente 450 μM) en medios con 10 a 14 mM de lactosa pero ulteriores aumentos hacen disminuir los valores finales de formiato obteniéndose niveles de 200 μM para medios con 28 mM de lactosa.

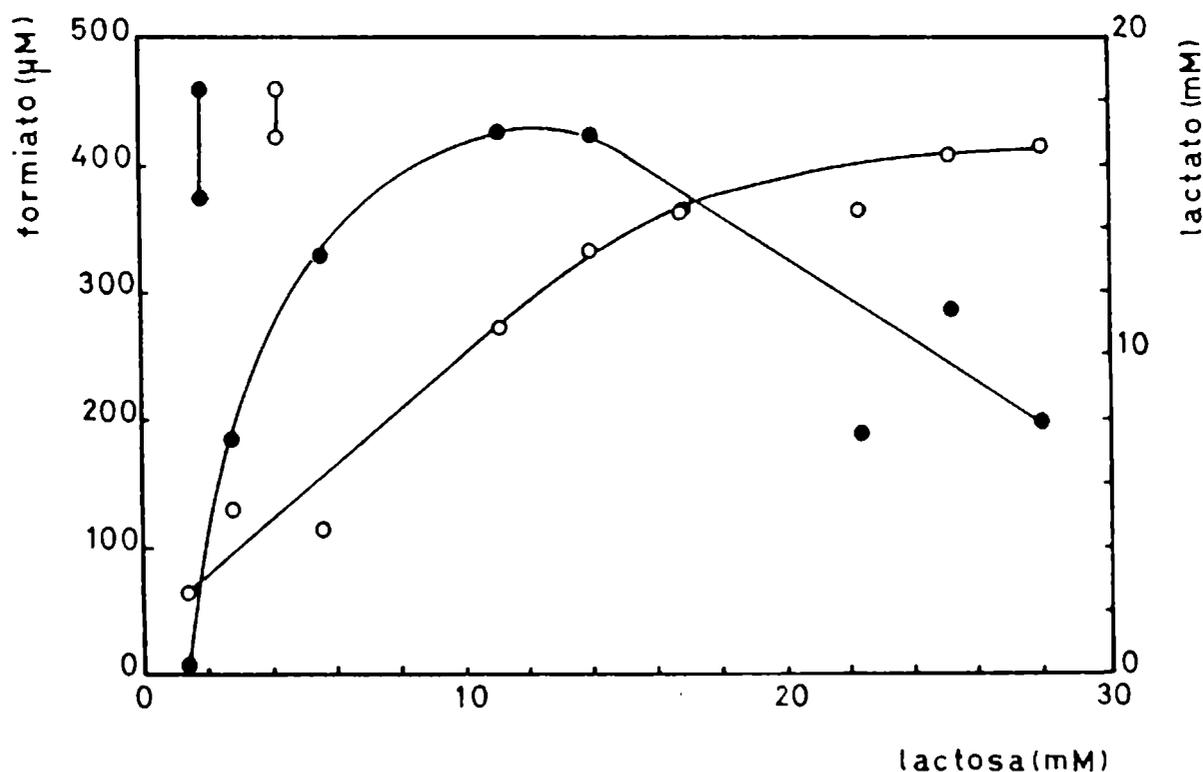


Figura 29: Concentraciones de formiato (●) y lactato (○) al cabo de 16 hs de incubación en medios con diferentes concentraciones iniciales de lactosa para *S. thermophilus* CP4. Las barras indican la desviación standard (37°C).

La concentración de lactato, por su parte, pasa de un valor de 2,5 mM para medios con lactosa 1,4 mM hasta 14,6 mM para medios con lactosa 16,8 mM y posteriores aumentos en la concentración producen muy poco cambio, ya que se obtienen valores de 16,3 y 16,6 mM en medios con 25,2 y 28 mM de azúcar respectivamente (figura 29).

Cuando se efectuaron estudios similares utilizando sacarosa en lugar de lactosa, los resultados fueron diferentes.

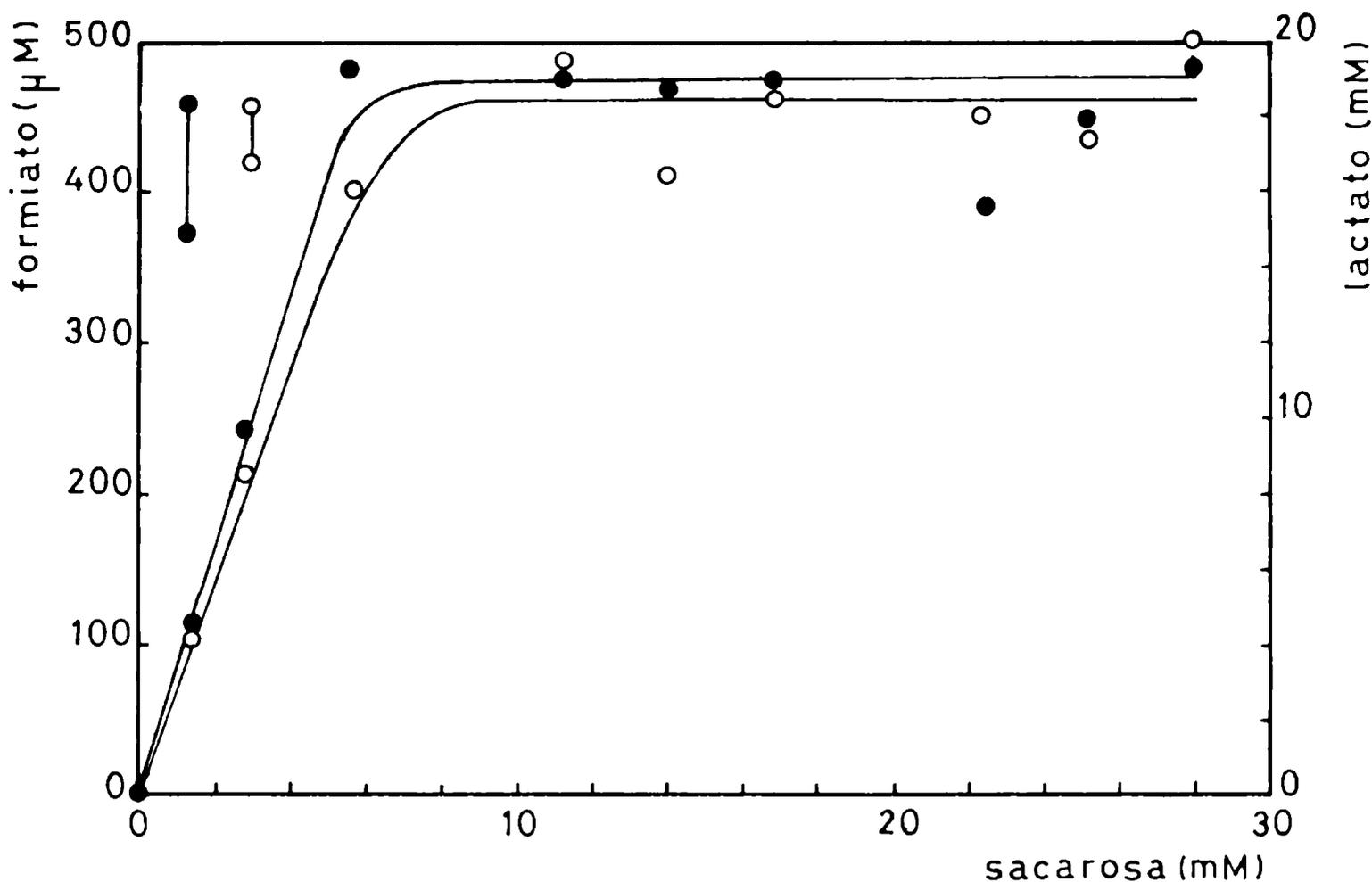


Figura 30: Concentraciones de formiato (●) y lactato (○) al cabo de 16 hs de incubación en medios con diferentes concentraciones iniciales de sacarosa para *S. thermophilus* CP4. Las barras indican la desviación standard.(37°C).

Los niveles de formiato (figura 30) aumentaron hasta alrededor de 480 μ M para medios con sacarosa 5,6 mM y posteriores aumentos de azúcar no produjeron variaciones significativas. Las concentraciones de lactato siguieron un patrón similar ya que se alcanzaron valores de alrededor de 19 mM que se mantuvieron constantes a partir de concentraciones de sacarosa del orden de 8 mM. Para comprender el porqué de estos resultados podríamos pensar que las síntesis de formiato y lactato estarían limitadas a bajas concentraciones de hidrato de carbono pero que irían aumentando conforme se eleve la cantidad del sustrato. A cierta concentración, se llegaría a un nivel máximo ya que no sería posible aumentar la síntesis indefinidamente y este valor debería mantenerse constante en un amplio rango de concentraciones del azúcar. Esto es lo que ocurre en medios con sacarosa. Sin embargo, con lactosa a concentraciones mayores que 14 mM los niveles de formiato podrían reducirse debido a una mayor síntesis de fosfatos de triosas que inhiben a la piruvato-formiato liasa o bien a que la lactosa impide una excreción normal del formiato. Debe tenerse en cuenta que el consumo máximo de lactosa por *S. thermophilus* CP4, en el medio estudiado, es de alrededor de 10-14 mM (ver capítulo II) y por lo tanto en medios con concentraciones de lactosa mayores quedará parte del azúcar sin utilizar influyendo de alguna manera: ya sea disminuyendo la liberación o estimulando las vías de utilización de formiato a través de la activación de alguna de las enzimas involucradas en la misma.

Conclusión:

El estudio de la producción de formiato en cultivos de *S. thermophilus* puede ser llevado a cabo utilizando la técnica enzimática con formiato deshidrogenasa. La desproteínización con TCA trae aparejada una mejora con respecto al método original.

La producción de formiato y lactato por parte de *S. thermophilus* depende notablemente de la cepa, la composición del medio de cultivo así como también de las condiciones de incubación lo cual sugiere la presencia de mecanismos de regulación aún no aclarados.

CAPITULO IV: CONSERVACION DE CEPAS

Consideraciones generales.

Se conocen varios métodos para la conservación de cepas (Gherna, 1981) pero para el mantenimiento por periodos largos los procedimientos de elección son la congelación y la liofilización.

Generalmente los cultivos congelados exhiben, cuando se inoculan en un medio adecuado, periodos de latencia significativamente más cortos que los cultivos liofilizados. Esto hace que en el caso de bacterias lácticas, y otras bacterias de uso industrial, el mantenimiento de células congeladas sea muy conveniente ya que hace posible la inoculación directa sin efectuar un cultivo madre (Richardson, 1983).

La mayoría de los trabajos publicados sobre conservación de cepas dan cuenta de condiciones que no son comparables en lo que respecta a medios empleados, tipos y concentraciones de crioprotectores, estado fisiológico de las bacterias al ser cosechadas y temperatura de almacenamiento (Turner y col, 1979; Chavarri y col, 1988; Thunell and Sandine, 1984; Tsvetkov and Shishkova, 1982).

Con el objeto de establecer las condiciones óptimas de congelación, es necesario conocer cuáles son los cambios que ocurren, dentro de la célula y en el medio extracelular, durante el proceso de congelación- descongelación.

Cuando se enfría bruscamente una suspensión celular, una de las causas por la cual se verifica cierta pérdida de viabilidad es el llamado "shock por frío". Cuando se congela, primeramente se forma hielo extracelular y el interior de las células permanece líquido y sobreenfriado aún a temperaturas de -10° a -15°C . La congelación del agua extracelular hace que el sistema se aparte del equili-

brio, pues la presión de vapor del medio exterior resulta menor que la del interior de las células. Para reestablecer el equilibrio hay dos caminos posibles: que las células pierdan agua o que se produzca una congelación intracelular.

A bajas velocidades de enfriamiento (10-100°C/min), altas permeabilidades de las membranas y altas relaciones superficie/volumen celular, se produce la deshidratación de las células y los efectos letales ocurren por las altas concentraciones de solutos intracelulares. Por el contrario, a altas velocidades de enfriamiento (>100°C/min), bajas permeabilidades de las membranas y bajas relaciones superficie/ volumen celular, se produce cristalización intracelular dando lugar a un daño de tipo mecánico.

Debe tenerse en cuenta que a velocidades ultra-rápidas (del orden de 10000°C/min), los cristales intracelulares formados serán muy pequeños y no tendrán un efecto mecánico letal pero poseerán una alta energía superficial con lo cual tenderán a recrystalizar para formar cristales más grandes y estables, en especial ante un aumento de temperatura. Lo anteriormente expuesto explica porqué las suspensiones bacterianas congeladas en forma ultra-rápida, deben descongelarse también muy rápidamente para obtener una buena recuperación de microorganismos viables: la descongelación rápida hace que haya poco tiempo para los fenómenos de recrystalización.

El daño producido por el proceso de congelación- descongelación puede manifestarse a través de los siguientes hechos:

- a) Pérdida de viabilidad.
- b) Liberación de material celular.
- c) Aumento de la sensibilidad a surfactantes.
- d) Aumento de requerimientos nutricionales.
- c) Disminución de ciertas aptitudes metabólicas.
- e) Aumento del período de latencia.
- f) Aumento en la sensibilidad a radiaciones.

Gran parte del daño celular puede asociarse a fenómenos superficiales (Bozoglu y col, 1987), por lo que a mayor superficie corresponde mayor daño. Las células congeladas en condiciones adversas pierden una parte considerable de sus proteínas (en especial las asociadas a la membrana) e inhibidores de enzimas degradadoras. Asimismo el descenso de temperatura afecta las propiedades de la membrana plasmática.

Existen varios factores que influyen sobre la supervivencia de las células congeladas:

- a) Naturaleza del microorganismo.

Diferentes microorganismos responden de distinta manera al proceso de congelación-descongelación debido a diferencias en la composición de la membrana celular, sistemas enzimáticos, superficie expuesta, etc. Debe notarse que la variabilidad de las respuestas ante la congelación, se verifica aún en diferentes cepas de una misma especie.

b) Historia previa del cultivo.

El medio en el que crecen las células influye sobre la resistencia ante el proceso de congelación- descongelación. Algunos investigadores han propuesto que en ciertas condiciones, se sintetizan polímeros protectores (Gilliland and Speck, 1974; Calcott and Mcleod, 1974 a,b). Por otra parte la cosecha de las células a congelar a partir de cultivos con pH muy bajo podría afectar su resistencia (Thunell and Sandine, 1984; Ross, 1980).

Otro factor que ha demostrado ser de suma importancia en ciertas bacterias lácticas es la concentración de iones Ca^{+2} en el medio de crecimiento (Wright and Klaenhammer, 1983; Abraham y col, 1990).

Asimismo debe tenerse en cuenta la temperatura de desarrollo ya que ésta influye sobre la composición de la membrana plasmática (Stryer, 1982; Louvand-Funel et Desens, 1990).

c) Edad del cultivo.

Es un hecho generalmente aceptado, que las células en fase estacionaria son más resistentes al proceso de congelación-descongelación. Sin embargo, se ha demostrado que en algunos microorganismos, esto depende de la velocidad de enfriamiento: a velocidades muy bajas o muy altas, células de *E. coli* cosechadas de cultivos en desarrollo rápido son más susceptibles que las cosechadas de cultivos en desarrollo lento, pero a velocidades entre 10 y 100°C/min el comportamiento del sistema es el inverso (Calcott and Macleod, 1974b).

d) Velocidad de enfriamiento.

Generalmente existe una velocidad óptima en la zona de las bajas velocidades de enfriamiento (del orden de 10°C/min) por encima y por debajo de la cual, el porcentaje de microorganismos sobrevivientes disminuye (Mazur, 1970)

A velocidades muy altas, la resistencia aumenta hasta llegar a un máximo para enfriamientos ultra-rápidos (del orden de 10000 °C/min).

La existencia de un óptimo en la zona de las bajas velocidades, puede explicarse a través de la existencia de dos mecanismos que produzcan el daño (Mazur, 1966; Davies and Obafemi, 1985): a muy bajas velocidades el congelamiento de agua extracelular hace que las células estén expuestas a altas concentraciones de solutos. Lógicamente, a medida que la velocidad de enfriamiento aumenta, el tiempo de exposición a estas condiciones adversas es menor y, por lo tanto, aumenta la supervivencia. A mayores velocidades, comienza a formarse hielo intracelular y la viabilidad disminuye.

A velocidades ultra-rápidas, se formarían cristales intracelulares muy pequeños y por consiguiente, de poco efecto letal. Si la velocidad de descongelación es alta, se evitaría la recristalización que traería como consecuencia la formación de cristales más grandes y nocivos para los microorganismos (Mazur, 1966; Davies and Obafemi, 1985).

e) Almacenamiento.

Durante el almacenamiento, la disminución de la viabilidad tiene lugar debido a la exposición continuada a altas concentraciones de solutos. Esto es particularmente importante a tempera-

turas cercanas al punto de congelación del material.

Otros factores que contribuyen al daño son el cambio de pH y el fenómeno de recristalización (Davies and Obafemi, 1985).

f) Descongelación.

Cuando durante el proceso de congelación se han formado cristales intracelulares (velocidades altas), una descongelación rápida evita la recristalización.

Para proteger a las células de la acción nociva del proceso de congelación- descongelación, se utilizan agentes crioprotectores. Estas sustancias son muy diferentes en su naturaleza química pero poseen algunas características en común (Gazeau et Dereuddre, 1986):

- a) Pueden formar puentes de hidrógeno.
- b) Aumentan la viscosidad del medio.
- c) Disminuyen la velocidad de nucleación de los cristales de hielo.

Existen crioprotectores que pueden penetrar en las células y otros que no. En general, los de bajo peso molecular (glucosa, glicerol, etilenglicol, etc) logran acceder al interior celular y los de alto peso molecular (polietilenglicol, polivinilpirrolidona, etc) ejercen su acción sólo desde el exterior. Desde luego, el hecho que una sustancia pueda o no penetrar en la célula, depende de cada caso particular.

Con respecto a los mecanismos de crioprotección, pueden postularse dos (Gazeau et Dereuddre, 1986):

a) Coligativo o inespecífico: no existe interacción específica entre el crioprotector y las estructuras celulares. En este caso, el crioprotector modifica las características del medio intra y/o extracelular (según pueda o no penetrar en la célula), dando lugar a una deshidratación moderada y limitando el aumento de la concentración salina intracelular.

b) No coligativo o específico: se establecen interacciones específicas con ciertas estructuras celulares modificando las propiedades de las mismas. En especial, son importantes las que tienen lugar entre el crioprotector y la membrana citoplasmática.

Las interacciones entre los crioprotectores y la membrana se realizan a través del grupo fosfato o las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, según el crioprotector utilizado (Anchordoguy y col, 1987). Asimismo puede haber interacción con las proteínas de la membrana.

Debe considerarse también, que los agentes crioprotectores pueden estabilizar proteínas en solución (Crowe, 1990; Carpenter and Crowe, 1988).

Lógicamente los crioprotectores podrían actuar mediante una combinación de los mecanismos específico e inespecífico.

Para la conservación de bacterias lácticas se han utilizado diversos crioprotectores: azúcares, sólidos de leche, aminoácidos, polialcoholes, etc (Font de Valdez y col, 1983; Chavarri y col,

1988, Thunell and Sandine, 1984; De Antoni y col, 1989).

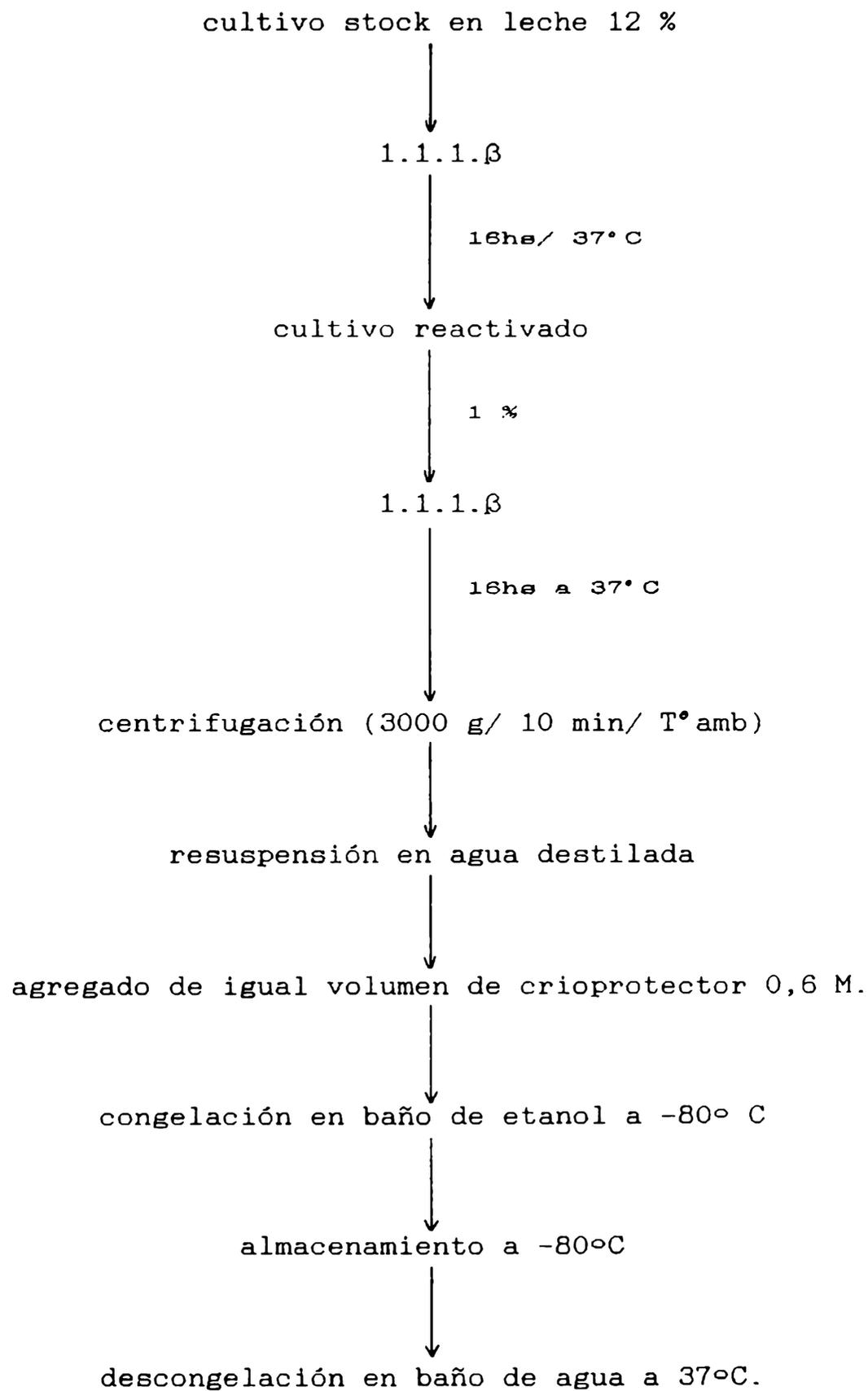
Con respecto a la forma de evaluar la crioprotección, se puede estudiar el mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos (Juven, 1979; Font de Valdez y col, 1986; Bozoglu y col, 1987) pero se pueden agregar estudios sobre la conservación de características metabólicas interesantes (Tsvetkov and Shishkova, 1982; Heckly and Quay, 1981; Chavarri y col, 1988; Thunell and Sandine, 1984).

El principal objetivo de los estudios efectuados en el presente trabajo, fue la comparación de diferentes crioprotectores, en iguales condiciones, para el mantenimiento de cepas de *S. thermophilus* congeladas a -80°C para lo cual se ha evaluado el efecto crioprotector de tres azúcares: lactosa, sacarosa y trehalosa. Los dos primeros, han sido extensamente estudiados en la crioprotección de microorganismos y el tercero es un protector natural que se encuentra en ciertos organismos capaces de sobrevivir en condiciones de deshidratación extremas. Se ha demostrado su efecto crioprotector sobre vesículas lipídicas (Rudolph and Crowe, 1985), levaduras (Coutinho y col, 1988), *L. bulgaricus* (De Antoni y col, 1989), etc.

En los estudios de conservación realizados se tuvo en cuenta el mantenimiento de bacterias viables, la capacidad acidificante y la producción de formiato. El medio utilizado para las experiencias (1.1.1.β) se empleó debido a su capacidad buffer ya que de esta manera se obtienen células sometidas a condiciones de pH menos drásticas que si se usa un medio sin regulación. Cabe mencionar aquí, que el descenso de pH en medio sin buffer (1.1.1) al cabo de 16 horas de incubación a 37°C es de 2,21 unidades, mientras que en

medio 1.1.1.β es de sólo 0,73 unidades.

A continuación se presenta un esquema general de las experiencias realizadas:



otros investigadores (Moss and Speck, 1963; Lee y col, 1974; Thunnell and Sandine, 1984).

La ruptura de cadenas impediría la utilización de los recuentos de bacterias viables para evaluar la eficiencia de las condiciones de crioprotección.

Sin embargo, si las células a congelar se cosechan luego de 16 horas de incubación se evitan los grandes aumentos de UFC luego de la descongelación. Esto puede notarse observando los resultados consignados en la tabla 12.

Tabla 12: Recuentos, antes y después de congelar a - 80°C, de suspensiones de *S. thermophilus* CP4 cosechadas en fase exponencial o a las 16 horas de incubación a 37°C.

Período de cosecha	UFC/ml antes de congelar	UFC/ml después de descongelar	Variación ^a
exponencial	2,3 x 10 ⁸	4,3 x 10 ⁸	+ 87%
16 horas de incubación.	1,9 x 10 ⁸	1,1 x 10 ⁸	- 4%

a: Variación: $\frac{(\text{UFC/ml después de descongelar} - \text{UFC/ml antes})}{\text{UFC/ml antes}} \times 100$

Debe tenerse en cuenta que los cultivos en fase exponencial, siempre están compuestos por cadenas largas ya que las células están en activa división y la velocidad de duplicación es mayor que la de separación de las células. Al llegar a fase estacionaria las cadenas se hacen más cortas, con lo cual son menos susceptibles a la ruptura durante el proceso de congelación-descongelación.

Debido a las consideraciones expuestas anteriormente, los estudios de conservación se efectuaron con células provenientes de cultivos de 16 horas a 37°C.

Efecto crioprotector de disacáridos: almacenamiento y ciclos de congelación-descongelación.

La protección ejercida por los disacáridos se evaluó al cabo de distintos tiempos de almacenamiento y luego de ciclos de congelación-descongelación.

Con respecto al mantenimiento de bacterias viables, se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 13.

Tabla 13: Recuentos de las suspensiones de *S. thermophilus* CP4 en distintos crioprotectores y congeladas a -80°C.

UFC/ml x 10 ⁻³			

días	0	7	73

sacarosa	4,9	5,9	5,6
lactosa	4,4	3,8	5,9
trehalosa	6,3	4,8	3,8

En el caso de la sacarosa y la lactosa, se observa un aumento en el número de UFC/ml que puede ser atribuido a la ruptura de cadenas durante el proceso de congelación-descongelación. Debe tenerse en cuenta que, aunque la cosecha de las células a partir de cultivos de 16 horas minimiza la ruptura de cadenas, tal como

se mostró anteriormente, no la elimina totalmente. Para la trehalosa, se tienen recuperaciones de bacterias viables del 76 % y 60 % al cabo de 7 y 73 días de almacenamiento respectivamente. Sin embargo de acuerdo con lo anteriormente expuesto no se pueden establecer diferencias entre los crioprotectores.

Para evitar los inconvenientes debidos a la ruptura de las cadenas se evaluó la crioprotección mediante el estudio de la capacidad acidificante. Debe notarse que la capacidad acidificante es independiente de la longitud de las cadenas, lo cual hace que esta determinación sea preferible a los recuentos para evaluar la eficiencia de los crioprotectores.

Los resultados de los test de actividad realizados sobre las suspensiones de células crecidas en 1.1.1.β a 37°C durante 16 hs , antes de ser congeladas se muestran en la siguiente figura:

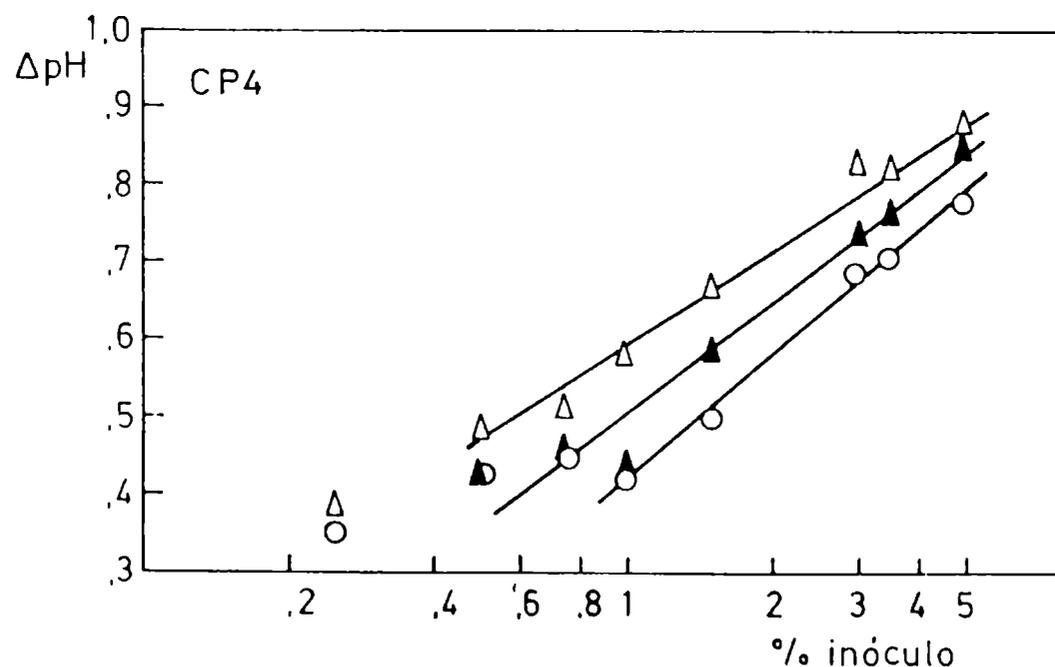


Figura 31: Variación de pH en leche 12% al cabo de 3 hs a 42°C para distintos porcentajes de inóculo de suspensiones de *S. thermophilus* CP4 en sacarosa (Δ), lactosa (O) y trehalosa (▲). En todos los casos la concentración de los azúcares fue 0,3M.

Los recuentos iniciales fueron $4,4 \times 10^8$ UFC/ml; $4,9 \times 10^8$ UFC/ml y $6,3 \times 10^8$ UFC/ml para las suspensiones realizadas en lactosa, sacarosa y trehalosa respectivamente.

Luego de 73 días de almacenamiento a -80°C los resultados fueron los que se muestran en la figura 32.

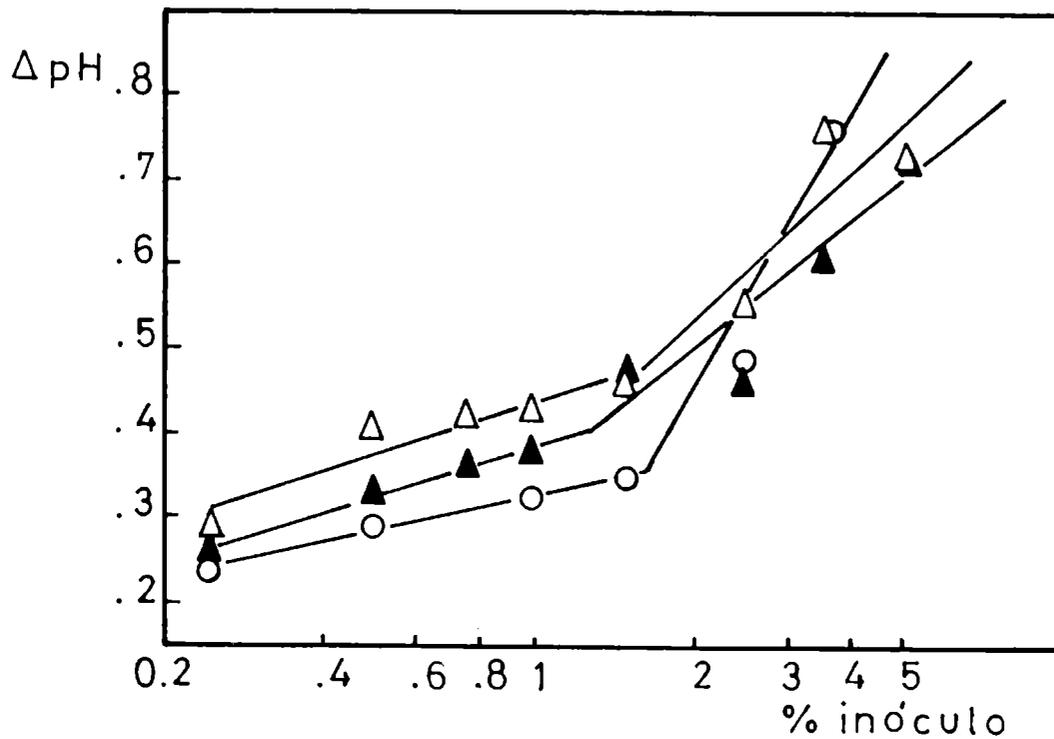


Figura 32: Variación de pH en leche 12% al cabo de 3 hs a 42°C para distintos porcentajes de inóculo de suspensiones de *S. thermophilus* CP4 en sacarosa (Δ), lactosa (\circ) y trehalosa (\blacktriangle) almacenadas durante 73 días a -80°C . En todos los casos la concentración de los azúcares fue 0,3M.

Con respecto a la interpretación de este test podemos decir que a medida que aumenta la concentración del inóculo, la variación de pH será mayor. Lógicamente, esto podría atribuirse a la disminución del período de latencia con el aumento del porcentaje

de inóculo, ya que al haber mayor número de células, el acondicionamiento del medio para el desarrollo demandaría menos tiempo. Además, al haber mayor número de células habría también una mayor cantidad de enzimas para la conversión de lactosa en ácido láctico.

Es de esperar, que para una suspensión de bacterias que ha sido sometida a un proceso de congelación-descongelación, las gráficas varíen con respecto a una suspensión no congelada debido a la disminución del número de células y la capacidad acidificante.

Nótese que en el caso de las gráficas correspondientes a las suspensiones antes de ser congeladas (figura 31), se observa una relación lineal entre el logaritmo del porcentaje de inóculo y la variación de pH. Esta linealidad se hace evidente desde inóculos de 0,25 % para sacarosa y desde inóculos de 1 % para trehalosa y lactosa.

Sin embargo, para suspensiones conservadas durante 73 días (figura 32) se observa que la variación del descenso de pH con el logaritmo del porcentaje de inóculo es poco marcada hasta que se superan inóculos del 2 %. Esto podría atribuirse a una disminución del número de bacterias viables y/o a una merma en la capacidad acidificante de las células. Estos experimentos no permiten establecer diferencias entre los crioprotectores estudiados ya que los resultados son muy similares para todos ellos.

Si tenemos en cuenta los resultados de la figura 33, vemos que en cuanto a la capacidad de acidificación en leche, los tres crioprotectores demostraron proteger en aproximadamente la misma medida.

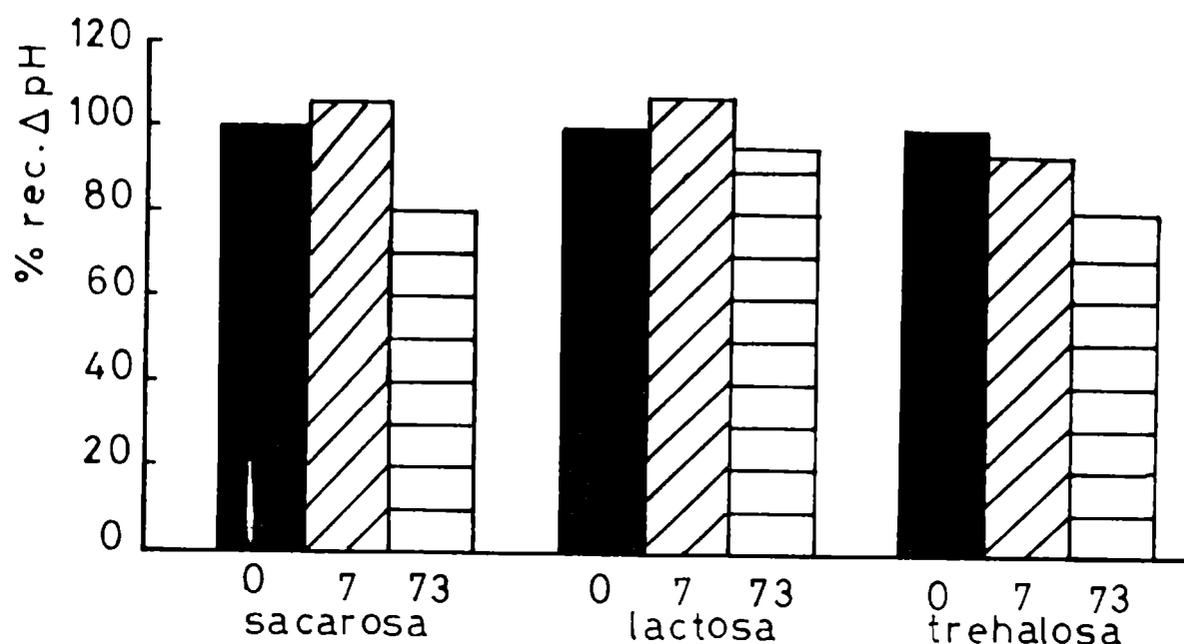


Figura 33: Mantenimiento de la capacidad acidificante en leche de suspensiones de *S. thermophilus* CP4 realizadas en tres crioprotectores, al cabo de 7 y 73 días de almacenamiento a - 80°C.

Referencias: $\Delta \text{pH} \% = \frac{\Delta \text{pH luego del almacenamiento}}{\Delta \text{pH antes de congelar}} \times 100$

El pH fue medido al cabo de 3 horas de incubación a 42°C.

Para someter a las células a condiciones mucho más drásticas, se estudió el efecto de los ciclos de congelación-descongelación sobre suspensiones de *S. thermophilus* CP4 y ATCC 19258.

Como puede observarse en la figura 34 A y B, las conclusiones pueden ser diferentes según se estudie la recuperación de la capacidad acidificante o la fracción de bacterias sobrevivientes. En el primer caso, se ve que todos los disacáridos estudiados

ejercieron similar efecto crioprotector: para la cepa ATCC 19258 al cabo de 12 ciclos de congelación-descongelación, se obtuvieron valores de variación de pH de alrededor del 80 % del valor correspondiente a suspensiones no congeladas. Las células suspendidas en agua sólo recuperaron un 20 % de los valores al cabo de igual número de ciclos (figura 34 A).

Si atendemos ahora a la fracción de bacterias sobrevivientes, vemos que la mayor recuperación se obtiene con trehalosa, siguiéndole en orden decreciente la lactosa, la sacarosa y finalmente el agua (figura 34 B).

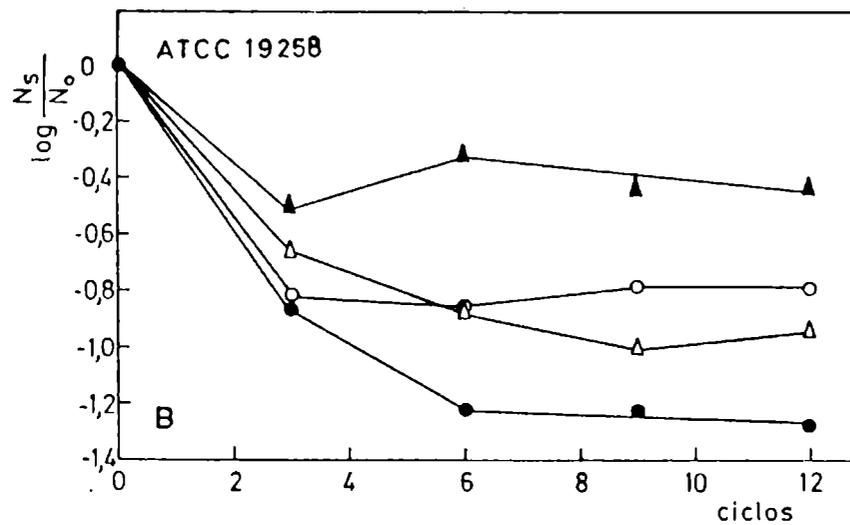
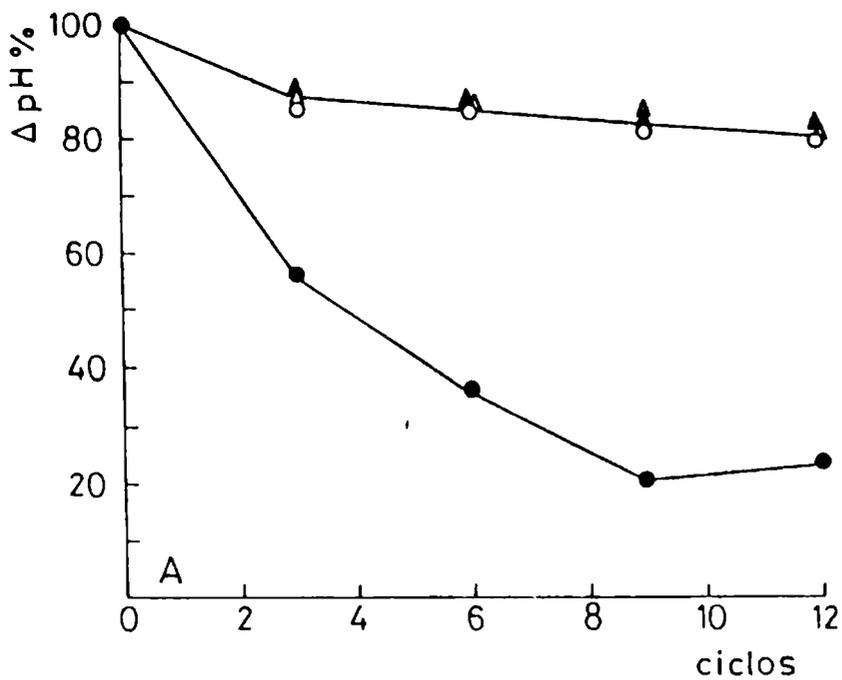


Figura 34: Efecto de los ciclos de congelación- descongelación sobre *S. thermophilus* ATCC 19258 suspendido en agua (●), trehalosa (▲), sacarosa (Δ) y lactosa (○). En todos los casos la concentración de los azúcares fue 0,3 M.

Panel A: recuperación de la capacidad acidificante. Panel B: recuperación de UFC/ml.

Referencias:
$$\Delta \text{pH} \% = \frac{\Delta \text{pH descongelado}}{\Delta \text{pH control s/ congelar}} \times 100$$

No = UFC/ml iniciales. Ns = UFC/ml luego de n ciclos de congelación-descongelación.

Los pH se midieron al cabo de 4 hs de incubación a 42°C.

La figura 35 muestra un estudio comparativo de las cepas CP4 y ATCC 19258 utilizando los mismos crioprotectores.

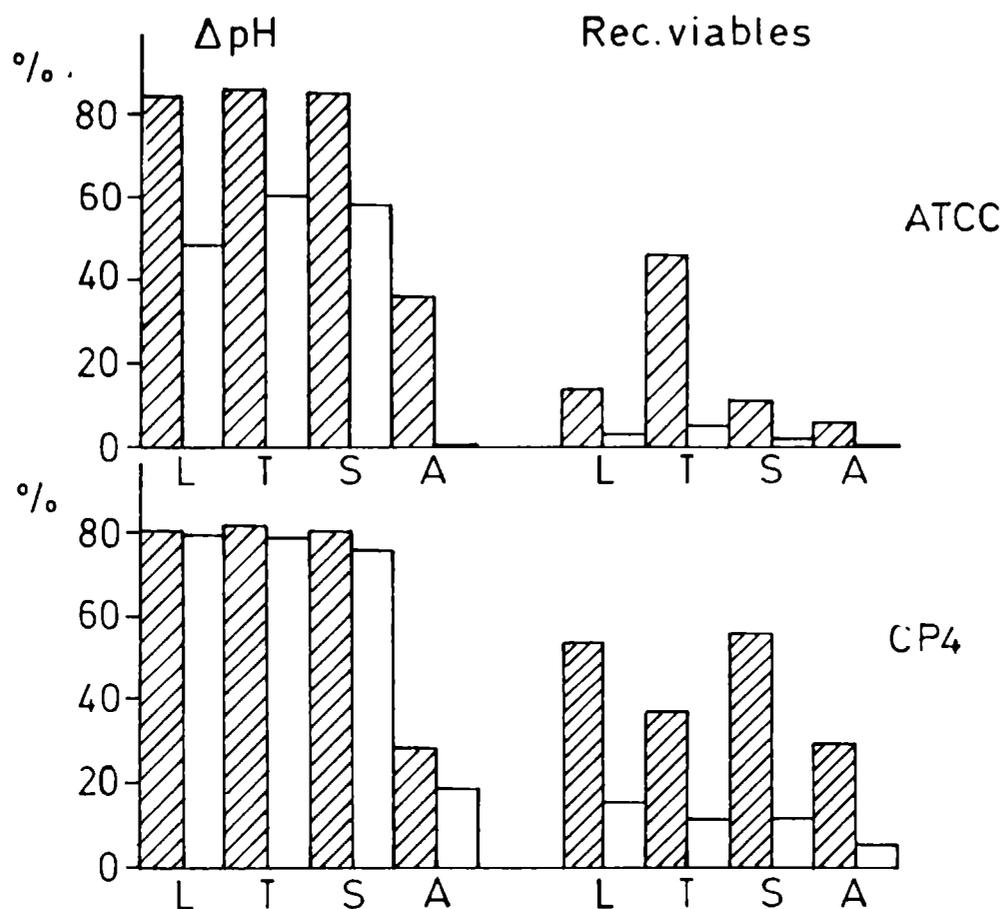


Figura 35: Efecto de los ciclos de congelación- descongelación y el tiempo de almacenamiento sobre el número de UFC/ml y la capacidad acidificante en medio 1.1.1. para las cepas CP4 y ATCC 19258 de *S. thermophilus*. En todos los casos las suspensiones fueron sometidas a 7 ciclos de congelación-descongelación.

Tiempos de almacenamiento: 7 días  90 días 

Referencias: A=agua, S=sacarosa, L=lactosa y T=trehalosa.

Los pH se midieron al cabo de 4 hs a 42°C (inóculo al 3%).

El 100% corresponde a controles sin congelar.

El análisis de la figura 35 pone de manifiesto una clara diferencia entre las dos cepas: la cepa CP4 suspendida en los crioprotectores estudiados, mantiene un 80 % de su capacidad acidificante en medio de cultivo aún luego de 90 días de almacenamiento mientras que la ATCC 19258 exhibe un porcentaje similar luego de 7 días pero disminuye a valores entre el 50 y el 60 % al cabo de 90 días.

Con respecto a la conservación del número de UFC/ml, se advierte el mismo comportamiento: al cabo de 7 días de almacenamiento la cepa CP4 mantiene entre un 30 y un 55 % de la capacidad de formar colonias. Los valores disminuyen a 10-15 % a los 90 días para células suspendidas en los crioprotectores y 5 % para células suspendidas en agua. La cepa ATCC 19258 mantiene alrededor del 10 % con lactosa y sacarosa a los 7 días, y 45 % con trehalosa en el mismo tiempo. Al cabo de 90 días la recuperación disminuye a valores entre 2 y 5 % para las suspensiones en los crioprotectores y 0,5% para las suspensiones en agua.

Debe tenerse en cuenta, que al cabo de 7 ciclos de congelación-descongelación no son de esperar diferencias en la fragmentación de las cadenas de las células suspendidas en los distintos crioprotectores.

En vista de los resultados obtenidos, puede concluirse que los disacáridos estudiados mantienen en forma similar la capacidad acidificante en medio de cultivo luego de 7 ciclos y 90 días de almacenamiento. Con respecto a la capacidad acidificante en leche (un ciclo, figura 33), también se obtienen resultados similares.

En cuanto al mantenimiento del número de UFC/ml, la ruptura de cadenas introduce cierta incertidumbre para suspensiones sometidas

a un solo ciclo de congelación- descongelación, pero no al utilizar un número mayor de ciclos.

Puede notarse que los disacáridos estudiados protegen en forma efectiva, obteniéndose un orden de crioprotección que depende de la cepa.

ATCC 19258: trehalosa > lactosa > sacarosa

CP4: sacarosa > lactosa > trehalosa (figura 36).

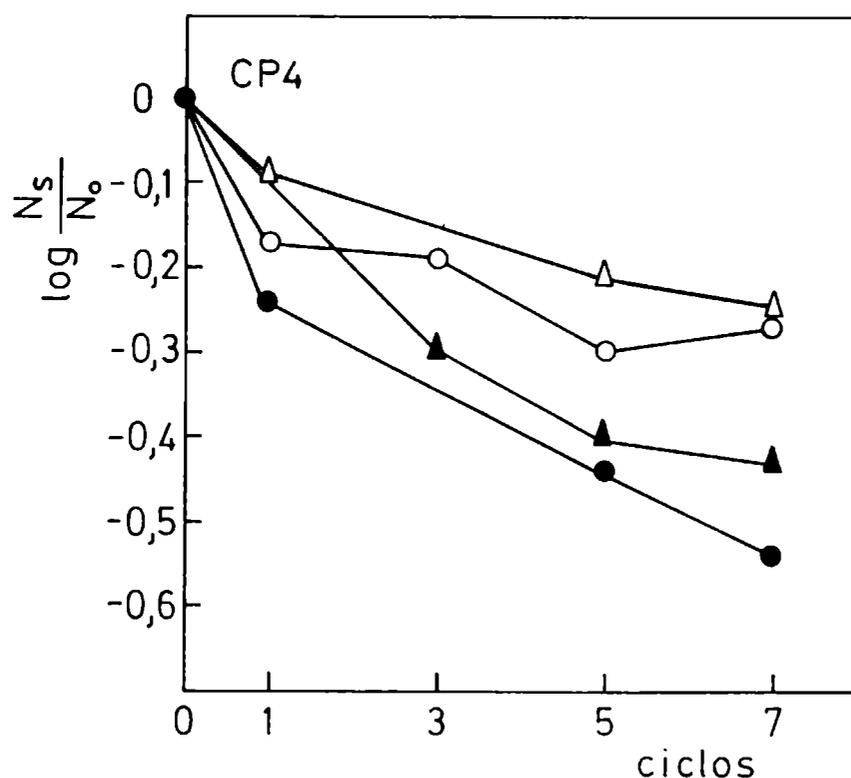


Figura 36: Efecto de los ciclos de congelación- descongelación sobre la capacidad formadora de colonias de *S. thermophilus* CP4 suspendido en agua (●), trehalosa (▲), lactosa (○) y sacarosa (△). En todos los casos la concentración de los azúcares fue 0,3 M. Referencias: No= UFC/ml antes de congelar, Ns=UFC/ml luego de n ciclos de congelación-descongelación.

El hecho que se obtengan diferentes resultados si se tiene en cuenta la conservación de la capacidad acidificante o la recuperación de viables no es extraño, ya que las células congeladas podrían verse afectadas en sus aptitudes metabólicas pero no lo suficiente para suprimir su capacidad de multiplicación. Además, los períodos de incubación utilizados para los recuentos de viables son lo suficientemente prolongados para que las células desarrollen mientras que los ensayos de acidificación se hacen en tiempos cortos.

Una vez conocida la crioprotección otorgada por los distintos agentes estudiados, se procedió a evaluar la eficiencia de la sacarosa para mantener la capacidad de producción de lactato y formiato al cabo de cierto número de ciclos de congelación-descongelación.

En la figura 37, se confirma el efecto protector de la sacarosa sobre *S. thermophilus* CP4. Los niveles de lactato al cabo de 4 horas de incubación a 42°C en leche entera, se mantienen en valores de alrededor del 85 % de los correspondientes a los controles sin congelar aún al cabo de 6 ciclos de congelación-descongelación. Las suspensiones bacterianas en agua, por su parte, mantienen el 70 % de su capacidad productora de lactato al cabo de 2 ciclos pero este valor desciende a aproximadamente el 25 % luego de 8 ciclos. Cabe aclarar que el número inicial de UFC/ml fue de $8,3 \times 10^8$ y $7,5 \times 10^8$ para las suspensiones efectuadas en agua y sacarosa respectivamente.

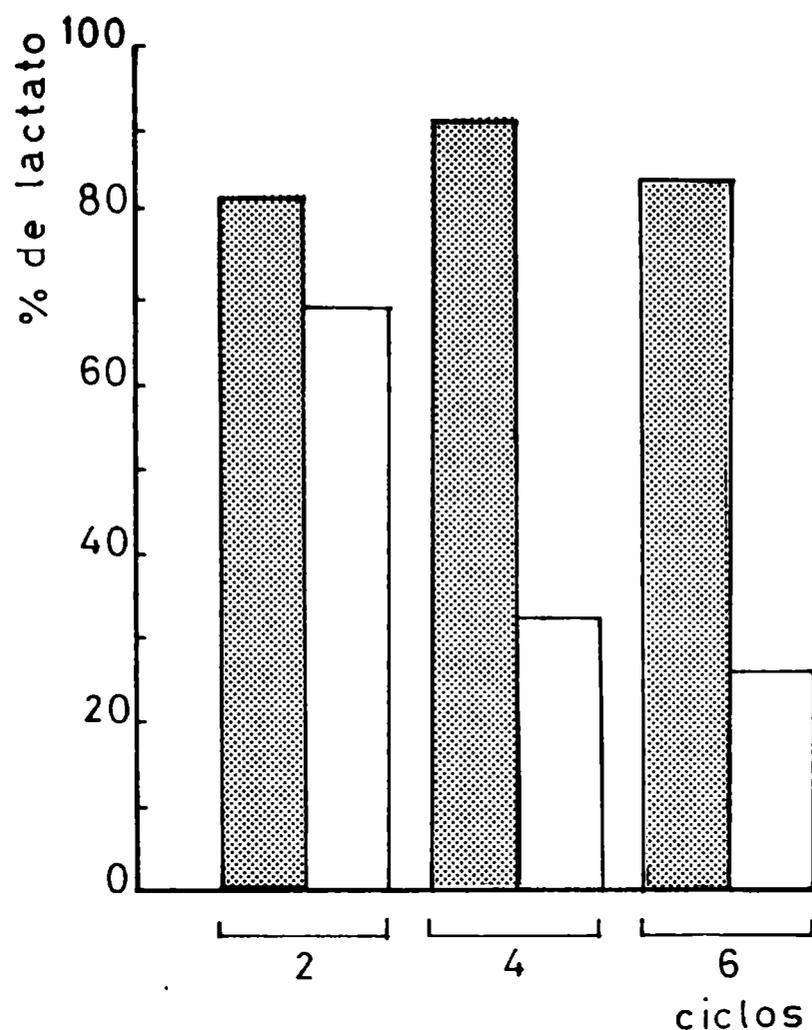


Figura 37: Efecto de los ciclos de congelación-descongelación sobre la producción de ácido láctico en leche entera, por parte de suspensiones de *S. thermophilus* CP4 realizadas en agua  y sacarosa 0,3 M .

Con respecto al mantenimiento de la capacidad productora de formiato, en la figura 38 puede apreciarse nuevamente la crioprotección otorgada por la sacarosa ya que las suspensiones realizadas en este crioprotector mantienen alrededor del 25 % de la capacidad productora de formiato al cabo de 6 ciclos mientras que los controles en agua, mantienen sólo el 5 %. En estos ensayos el número inicial de UFC/ml fue de $7,9 \times 10^8$ y $6,9 \times 10^8$ para agua y sacarosa respectivamente.

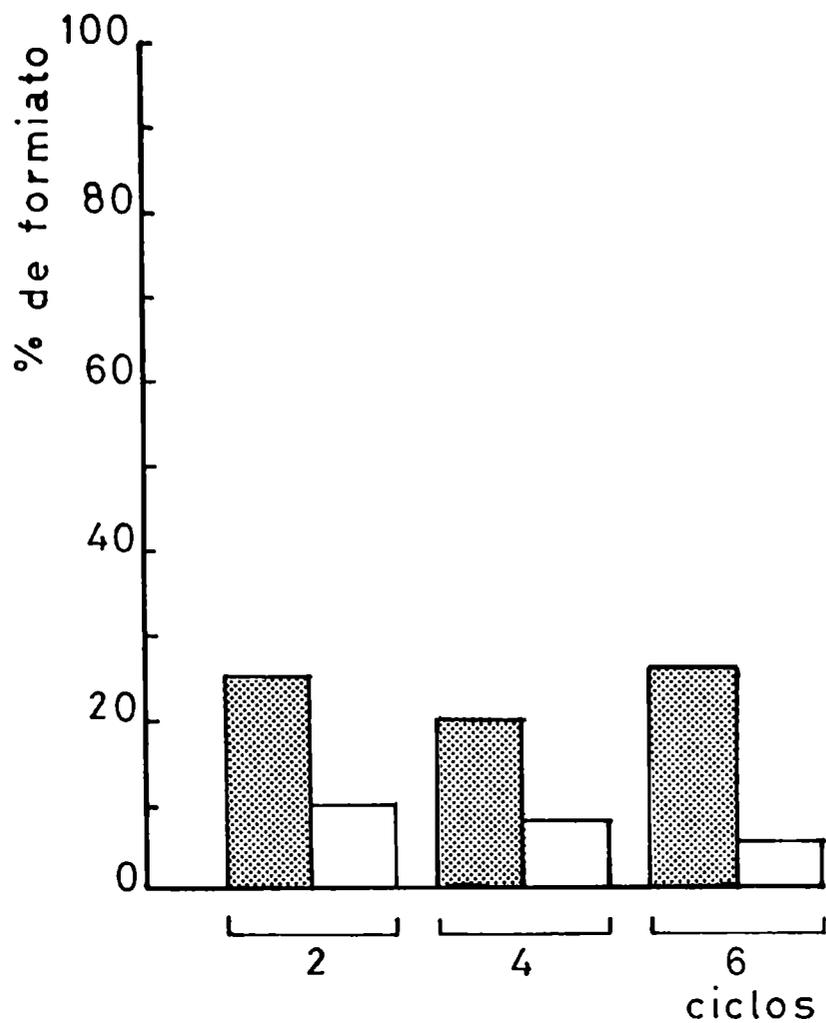


Figura 38: Efecto de los ciclos de congelación-descongelación sobre la producción de ácido fórmico en leche entera suplementada, por parte de suspensiones de *S. thermophilus* CP4 realizadas en agua  y sacarosa 0,3 M .

Teniendo en cuenta que los fermentos para yogurt y ciertos quesos están constituidos por *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, cabría aquí hacer una comparación de la conservación de las dos bacterias.

Los estudios efectuados con cepas de *L. bulgaricus* sometidas a ciclos de congelación-descongelación (De Antoni y col, 1989) muestran que esta bacteria es mucho más sensible que *S. thermophilus*. Estas diferencias podrían ser atribuidas a diferencias en

la composición de la membrana plasmática que haría que los daños debidos a la congelación y posterior descongelación, sean más graves en el bacilo. Asimismo debe tenerse en cuenta que muchos de los daños están asociados a cambios de permeabilidad y deshidratación de las células; por lo tanto, una célula de forma bacilar tendría una relación superficie/ volumen más alta que un coco, con lo cual tendría un área mayor en cada célula para los cambios mencionados.

Conclusión:

Los resultados obtenidos muestran que la viabilidad y la capacidad productora de lactato y formiato pueden ser mantenidas adecuadamente mediante congelación a -80°C utilizando sacarosa, lactosa o trehalosa como crioprotectores.

CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo se han estudiado aptitudes metabólicas industrialmente útiles de *S. thermophilus* y en especial se consideró la producción de formiato.

Previamente fue necesario contar con un método analítico que permitiera efectuar las determinaciones en distintos medios de cultivo. En este punto, la determinación enzimática de ácido fórmico con formiato deshidrogenasa, ha sido significativamente mejorada mediante el ajuste de la técnica de desproteínización en la cual se reemplazó el HClO_4 por TCA para precipitar las proteínas. Esta modificación ha posibilitado reacciones más rápidas y permitió el estudio de la producción de formiato en cultivos de *S. thermophilus*.

Las experiencias realizadas mostraron que los niveles de formiato alcanzados dependen de la cepa, la temperatura y el medio de cultivo. Esta última variable resultó ser de mucha importancia ya que, aunque en todas las cepas los niveles alcanzados en leche suplementada con extracto de levadura fueron superiores que en medio 1.1.1, la cepa ATCC 19258 no produce formiato (pero sí lactato) en este último medio pero lo produce en leche suplementada. Además se ha visto que si la leche no se suplementa con extracto de levadura, los niveles de formiato alcanzados son significativamente menores.

En la cepa CP4 los micromoles de formiato producidos por UFC, son similares en leche entera suplementada y en medio 1.1.1, con lo que se puede afirmar que los mayores niveles alcanzados en leche suplementada se deben al mayor número de células en este

medio. A estas mismas conclusiones puede arribarse si se estudia la producción de lactato aunque en este caso se obtienen valores 10^2 a 10^3 veces superiores que para formiato.

Con respecto a las cinéticas de producción, el lactato comienza a detectarse en etapas tempranas del crecimiento y el formiato en la fase exponencial del desarrollo.

La naturaleza y la concentración de azúcares en el medio de cultivo también influyen sobre la producción de formiato y lactato, comprobándose que en medios con lactosa se obtienen niveles máximos de formiato con concentraciones de 10 a 14 mM de azúcar y se produce una disminución al aumentar la concentración del hidrato de carbono. Con sacarosa por el contrario, se alcanzan niveles máximos de formiato con concentraciones de azúcar de alrededor de 5,6 mM y posteriores aumentos no producen diferencias significativas. Con ambos azúcares, el lactato alcanzó concentraciones máximas con una determinada cantidad de hidrato de carbono a partir de la cual se mantuvieron constantes.

Los resultados obtenidos podrían explicarse considerando que la enzima clave para la producción de formiato (piruvato-formiato liasa), sería afectada en distinta medida por los cambios del medio y la temperatura ya que los diferentes medios podrían tener o dar lugar a la formación de sustancias que afecten la actividad o la síntesis de la enzima. Asimismo podría considerarse la posibilidad de que se vea afectada la liberación de formiato al medio extracelular por la presencia de determinadas sustancias. Finalmente, diferentes cepas podrían estar sujetas a distintas regulaciones de su actividad metabólica o poseer diferente dotación enzimática.

Las aptitudes metabólicas estudiadas y la capacidad de desarrollo de *S. thermophilus*, se lograron conservar adecuadamente a -80°C con los crioprotectores utilizados (lactosa, sacarosa y trehalosa) en las condiciones ensayadas: al cabo de 7 ciclos de congelación-descongelación y 73 días de almacenamiento, las suspensiones de *S. thermophilus* CP4 conservan entre el 80 y el 100% de su capacidad de acidificación de la leche. En suspensiones bacterianas realizadas en sacarosa 0,3 M, se mantiene aproximadamente el 85 % de la capacidad de producción de lactato en leche al cabo de 6 ciclos de congelación-descongelación y 7 días de almacenamiento a -80°C . La capacidad de producción de formiato en leche suplementada se mantiene en alrededor del 25 % en las mismas condiciones.

En los trabajos de conservación realizados se han puesto de manifiesto diferencias entre distintas cepas, ya que la cepa ATCC 19258 resultó mucho más afectada por los procesos de congelación que la cepa CP4. Conviene destacar que la comparación de los resultados obtenidos para *S. thermophilus* con los hallados en bibliografía para *L. bulgaricus*, confirma la necesidad de seleccionar condiciones de conservación considerando la extrema sensibilidad del bacilo al proceso de congelación-descongelación ya que la conservación del estreptococo no ofrece grandes dificultades.

Es importante tener en cuenta que el avance en el conocimiento del metabolismo de las bacterias lácticas contribuirá a lograr una mayor eficiencia en la manufactura de productos lácteos fermentados mediante la utilización de bacterias que posean características adecuadas así como también a través de la optimización de

las condiciones para un adecuado aprovechamiento de esas características. Por otra parte, la conservación de la viabilidad y las aptitudes metabólicas útiles contribuirá a la obtención de productos de calidad constante.

Los resultados presentados en este trabajo muestran claramente como pueden complementarse los estudios metabólicos con los de conservación para microorganismos industrialmente útiles.

BIBLIOGRAFIA

-Abbe, K.; Takahashi, S. and Yamada, T. Involvement of oxygen-sensitive pyruvate formate-lyase and mixed-acid fermentation by **Streptococcus mutans** under strictly anaerobic conditions. *J. Bacteriol.* (1982) 152: 175.

-Abraham, A. G.; De Antoni, G. L. and Añón, M. C. Effect of calcium on the cryopreservation of **Lactobacillus bulgaricus** in different freezing media. *Cryobiology* (1990) 27: 336.

-Accolas, J. P.; Hemme, D.; Desmazeaud, M. J.; Vassal, L.; Bouillane, C. et Veaux, M. Les levaines lactiques thermophiles: propriétés et comportement en technologie laitière, une revue. *Le Lait* (1980) 60: 487.

-Accolas, J. P.; Veaux, M. et Auclair, J. Etude des interactions entre diverses bactéries lactiques thermophiles et mésophiles en relation avec la fabrication des fromages à pâte cuite. *Le Lait* (1971) 51: 249.

-Anchordoguy, T. J.; Rudolph, A. S.; Carpenter, J. F. and Crowe, J. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* (1987) 24: 324.

-Audet, P.; Paquin, C. and Lacroix, C. Sugar utilization and acid production by free and entrapped cells of **Streptococcus salivarius** subsp. **thermophilus**, **Lactobacillus delbruekii** subsp. **bulgaricus** and **Lactococcus lactis** subsp. **lactis** in a whey permeate medium. *Appl. Environ. Microbiol.* (1989) 55: 185.

-Audet, P.; Paquin, C. and Lacroix, C. Batch fermentation with a mixed culture of lactic acid bacteria immobilized separately in k-carrageenan locust bean gum gel beds. Appl. Microbiol. Biotechnol.(1990) 32: 662.

-Barker, S. B. and Summerson, W. H. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. J. Biol Chem. (1941) 138: 535.

-Bautista, E. S.; Dahiya, R. S. and Speck, M. L. Identification of compounds causing symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk. J. Dairy Res. (1966) 33: 299.

-Bergmeyer, H. U.; Bernt, E.; Grassl, M. and Michal, G. Evaluation of experimental results. P. 308 in Methods of Enzymatic Analysis. Vol 1. 2nd ed. 1974. H. U. Bergmeyer, ed. Academic Press, New York, N. Y.

-Bogdanov, I. G.; Popkhirstov, P. and Marinov, L. Anticancer effect of antibioticum bulgaricum on Sarcoma 180 and on the solid form of Ehrlich carcinoma. Abs. VIII. p 364 International Cancer Congress (1962).

-Bogdanov, I. G.; Dalev, P. G.; Gurevich, A. I.; Kolosov, M. N.; Malkova, V. P.; Plemyanikova, L. A. and Sorokina, I. B. Antitumor glycopeptides from *Lactobacillus bulgaricus* cell wall. Fed. Eur. Biochem. Lett. (1975) 57: 259.

-Bouillane, C. et Desmazaud, M. J. Etude de quelques caractères de souches de *S. thermophilus* utilisées en fabrication de yoghourt et proposition d'une méthode de classement. Lait (1980) 60: 458.

-Bozoglu, T. F.; Ozilgen, M. and Bakir, U. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. Enzyme Microb. Technol. (1987) 9: 531.

-Breslaw, E. S. and Kleyn, D. H. In vitro digestibility of protein in yogurt at various stages of processing. J. Food Sci. (1973) 38: 1016.

-Brock, T. D. Crecimiento, síntesis macromolecular y diferenciación. Capítulo 7 en Biología de los Microorganismos. 1978. Ediciones Omega, S. A. Barcelona.

-Calcott, P. H. and Macleod, R. A. Survival of *Escherichia coli* from freeze-thaw damage: a theoretical and practical study. Can J. Microbiol. (1974a) 20: 671.

-Calcott, P. H. and Macleod, R. A. Survival of *Escherichia coli* from freeze-thaw damage: influence of nutritional status and growth rate. Can. J. Microbiol. (1974b) 20: 683.

-Carpenter, J. F. and Crowe, J. H. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. Cryobiology (1988) 24: 244.

-Chavarri, F. J.; De Paz, M. and Núñez, M. Cryoprotective agents for frozen concentrated from non-bitter **Streptococcus lactis** strains. *Biotechnol. Letters* (1988) 10: 11.

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

-Crowe, J. H.; Carpenter, J. F.; Crowe, L. M. and Anchordoguy, T. J. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* (1990) 27: 219-231.

-Daniel, W. W. Regresión y correlación lineales simples. Capítulo 8 en *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud.* (1977). Ed. Limusa, S. A. México.

-Davies, R. and Obafemi, A. Response of microorganisms to freeze thaw stress. Chapter 3 in *Microbiology of Frozen Foods.* (1985) Ed by R. K. Robinson. Elsevier Applied Science Publishers. London and New York.

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

-de Vries, W. Kapteijn, W. M. C.; van der Beek, E. G. and Stouthamer, A. H. Molar growth yields and fermentation balances of *Lactobacillus casei* L3 in batch cultures and in continuous cultures. J. Gen. Microbiol. (1970) 63: 333-345.

-de Vries, W. and Stouthamer, A. H. Fermentation of glucose, lactose, galactose, mannitol and xylose by bifidobacteria. J. Bacteriol. (1968) 96: 472-478.

-Driessen, F. M. and de Boer, R. Fermented milks with selected intestinal bacteria: a healthy trend in new products. Neth. Milk Dairy J. (1989) 43: 367.

-Driessen, F. M.; Kingma, F. and Stadhouders, J. Evidence that *Lactobacillus bulgaricus* in yogurt is stimulated by carbon dioxide produced by *Streptococcus thermophilus*. Neth. Milk Dairy J. (1982) 36: 135.

-Driessen, R. M.; Ubbels, J. and Stadhouders, J. Continuous manufacture of yogurt. Biotechnol. Bioeng. (1977) 19: 821.

-Dubos, R. J. Pasteur I y II. 1985. Salvat Editores, S. A. Barcelona.

-Farrow, J. A. E. and Collins, M. D. DNA base composition, DNA/DNA homology and long chain fatty acid studies on *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. J. Gen. Microbiol. (1984) 130: 357-362.

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

-Font de Valdez, G.; Savoy de Giori, G.; Pesce de Ruiz Holgado, A. and Oliver, G. Protective effect of adonitol on lactic acid bacteria subjected to freeze-drying. *Appl. Environ. Microbiol.* (1983) 45: 302.

-Fordyce, A. W.; Crow, V. L. and Thomas, T. D. Regulation of product formation during glucose or lactose limitation in non-growing cells of *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* (1984) 48: 332.

-Galesloot, Th. E.; Hassing, F. and Veringa, H. A. Symbiosis in yoghurt (I). Stimulation of *Lactobacillus bulgaricus* by a factor produced by *Streptococcus thermophilus*. *Neth. Milk Dairy J.* (1968) 22: 50.

-Garvie, E. I. Taxonomy and Identification of bacteria important in cheese and fermented dairy products. Chapter 2 in F. L. Davies and B. A. Laws (eds). *Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk.* 1984. Elsevier Applied Science Publishers, London.

-Gazeau, C. et Dereuddre, J. Effets des substances cryoprotectrices au niveau cellulaire. Bull. Soc. Bot. Fr. (1986) 133: Actual. Bot. 41.

-Ghera, R. L. Preservation. Chapter 12 in Manual of Methods for General Bacteriology. 1981. Ed. by American Society for Microbiology.

-Gilliland, S. E. and Speck, M. L. Relationship of cellular components to the stability of concentrated lactic streptococcus cultures at - 17°C. Appl. Microbiol. (1974) 27: 793.

-Hardie, J. M. Genus *Streptococcus*. Vol. 2. section 12 in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1986. Ed. by Williams and Wilkins.

-Heckly, R. J. and Quay, J. A brief review of liophilization damage and repair in bacterial preparations. Cryobiology (1981) 18: 592.

-Hemme, D. H.; Schmal, V. and Auclair, J. E. Effect of addition of extracts of thermophilic lactobacilli on acid production by *Streptococcus thermophilus* in milk. J. Dairy Res. (1981) 48: 139.

-Hepner, G.; Fried, R.; St Jeor, S.; Fuseti, L. and Morin, R. Hypocholesteremic effect of yoghurt and milk. Am. J. Clin. Nut. (1979) 32: 19.

-Higashio, K.; Yoshioka, Y. and Kikuchi, T. Isolation and identification of growth factor of *L. bulgaricus* produced by *S. thermophilus*. J. Agric. Chem. Soc. Jap. (1977a) 51: 209.

-Higashio, K.; Yoshioka, Y. and Kikuchi, T. Isolation and identification of growth factor of *S. thermophilus* produced by *L. bulgaricus*. J. Agric. Chem. Soc. Jap. (1977b) 51: 203.

-Hopner, T. and Knappe, J. Determination with formate dehydrogenase. Vol 3, Pag 1551 in Methods of Enzymatic Analysis. 2nd ed. 1974 Ed by A. V. Bergmeyer. Academic Press, New York.

-Hutkins, R. W. and Morris, H. A. Carbohydrate metabolism by *Streptococcus thermophilus*: a review. J. Food Protect. (1987) 50: 876.

-Johnson, P. A.; Jones-Mortimer, M. C. and Quayle, J. R. Use of a purified bacterial formate dehydrogenase for the micro-estimation of formate. Biochim. Biophys. Acta. (1964) 89: 351.

-Juillard, V.; Spinnler, H. E.; Desmazeaud, M. J. et Bouquieu, C. Y. Phénomènes de coopération et d'inhibition entre les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière. Le Lait (1987) 67: 149.

-Juven, B. J. A simple method for long-term preservation of stock cultures of lactic acid bacteria. J. Appl. Bacteriol. (1979) 47: 379.

-Kandler, O. and Weiss, N. Genus **Lactobacillus**. Vol. 2. Section 14 in in Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. 1986. Ed. by Williams and Wilkins.

-Knappe, J.; Blaschkowski, H. P.; Grobner, P. and Schmitt, T. Pyruvate formate-lyase of **Escherichia coli**: the acetyl-enzyme intermediate. Eur. J. Biochem. (1974) 50: 253.

-Kosikowski, F. V. The fermentation of milk. Chapter 2 in Cheese and Fermented Milk Foods. 1982. Kosikowski and Associates, Brooktondale, New York.

-Laidler, K. J. and Bunting, P. S. Molecular kinetics. Chapter 7 in The chemical kinetics of enzyme action. 1973. Clarendon Press. Oxford.

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

-Lindmark, D. G.; Paoletta, P. and Wood, N. P. the pyruvate formate lyase system of **Streptococcus faecalis**. J. Biol. Chem. (1969) 244: 3605.

-Louvand-Funel, A. et Desens, C. Constitution en acides gras des membranes des bactéries lactiques du vin. Sci. Aliments (1990)10: 817.

-Mahler, H. R. and Cordes, E. H. Coenzymes. Chapter 8 in Biological Chemistry. 1971. Harper and Row, New York.

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

-Mazur, P. Physical and chemical basis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing. Chapter 6 in Cryobiology. 1966. Ed by H. T. Meryman. Academic Press. London and New York.

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

-Moletta, R. et Albagnac, G. Caracteristiques cinétiques et rendements de la fermentation lactique sur saccharose. Sci. Aliments. (1984) 4: 201.

-Moss, G. W. and Speck, M. Injury and death of *Streptococcus lactis* due to freezing and frozen storage. Appl. Microbiol. (1963) 11: 326.

-Neimark, H. and Tung, M. C. Properties of fructose 1,6-diphosphate activated lactate dehydrogenase from *Acholeplasma laidlawii* type A. J. Bacteriol. (1973) 114: 1025.

-Oberg, C. J.; Davis, L. H.; Richardson, G. H. and Ernstrom, C. A. Manufacture of cheddar cheese using proteinase negative mutants of *Streptococcus cremoris*. J. Dairy Sci. (1986) 69: 2975.

-Orla-Jensen, S. (1931). Citado por Tamime y Robinson (1985a).

-Peral del Portillo, M. C.; Amoroso, M. J. and Oliver, G. Culture medium for the differential enumeration of lactic acid bacteria in yoghurt. Milchwissenschaft (1988) 43: 490.

-Porubcan, R. S. and Sellars, R. L. An agar medium for the differentiation of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. J. Dairy Sci. (1973) 56: 634.

-Quayle, J. R. Formate dehydrogenase. Methods Enzymol. (1966) 9: 360.

-Radke-Mitchell, L. C. and Sandine, W. E. Associative growth and differential enumeration of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*: A review. J. Food Prot. (1984) 47: 245.

-Radke-Mitchell, L. C. and Sandine, W. E. Influence of temperature on associative growth of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus*. J. Dairy Sci. (1986) 69: 2558.

-Rasic, J. and Kurmann, J. A. The nutritional-physiological value of yogurt. Chapter 7 in *Yoghurt; scientific grounds, technology, manufacture and preparations*. 1978. Tech. Dairy Publ. House, Copenhagen, DK.

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

-Richardson. G. H. USU's growing lactic culture system. *Utah Sci.* (1983) **44**: 60.

-Robinson, R. K. Cultures for yogurt-their selection and use. *Dairy Ind. Int.* (1988) **53**: 15.

-Ross, G. D. Observation on the effects of inoculum pH on the growth and acid production of lactic streptococci in milk. *Australian J. Dairy Technol* (1980) **35**: 147.

-Rudolph, A. and Crowe, J. H. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* (1985) **22**: 367.

-Shahani, K. M. and Friend, B. A. Properties of and prospects for cultured dairy foods. Pág. 257 in *Food Microbiology. Advances and Prospects*. 1983. Symposium Series No 11 of the Society for Applied Bacteriology. Ed. by T. A. Roberts and F. A. Skinner. Academic Press.

- Shankar, P. A. and Davies, F. L. Associative bacterial growth in yogurt starters; initial observations on stimulatory factors. J. Soc. Dairy Technol. (1976) 30: 31.
- Sherman, J. The streptococci. Bacteriol. Rev. (1937) 1: 3.
- Somkuti, G. A. and Steimberg, D. H. Adaptability of *Streptococcus thermophilus* to lactose, glucose and galactose. J. Food Protect. (1979) 42: 881, 887.
- Stryer, L. Introducción a las membranas biológicas. Capítulo 10 en Bioquímica. 1982. Ed. Reverté S. A. España.
- Susuki, I.; Kitada, T.; Kato, S.; Yano, N. and Morichi, T. Growth of *Lactobacillus bulgaricus* in milk. 1. Cell elongation and the role of formic acid in boiled milk. J. Dairy Sci. (1986) 69: 311.
- Takahashi, S.; Abbe, K. and Yamada, T. Purification of pyruvate formate lyase from *Streptococcus mutans* and its regulatory properties. J. Bacteriol (1982) 149: 1034.
- Tamime, A. Y. and Deeth, H. C. Yogurt: Technology and biochemistry. J. Food Prot. (1980) 43: 939.
- Tamime, A. Y. and Robinson, R. K. Microbiology of yoghurt starter cultures. Chapter 6 in Yoghurt. Science and Technology. 1985a. Pergamon Press.

- Tamime, A. Y. and Robinson, R. K. The nutritional value of yogurt. Chapter 9 in *Yoghurt. Science and Technology*. 1985b. Pergamon Press.
- Thauer, R. K.; Kirchniawy, F. H. and Jungerman, K. A. Properties and function of the pyruvate formate-lyase reaction in clostridia. *Eur. J. Biochem.* (1972) **27**: 282.
- Thomas, T. D. and Crow, V. L. Selection of galactose fermenting *S. thermophilus* in lactose limited chemostat cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* (1984) **48**: 186.
- Thomas, T. D.; Turner, K. W. and Crow, V. L. Galactose fermentation by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*: pathways, products and regulation. *J. Bacteriol.*(1980) **144**: 672.
- Thunell, R. K. and Sandine, W. E. Frozen starters from internal pH control grown cultures. *J. Dairy Sci.* (1984) **67**: 24.
- Tsvetkov, T. and Shishkova, I. Studies on the effect of low temperatures on lactic acid bacteria. *Cryobiology* (1982) **19**: 211.
- Turner, K. W.; Davey, G. P.; Richardson, G. H. and Pearce, I. E. The development of a handling system to replace traditional mother cultures. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* (1979) **14**: 16.
- Vallery-Radot, R. *La vida de Pasteur*. 1945. Editorial Juventud Argentina, S. A. Buenos Aires, Argentina.

-Veringa, H. A.; Galesloot, Th. E. and Davelaar, H. Symbiosis in yogurt (II). Isolation and identification of growth factor for *L. bulgaricus* produced by *S. thermophilus*. Neth. Milk Dairy J. (1968).22: 114.

-Volk, W. Correlation- Regression. Chapter 8 in Applied Statistics for Engineers. 1958. Mc Graw-Hill Book Company, Inc. Chemical Engineering Series.

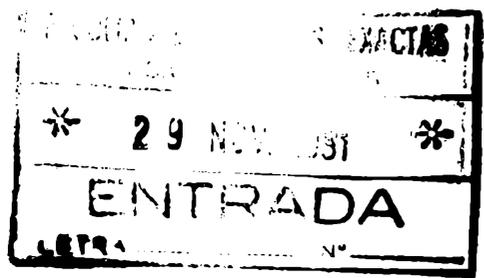
-Wittenberger, C. L. and Angelo, N. Purification and properties of a fructose 1,6-diphosphate- activated lactate dehydrogenase from *Streptococcus faecalis*. J Bacteriol. (1970) 101: 717.

-Wolin, M. J. Fructose 1,6 diphosphate requirement of streptococcal lactate dehydrogenases. Science. (1964) 146: 775.

-Wood, H. G. and Gest, H. Determination of formate. Methods Enzymol. (1957) 3: 285.

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

-Yamada, T. and Carlsson, J. Regulation of lactate dehydrogenase and change of fermentation products in streptococci. J. Bacteriol. (1975) 124: 55.



Pablo F. Pérez
PABLO F PÉREZ