

Estudio de la Actividad Ácido Láctica de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* y su Relación con el Perfil de Plásmidos Durante el Almacenamiento en Refrigeración

Juan Carlos Sigala¹, Martha Patricia Tafolla², Jose Pablo Pérez-Gavilán.

¹Instituto de Biotecnología e ²Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. E- mail: pgavilan@servidor.unam.mx, 56229190

Palabras clave: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, actividad láctica, plásmido

RESUMEN

Se analizó si existe relación entre la disminución de la actividad ácido láctica y la pérdida de plásmidos en *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* cuando es almacenado en refrigeración. Se realizaron cinéticas de crecimiento de este microorganismo en un biorreactor y se determinó la producción de ácido láctico y la actividad láctica de muestras cosechadas en fase exponencial y fase logarítmica de crecimiento. Estas mismas muestras celulares se almacenaron en refrigeración con y sin control de pH y se estudió la viabilidad celular, la producción de acidez, el pH y el perfil de plásmidos a diferentes días. Los resultados resaltan la importancia de controlar el pH durante el almacenamiento en refrigeración de estas bacterias, ya que resultó ser el factor determinante en la disminución de la actividad y no la pérdida de material genético como en un inicio se pensó.

Key words: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, lactic acid activity, plasmid

ABSTRACT

The correlation between lactic acid activity decrease and the lost of plasmid in *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* stored under refrigeration, was analyzed. Growth kinetics of this microorganism was performed in a bioreactor and samples were taken for lactic acid production and lactic acid activity from cells grown in exponential and

logarithmic growth phases. For this purpose, the cellular samples were stored in refrigeration with and without pH control and the cellular viability, acidity production, pH and plasmids profile at different days, were studied. The results emphasize the importance of controlling the pH during the bacterial storage in refrigeration as the determining factor in the activity reduction, and discarded the lost of the genetic material as the cause of its decline, as was initially thought.

INTRODUCCIÓN

Además de su ADN cromosomal, muchas bacterias poseen pequeñas moléculas de ADN circular llamados plásmidos los cuales se duplican de manera independiente y contienen información accesoria (Blanco, 1991). En las bacterias lácticas muchas cualidades de interés industrial, tales como el metabolismo de lactosa (Crown *et al.*, 1983; Maeda & Gasson, 1986), la producción de proteinasas (De Vos *et al.*, 1989) el transporte de citrato, los mecanismos de resistencia a fagos y la producción de bacteriocinas, se encuentran codificadas en plásmidos.

En aquellas cepas de *L. lactis* ssp. *lactis* consideradas buenas productoras de ácido láctico, los genes que codifican para el sistema de fosfotransferasa de lactosa (PTS lactosa), para la fosfo beta-galactosidasa y para la ruta de la tagatosa, puntos clave en el metabolismo de lactosa, se encuentran localizados en un solo operón identificado en plásmidos de 28 a 60 kb.

El significado comercial de las bacterias lácticas utilizadas en la manufactura de los productos lácteos fermentados se debe en gran medida a la capacidad de convertir la lactosa y otros azúcares en ácido láctico. *L. lactis* ssp. *lactis* forma parte de los denominados cultivos iniciadores (CI) los cuales se utilizan en la elaboración de todos los productos lácteos fermentados y su intervención como materia prima es determinante en la calidad del producto final. En nuestro país existe una gran demanda por los cultivos iniciadores y estos son distribuidos exclusivamente por compañías extranjeras.

Respecto al almacenamiento de los cultivos, la refrigeración representa una buena alternativa ya que requiere de equipo más sencillo y económico comparado con procesos de liofilización o congelación. Se ha encontrado que los cultivos líquidos refrigerados mantienen una viabilidad y una actividad láctica aceptable por un tiempo de 15 días. Sin embargo, pasado este tiempo las bacterias pierden casi en su totalidad la capacidad de producir ácido. Anteriormente se planteó la posibilidad de que esta disminución de actividad estuviera ligada a la pérdida de plásmidos. Con base en esto, se desarrollo el presente trabajo para abundar en el conocimiento de los aspectos relacionados con la actividad, los plásmidos y el efecto del pH en cultivos líquidos refrigerados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

La cepa empleada es *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BM147, perteneciente a la Colección de Cultivos del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM-48) de la Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. Dicha cepa se mantuvo en leche descremada estéril al 11% de sólidos totales, se resembró cada 2 semanas y se almaceno a 4°C.

Medios de cultivo

Leche descremada al 11% de sólidos totales, Agar APT (Agar, triptona, extracto de levadura, fosfato ácido de potasio, citrato de sodio, glucosa,

tween 80, silfato de magnesio, cloruro de manganeso, sulfato ferroso) (Evans y Nivel, 1951 y Deibel, Evans y Nivel, 1957), medio liquido Elliker modificado (Klaenhammer *et al.*, 1978), Agar Reddy modificado (Reddy *et al.*, 1969 y Reddy *et al.*, 1972) y medio industrial para fermentación (Goldhaber, 1982).

Cinéticas en biorreactor.

Se llevo a cabo en una jarra de acero inoxidable de 5 L adaptada a una consola New Brunswick Sci. Co. M-19-1400 que cuenta con agitación magnética, control de pH y de temperatura (Stanburry & Whitaker, 1989). Las condiciones fueron las siguientes (Córdova, 1990 y Chavarri *et al.*, 1988).

Tabla 1. Condiciones empleadas durante las cinéticas en biorreactor

Medio de cultivo	Medio industrial (MI)
Volumen de inóculo	5% v/v
Volumen operativo	3 L
Temperatura	29°C
pH	6.9-7.0
Agente neutralizante	NaOH 20% (5N)
Agitación	200 rpm
Tiempos de cosecha	4 y 8 h

Al momento de la cosecha de bacterias se interrumpió el control de temperatura con una unidad de enfriamiento Haake-KT33 que bombea agua entre 2 y 4°C. La velocidad de agitación y el control de pH se mantuvieron constantes. Cuando se alcanzó la temperatura de 4°C se colectaron las muestras, un litro para la muestra con control diario de pH (muestra MA) y 500ml para la muestra sin control de pH (muestra MB) y posteriormente se refrigeraron.

Determinaciones

Cuenta de microorganismos viables (CMV)

Se hizo por el método de vaciado en placa en agar APT a partir de diluciones decimales. Las cajas se incubaron a 29°C por 48 h y el conteo se expreso en UFC/ml (unidades formadoras de colonias/ml).

Producción de ácido láctico

Se determino a partir de la cantidad de NaOH al 20% que fue necesario añadir para mantener el pH constante (pH 6.9 o 7), considerando que para neutralizar una mol de ácido láctico (PM= 90 g/mol) se requiere de una mol de NaOH (PM= 40 g/mol).

Actividad láctica.

Expresa la capacidad que tiene una cepa de producir ácido láctico bajo las siguientes condiciones: 50 ml de leche descremada al 11% de sólidos totales pasteurizada (63°C, 30 min) se inoculó al 1% con los caldos de fermentación y se incubo a 30°C durante 6 h. Al cabo de este tiempo se tomó una alícuota de 9 ml y se tituló con NaOH 0.1N utilizando fenolftaleína como indicador; el gasto de NaOH 0.1N se expresa como % de ácido láctico. Bajo estas condiciones, el % de ácido láctico producido por el microorganismo menos la acidez inicial de la leche se denomina AL.

Actividad específica (AE)

Se expresa en nanomoles de ácido láctico producido por UFC en 5 h. Se obtuvo un valor de referencia a partir de un cultivo ejemplar para poder comparar los valores que se obtendrían a lo largo de la experimentación, este fue de 1.5×10^{-5} nanomoles de ác. láctico por UFC en 5 h de crecimiento. Para efecto de la experimentación se consideraron valores de AE anormales sólo aquellos que eran 10 veces mayores o menores que la referencia.

Medición de pH.

Se efectuó con un electrodo Beckman convencional adaptado a un potenciómetro Beckman 40.

Extracción de Plásmidos y Electroforesis.

Obtención de paquete celular.

La cepa de interés se sembró en 10 ml de medio líquido M-17 (Terzaghi & Sandine, 1975) con un inóculo al 1% y se incubó a 29°C toda la noche. Al día siguiente se resembró en 10 ml de medio Elliker modificado (inóculo al 2%) durante 4 h a 29°C y se centrifugó en frío a 3,000 rpm por 10 min para obtener así el paquete celular.

Extracción de plásmidos

Tabla 2. Soluciones empleadas para la extracción de plásmidos

<i>Solución I</i>	50mM Tris (pH 8) y 1mM EDTA (pH 8)
<i>Solución II</i>	50mM glucosa, 25mM Tris.Cl (pH 8), 10mM EDTA (pH 8) y lisozima (10 mg/ml)
<i>Solución III</i>	0.2 N NaOH y 1% de SDS (dodecil sulfato de sodio)
<i>Solución IV</i>	5M acetato de potasio (60ml), ácido acético glacial (11.5ml) y H ₂ O (28.5ml)

- Se suspendió y se lavo el paquete celular en 3 ml de solución I fría. Se centrifugo en frío a 3000 rpm por 10 min y se eliminó el sobrenadante.
- Se vuelve a suspender y a lavar en 1 ml de solución fría y en un tubo Eppendorf se centrifuga a 5,000 rpm por 5 min y se eliminó el sobrenadante.
- Se resuspendió en 10 µl de solución II. Se incubó a 37°C por 5 min.
- Se adicionaron 200 µl de solución III recién preparada y se mezcló. Se dejo en hielo por 5 min.
- Se adicionaron 150 µl de solución IV fría. Se mezcló y se dejo en hielo por 3 min.
- Se centrifugo a 12,000 rpm por 6 min a 4°C
- Se agregaron 2 µl de solución de RNA asa (10 mg/ml) y se incubo a 37°C por 5 min.
- Se adicionó 500 µl de fenol preparado y se mezcló.

- Se adicionaron 150 µl de una mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (24:1)
- Se centrifugo a 10,000 rpm por 8 min a temperatura ambiente
- Se removió la fase superior acuosa translúcida.
- Se adicionaron 0.6 vol de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se mantuvo a temperatura ambiente por 45 min
- Se centrifugo a 12,000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante aspirando con la micropipeta
- Se enjuagó el pellet de ADN con 50 µl de etanol al 70% frío. Se centrifugo a 12,000 rpm por 5 min a 4°C
- Se secó el pellet de ADN a temperatura ambiente por 5 min
- Se redisolvió el ADN en 10 µl de agua estéril y se guardó en congelador (-20°C). Al día siguiente se corrió la electroforesis.

Esta metodología de extracción de plásmidos se basó fundamentalmente en la técnica propuesta por Sambrook et al. (1989) con modificaciones por lo descrito por Currier & Nester (1976) Klaenhammer et al. (1978), LeBlanc & Lee (1979), Anderson & MacKay (1983), Orberg & Sandine (1984) y Frère (1994).

Electroforesis

Se llevo a cabo en un gel de agarosa (Aldrich et al., 1976) al 0.8% en buffer TAE (20 mM Tris, 10 mM ácido acético y 2 mM Na₂EDTA, pH 8) a 80 V durante 2.1 h. El volumen de muestra de ADN plasmídico en cada pozo de gel fue de 10µl Los géles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 15 min. El peso molecular de los plásmidos fue estimado a partir de una gráfica semilogarítmica de peso molecular contra movilidad relativa (rf), empleando los marcadores de peso molecular comerciales fago lambda digerido con *Hind*III o digerido con *Hind*III y *Eco*RI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de plásmidos

Se realizó la extracción de plásmidos de una cepa lactosa positiva (*lac*⁺) y una cepa lactosa negativa (*lac*⁻), con la finalidad de observar si la deficiencia para coagular la leche se relaciona con la pérdida de algún plásmido. Para ello, a partir de un cultivo viejo refrigerado de *L. lactis* en leche descremada al 11% de sólidos totales, se sembró superficialmente en placas de agar Reddy modificado y se incubó en anaerobiosis a 29°C por 48 h. En este medio las cepas *lac*⁻ son más pequeñas, de color blanco y no presentan halo (Reddy et al., 1969). Para la *lac*⁺ se sembró de manera superficial en placas de agar APT, incubándolas a 29°C por 48 h en anaerobiosis. En la Fig. 1 se muestran los perfiles de plásmidos de una cepa *lac*⁺ y de una cepa *lac*⁻ de *L. lactis* ssp. *lactis*.

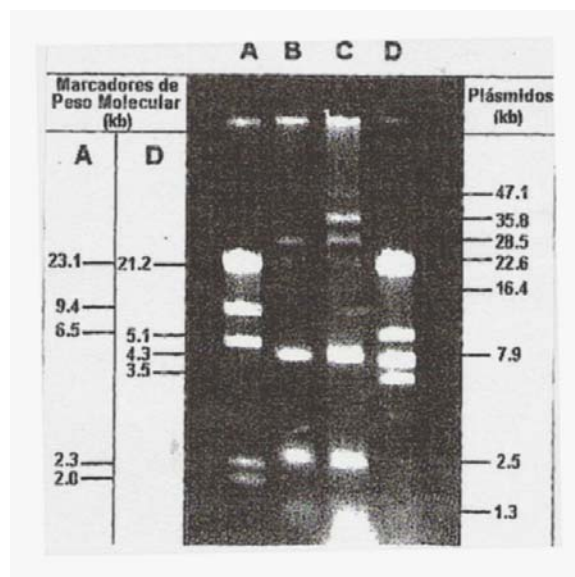


Fig. 1. Perfil de plásmidos de *L. lactis* ssp. *lactis* lactosa⁺ y lactosa⁻. (A) Marcador de peso molecular (fago λ cortado con *Hind* III). (B) *L. lactis* ssp. *lactis* *lac*⁻. (C) *L. lactis* ssp. *lactis* *lac*⁺. (D) Marcador de peso molecular (fago λ cortado con *Hind*III y *Eco*RI).

En el perfil de plásmidos de la cepa *lac*⁺ se observan 8 bandas de diversos pesos moleculares. También se observa que el perfil de plásmidos de la cepa *lac*⁻ carece de la segunda banda (35,792 pb);

podríamos afirmar que en ese plásmido específicamente, se encuentra localizado el operón de lactosa necesario para el transporte e hidrólisis de este disacárido por el sistema fosfo enol piruvato-fosfo transferasa (PTS) y de la vía de la tagatosa, tal y como se ha reportado en la bibliografía para otro tipo de cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* lactosa positivas a lo largo de los últimos años (Mckay *et al.*, 1972; Mckay & Baldwin, 1974; Efstathiou & Mckay, 1976; Klaenhammer *et al.*, 1978; Crow *et al.*, 1983; Gasson, 1983 y Sinha 1989). En varias de estas referencias se ha establecido que el plásmido en cuestión suele ser de los de mayor peso molecular del perfil y va de las 28 a las 60 kb, lo cual también coincide con nuestros resultados.

Tabla 3. Pesos moleculares de los plásmidos de la cepa Lac⁺ de *L. lactis* ssp. *lactis*.

Número de plásmido	Peso molecular (pb)
1	47,122
2	35,792
3	28,461
4	22,632
5	16,420
6	7,886
7	2,507
8	1,320

Los pesos moleculares de los plásmidos son mostrados en la Tabla 3. Como puede apreciarse en esta tabla, el perfil de plásmidos es muy parecido a los reportados en la bibliografía, en especial a los obtenidos por Sinha (1989), Orberg & Sandine (1984) y Anderson & McKay (1983).

Como es sabido en la industria láctea, los iniciadores deficientes son aquellos que no coagulan la leche después de 16 h de incubación a 21°C o después de 6 h a 29°C, empleándose un inóculo al 1%. Esta deficiencia no solamente se debe a la pérdida de la capacidad para metabolizar la lactosa sino que también interviene el sistema de

proteinasas que dota a las células de los péptidos y aminoácidos necesarios para su crecimiento. Algunos investigadores han encontrado una pérdida simultánea de la capacidad de metabolizar lactosa y de producir proteinasas (McKay & Baldwin, 1974) e incluso otros lo asocian a un mismo plásmido de alto peso molecular entre 50 y 60 kb (Gasson, 1983). En nuestro trabajo sólo se evaluó la calidad de la cepa en relación a su capacidad de producir ácido. Las cepas que carecían del segundo plásmido de 35.8 kb las hemos identificado como lac⁻ pero cabe la posibilidad de que su deficiencia se deba a la carencia del sistema de proteínasa o a un efecto combinado. Por el momento se ha demostrado la pérdida de un plásmido específico en aquellas cepas deficientes para coagular la leche.

Cinéticas en biorreactor

L. lactis ssp. *lactis* alcanza la fase estacionaria de crecimiento pasadas las 6 h. Era de interés llevar a cabo una cinética a las 8 h de incubación (F8), para tener una población en fase estacionaria de crecimiento y una cinética a las 4 h (F4) para tener una población en fase exponencial, para que se pudieran contrastar los resultados obtenidos en ambas situaciones.

Tabla 4. Resultados de las determinaciones de cuenta total de microorganismos, producción de ácido láctico, actividad y actividad específica durante las cinéticas a las 4 y 8 h de

DETERMINACION	CINETICA	
	4 h	8 h
Cuenta total de microorganismos (UFC/ml)	5.26 x 10 ⁹	1.78 x 10 ¹⁰
Producción de ac. láctico (g ac. láctico/L de medio)	8	37.7
Actividad	0.44	0.48
Actividad específica (nmoles de ac. láctico/UFC en 5 h)	1.5 x 10 ⁻⁵	1.5 x 10 ⁻⁵

Incubación. Los valores de actividad específica (AE) obtenidos en las dos cinéticas de trabajo están cercanos al valor de referencia (1.5×10^{-5} nmol ácido láctico/UFC en 5 h), por lo tanto, se consideran valores normales. La AE es útil al equiparar la capacidad de producción de ácido de muestras que contengan distinta cantidad de bacterias como ocurre en el transcurso de las cinéticas de este trabajo.

El tiempo de duplicación promedio fue de 60 min \pm 0.1. Este valor coincide con lo descrito por Sandine (1996) para varias bacterias lácticas mesófilas.

Almacenamiento a 4°C

En las muestras almacenadas a partir de la cinética de 8 h fue necesario agregar 27.4 ml de NaOH al 20% para tener control de pH cercano a la neutralidad, de los cuales 25 ml fueron agregados los primeros 7 días. En cuanto a la cuenta total de microorganismos, se observa una fuerte disminución de la población microbiana; a los 30

días de almacenamiento prácticamente todas las bacterias han muerto, independientemente del control de pH (Tabla 5). La actividad para este conjunto de muestras también disminuye al transcurrir el tiempo. Por otro lado, los valores de AE se consideran normales pues estuvieron cercanos a la referencia excepto en el caso de la MB-F8 a los 29 días, en donde el valor fue diez veces mayor. Esto último pudiera significar que las bacterias sobrevivientes son incluso mejores productoras de ácido o por lo menos no han perdido esta capacidad; esto se corroboró al sembrar algunas de estas colonias en leche y la coagularon perfectamente después de un periodo normal de incubación.

Para el caso de las muestras cosechadas y almacenadas a partir de la cinética de 4 h, se controló el pH agregando un total de 93.6 ml de NaOH al 20%. En cuanto a la cuenta total de microorganismos, la diferencia más notable se presenta al término del almacenamiento en la

Tabla 5. Resultados de pH, cuenta total de microorganismos, actividad y actividad específica durante el almacenamiento a 4°C de ambas cinéticas con y sin control de pH (= se refiere a un valor de AE igual al de la referencia).

ALMACENAMIENTO A 4°C												
	Cinética de 4 h						Cinética de 8 h					
	Control de pH MA-F4			Sin control pH MB-F4			Control de pH MA-F8			Sin control de pH MB-F8		
DETERMINACIÓN	Día 1	Día 14	Día 28	Día 2	Día 15	Día 29	Día 1	Día 14	Día 28	Día 2	Día 15	Día 29
pH	7	7	7	5.58	4.78	4.68	7	7	7	5.6	5.24	5.02
Cuenta total de bacterias. (%)	100	82.5	67.3	100	67.3	0.7	100	35	1.5	100	29	2.1
Actividad (%)	100	78.2	65.6	100	61	2.2	100	74	21.4	100	58.2	7.1
Actividad específica	=	=	=	=	=	> 10 veces	=	=	=	=	=	> 10 veces

Muestra sin control de pH, pues apenas sobrevive un 0.7% de la población; en esta misma muestra se presenta la mayor disminución de actividad. Los valores de AE para estas muestras se consideraron normales excepto la del día 29 sin control de pH, que nuevamente fue diez veces mayor a la referencia.

El grupo de células con mejor comportamiento durante el almacenamiento fue la muestra cosechada en fase exponencial y con control de pH durante el almacenamiento (MA-F4). Estas células presentan una actividad metabólica alta al ser cosechadas de tal forma que al neutralizar el ácido láctico producido durante el almacenamiento, se ven estimuladas a seguir consumiendo la lactosa y demás nutrientes, sin peligro de daño por efecto de la disminución de pH, lo que las hace sobrevivir de mejor manera.

Por otro lado, el control de pH en la muestra cosechada a las 8 h (MA-F8) fue favorable únicamente los primeros 15 días de almacenamiento; esto quizá se deba a que estas bacterias fueron cosechadas en plena fase

estacionaria de crecimiento lo cual implica tener una desacelerada actividad metabólica ocasionando que las células gradualmente mueran, no obstante tener un pH cercano a la neutralidad. Sin embargo, los valores de actividad siempre fueron mejores en la muestra que contó con control de pH debido a que no existió daño por exposición prolongada al ácido láctico.

Por otra parte, se observó en los perfiles de plásmidos de todas las muestras una disminución gradual de la concentración de material genético ya que las bandas fueron cada vez menos intensas. Esto indica que existe una pérdida general del material genético durante el almacenamiento, independientemente de que las células provengan de una población en fase exponencial o en fase estacionaria de crecimiento y de que se tenga un control o no de pH.

En la tabla 6 se han agrupado los porcentajes de las poblaciones de las diferentes muestras durante el almacenamiento que presentaron determinado plásmido en su perfil.

Tabla 6. Porcentaje de células en las que aparece determinado plásmido en su perfil

HORAS DE COSECHA	CONTROL DE pH	DIA DE ALMACENAMIENTO	NÚMERO DE PLÁSMIDO Y PESO MOLECULAR (pb)							
			1 47,122	2 35,792	3 28,461	4 22,632	5 16,420	6 7,886	7 2,507	8 1,320
8	SI	1	90	90	10	90	90	100	100	100
		14	100	100	80	100	100	100	100	100
		28	80	100	60	80	20	100	100	100
	NO	2	90	100	50	90	80	100	100	100
		15	100	100	70	100	90	100	100	100
		29	80	100	60	100	40	100	100	100
4	SI	1	90	90	90	100	90	90	100	90
		14	90	100	20	80	80	100	100	90
		28	90	100	60	80	40	100	100	100
	NO	2	100	100	70	100	100	100	100	100
		15	90	90	30	90	80	100	100	100
		29	60	100	70	70	30	100	100	100

Como ya se había mencionado, al comparar los perfiles de los plásmidos de las cepas lac⁺ con las cepas lac⁻ se determinó que el plásmido que contenía la información necesaria para el metabolismo de lactosa era el número dos (36 kb) por lo que era importante conocer el comportamiento que pudiera tener esta banda a lo largo del almacenamiento, ya que en el trabajo de Córdova (1994) se sospechaba que la disminución de la actividad durante el almacenamiento pudiera estar ligada a la pérdida de algún plásmido.

A lo largo del almacenamiento se observó que el plásmido número dos se conservó en el 90 o 100% de las poblaciones de las diferentes muestras y a diferentes días. Es claro que no existe una pérdida específica y gradual de este plásmido y por lo tanto no es responsable directo de la disminución de la actividad ácido láctica. Como ya ha sido establecido anteriormente, parece ser que el control de pH favorece la supervivencia de las células, siendo este el factor determinante para tener una buena actividad.

Los plásmidos más inestables fueron el número tres de 28,461 pb y el número cinco de 16,420 pb. En las dos muestras de la cinética a las 8 h, la mayor pérdida del plásmido tres se presentó en los primeros días de almacenamiento y en las muestras de la cinética a las 4 h, a la mitad del almacenamiento; en ambos casos el control de pH no parece influir en la aparición de este plásmido. En todas las muestras en los primeros 15 días, el plásmido cinco aparece en un 80 a 100% de la población, pero al cabo del periodo sólo aparece en un 40% tanto en la MA-F4 como en la MB-F8, en un 30% de la MB-F4 y en un 20% en la MA-F8. Se observa que este plásmido disminuye invariablemente al término de los periodos de almacenamiento independientemente del control de pH.

CONCLUSIONES

- La disminución de la actividad láctica de *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis*, cuando es

almacenado en refrigeración en el medio líquido en el que fue producido, no se debe a la pérdida específica de uno o más plásmidos, sino al marcado deceso de células, de tal forma que cuando se realiza la determinación de la actividad, el inóculo cada vez es menor.

- El control de pH en las muestras almacenadas a 4°C evita la muerte celular, lo que a su vez provoca el tener valores de actividad aceptables
- El control de pH origina mejores resultados en las muestras cosechadas a las 4 h que en las de 8 h; la vida útil para cada caso es de 28 y 14 días respectivamente.
- Se propone conservar las bacterias lácticas en refrigeración empleando el mismo medio en el que fueron producidas y contando con control de pH.

REFERENCIAS

- Aldrich MJ, Sánchez D, Elwell L & Falkow S (1976) Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* 127: 1529- 1537.
- Anderson DG & McKay LL (1983) Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from *Streptococcus lactis*. *Appl. Environm. Microbiol.* 46: 549-552.
- Blanco A (1991) Química biológica. Editorial El Ateneo. 5ª edición, 2ª reimpresión. Argentina
- Córdova AMS (1994) Variaciones en la capacidad de producción de ácido láctico y pH durante la producción y almacenamiento de las cepas *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* BM147 y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* BM 149 y su correlación con el perfil de plásmidos. Tesis de grado de maestría en biotecnología. UACPyP, CCH, UNAM, México, PP 59
- Crow VL, Davey, GP, Pearce LE & Thomas TD (1983) Plasmid linkage of the D-tagatosa 6-phosphate pathway in *Streptococcus lactis*: Effect

- on lactose and galactose metabolism. *J. Bacteriol.* 153: 76-83
- Currier TC & Nester EW (1976) Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. *Anal. Biochem.* 76: 431-441
- Chavarri FJ, De Paz M, & Núñez M (1988) Optimization of fermentation parameters for the production of concentrated starters from nonbitter *Streptococcus lactis* INIA 12. *J. Food Sci.* 53: 1854-1857.
- Deibel RH, Evans JB & Niven CF (1957) Microbiological assay for the thiamin using *Lactobacillus viridescens*. *J. Bact.* 74: 818-821.
- De Vos WM & Simons G (1988) Molecular cloning of lactose genes in dairy lactic streptococci: the phosphor- α -galactosidase and beta-galactosidase genes and their expression products. *Biochimie* 70: 461-473.
- De Vos WM, Vos P, Simons G & David S (1989) Gene organization and expression in mesophilic lactic acid bacteria. *J. Dairy Science.* 72: 3398-3405.
- Evans JB & Niven CF (1951) Nutrition of the heterofermentative Lactobacilli that cause greening of cured meat products. *J. Bact.* 62: 599-603.
- Frère J (1994) Simple method for extracting plasmid DNA from lactic acid bacteria. *Letters in Appl. Microbiol.* 18: 227-229.
- Gasson MJ (1983) Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J. Bacteriol.* 154: 1-9.
- Goldhaber (1982) Estudios para la producción y conservación de algunos microorganismos de interés lactológico. Tesis de grado de maestría en ciencia y tecnología de alimentos. UI. México. PP 126.
- Klaenhammer TR, McKay LL & Baldwin KA (1978) Improved lysis of group N streptococci for isolation and rapid characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Appl. Environm. Microbiol.* 35: 592-600.
- Kuhl SA, Larsen LD & McKay LL (1979) Plasmid profiles of lactose-negative and proteinase-deficient mutants of *Streptococcus lactis* C10, ML3 y M18. *Appl. Environm. Microbiol.* 37: 1193-1195.
- Leblanc DJ & Lee LN (1979) Rapid screening procedure for detection of plasmids in Streptococci. *J. Bacteriol.* 140: 1112-1115
- Maeda S & Gasson M (1986) Cloning, expresión and location of the *Streptococcus lactis* gene for phospho- β -galactosidase. *J. Microbiol.* 132: 331-340.
- McKay LL & Baldwin KA (1974) Simultaneous loss of proteinase-and-lactose-utilizing enzyme activities in *Streptococcus lactis* and reversal of loss by transduction. *Appl. Bacteriol.* 28: 342-346.
- McKay LL, Baldwin KA & Zottola EA (1972) Loss of lactose metabolism in lactic Streptococci. *Appl. Bacteriol.* 23: 1090-1096.
- Orberg PK & Sandine WE (1984) Microscale method for rapid isolation of covalently closed circular plasmid DNA from group N Streptococci. *Appl. Environm. Microbiol.* 47: 677-680.
- Reddy MS, Vedamuthu ER, Washam CJ & Reinbold GW (1969) Differential agar médium for separating *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *Appl. Microbiol.* 18: 755-759.
- Reddy MS, Vedamuthu ER, Washam, CJ & Reinbold GW (1972) Agar medium for differential enumeration of lactic Streptococci. *Appl. Microbiol.* 24: 947-952.
- Sambrock J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Book 1. Cold Spring Harbor Laboratory. USA.
- Sandine WE (1996) Commercial production of dairy starter cultures. In: Dairy starters cultures. Cogan TM & Accolas JP (eds) VCH Publishers Inc. USA., pp. 191-206.
- Sinha RP (1989) A new simple method of curing plasmids in lactic Streptococci. *FEMS Microbiol. Letters*, 57: 349-352.

- Stanbury PF & Whitaker A (1989) Principles of fermentation technology. Pergamon Press. USA.
- Terzagui BE & Sandine WE (1975) Improved medium for lactis streptococci and their bacteriophages. Appl. Microbiol. 29: 807-813.