

2. Bacterias ácido-lácticas

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) se encuentran ampliamente distribuidas en diferentes ecosistemas; además, se desarrollan a gran escala en los procesos para la producción comercial de alimentos fermentados, bebidas alcohólicas, levaduras para la cerveza y vinos; y son utilizadas en fermentaciones cárnicas (Almanza y Barrera, 1991), en la producción de queso, mantequilla, yogur, salchichas, olivos, uvas y cereales, como pan, preservando y proporcionando propiedades sensoriales y nutricionales a los productos alimenticios (Arribas y Polo, 2008; Hugenholtz, 2008; Savadogo *et al.*, 2006).

Las BAL desempeñan un papel importante en los procesos de fermentación; son muy utilizadas en la industria alimentaria, no solamente por su habilidad para acidificar y, por lo tanto, preservar alimentos de las esporas, sino también por su implicación en la textura, sabor, olor y desarrollo de aroma de alimentos fermentados (Axelsson, 1993). El conocimiento de cultivos lácticos se originó en el siglo XVIII, cuando agricultores de África, Asia y Europa observaron el comportamiento de la leche cruda en los meses cálidos; la leche coagulaba, y bajo esta condición presentaba un sabor diferente, en ocasiones agradable; entonces los campesinos fueron seleccionando las de mejor sabor para inocular la leche al día siguiente (Bedolla *et al.*, 2004). Las BAL vivas pueden estar contenidas en un grupo de microorganismos llamados cultivos lácticos o iniciadores (Bertrand *et al.*, 2003; Bouzar *et al.*, 1997), se emplean en la industria láctea para la elaboración de leches fermentadas, quesos, mantequilla (Blanco *et al.*, 2006) y otros productos que para su obtención requieren ser fermentados (Bertrand *et al.*, 2003). Se distinguen tres clases de cultivos: el cultivo inicial, el cultivo madre y el cultivo usual. Los cultivos *estarter* son puros; a partir de estos se prepara el cultivo madre, y luego del cultivo madre se desarrolla el cultivo usual para ser empleado directamente en procesos fermentativos (Castro y Rovetto, 2006).

Las BAL son un grupo de bacterias relacionadas que producen ácido láctico como el principal metabolito (Devlieghere *et al.*, 2004) o único producto de fermentación (Duboc y Mollet, 2001); son microorganismos nutricionalmente exigentes, capaces de hidrolizar péptidos de la leche (Early, 2000; Pescuma *et al.*, 2008). La concentración de aminoácidos libres en la leche es muy limitada, así el crecimiento sostenido de BAL depende de la producción de proteinasas peptidasas y sistema de transporte de aminoácidos y péptidos específicos (Pescuma *et al.*, 2008).

Además de producir el ácido láctico, las bacterias acidificantes, llamadas también bacterias iniciadoras, contribuyen al sabor, aroma, textura y al valor nutricional de alimentos fermentados a través de la producción de exopolisacáridos (EPS) (Arribas y Polo, 2008), lo anterior debido a su actividad metabólica sobre proteínas, azúcares y lípidos, lo que contribuye a la digestibilidad de los alimentos y a la preservación del producto final (Pescuma *et al.*, 2008).

2.1 Clasificación

Las BAL pertenecen al *phylum Firmicutes*, que comprende alrededor de 20 géneros; *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* son los principales miembros de las BAL; el *Lactobacillus* es el más grande de estos géneros (Bouzar *et al.*, 1997; Devlieghere *et al.*, 2004, Gálvez *et al.*, 2007; Jagnow y Wolfgang, 1991).

El tipo y la característica de los organismos iniciadores que son utilizados en la producción de leches fermentadas son los dos más importantes factores que determinan la calidad del producto final. El criterio esencial para la selección de iniciadores incluye acidificación, aroma, sabor, estabilidad y textura (Laws *et al.*, 2001); estos se pueden clasificar de varias maneras, según su forma, temperatura de crecimiento, funciones, fermentación de la lactosa y otros (Neira y López, 2001).

Según la fermentación de la lactosa, las BAL se clasifican en homofermentativas (producen solo ácido láctico) y heterofermentativas (producen ácido láctico y otras sustancias), y según la temperatura de crecimiento, en mesófilas y termófilas (Bertrand *et al.*, 2003).

Homofermentativas

El grupo homofermentativo, compuesto por *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*, utiliza la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas al convertir 1 mol de glucosa en dos moles de ácido láctico (Almanza y Barrera, 1991), además de que produce más del 85% de ácido láctico a partir de glucosa. En contraste, las bacterias heterofermentativas producen cantidades equimolares de lactato, CO₂ y etanol a partir de glucosa usando la hexosa monofosfato o la vía de las pentosas, y así solamente generan la mitad de la energía del grupo homofermentativo (Almanza y Barrera, 1991).

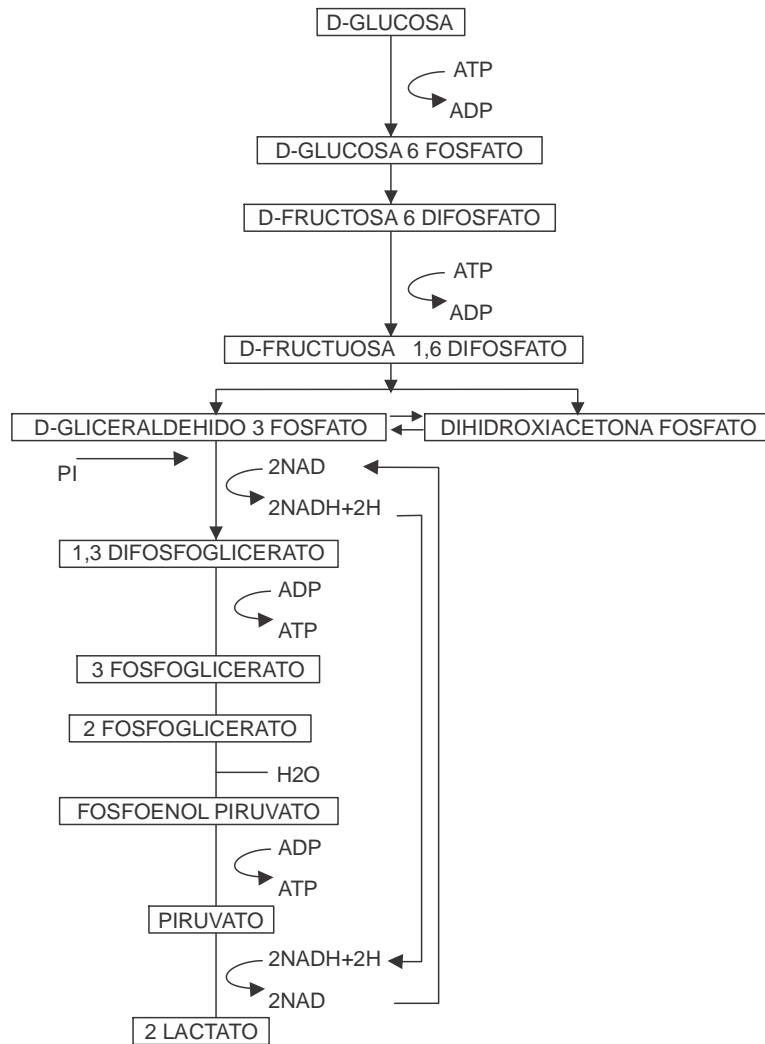


Figura 1. Fermentación homoláctica

En la figura 1 se observa que el ácido láctico es el principal producto de esta fermentación. Las bacterias pertenecientes a este grupo tienen las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa, pero carecen de la fosfoetolasa. Dentro de este grupo se encuentran: *Lactobacilos* de bastones largos aislados o en cadenas cortas, termófilos, acidificantes muy energéticos y de actividad caseolítica notable; *Streptococcus* de formas esféricas en cadenas, con acidificación rápida y poca actividad caseolítica (Hernández *et al.*, 2007).

Heterofermentativas

Las heterofermentativas producen solamente 50% de ácido láctico; fermentan 1 mol de glucosa para formar 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO₂. 1 mol de ATP es generado por mol de glucosa (Devlieghere *et al.*, 2004; Ly *et al.*, 2008). Este grupo está compuesto por un número de géneros que incluyen: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Este grupo de bacterias contiene la enzima fosfoacetolasa, pero carece de la aldolasa y de la hexosa isomerasa; así, en lugar de seguir la vía (EMP), utiliza las vías de la hexosa monofosfato o la de la pentosa (Almanza y Barrera, 1991).

Las especies heterolácticas obligadas utilizan solamente la ruta dependiente fosfoacetolasa para metabolizar azúcares, y, además de ácido láctico, producen cantidades significativas de ácido acético o etanol, con la generación de dióxido de carbono; la D-galactosa puede ser metabolizada a través de la ruta tagatosa 6-fosfato o ruta Leloir (véase figura 2) (Almanza y Barrera, 1991). Estas especies fermentativas metabolizan hexosas a través de la ruta glicolítica Embden-Meyerhoff, pero las pentosas y algunas otras sustancias son metabolizadas vía fosfoacetolasa para producir ácido láctico y otros productos (típicamente ácido acético y etanol) (véase figura 3). Miembros de las BAL pueden ser subdivididos en dos grupos, basados en su metabolismo de carbohidratos (Almanza y Barrera, 1991).

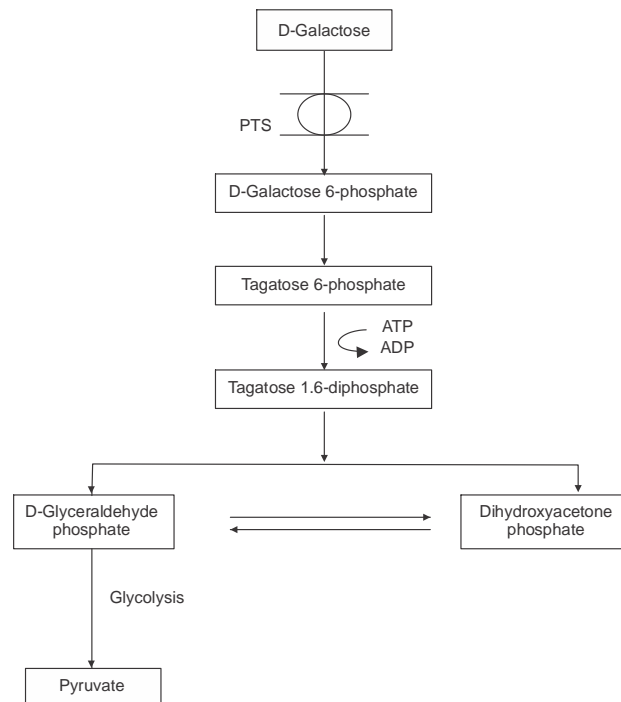


Figura 2. Ruta tagatosa 6-fosfato o ruta Leloir

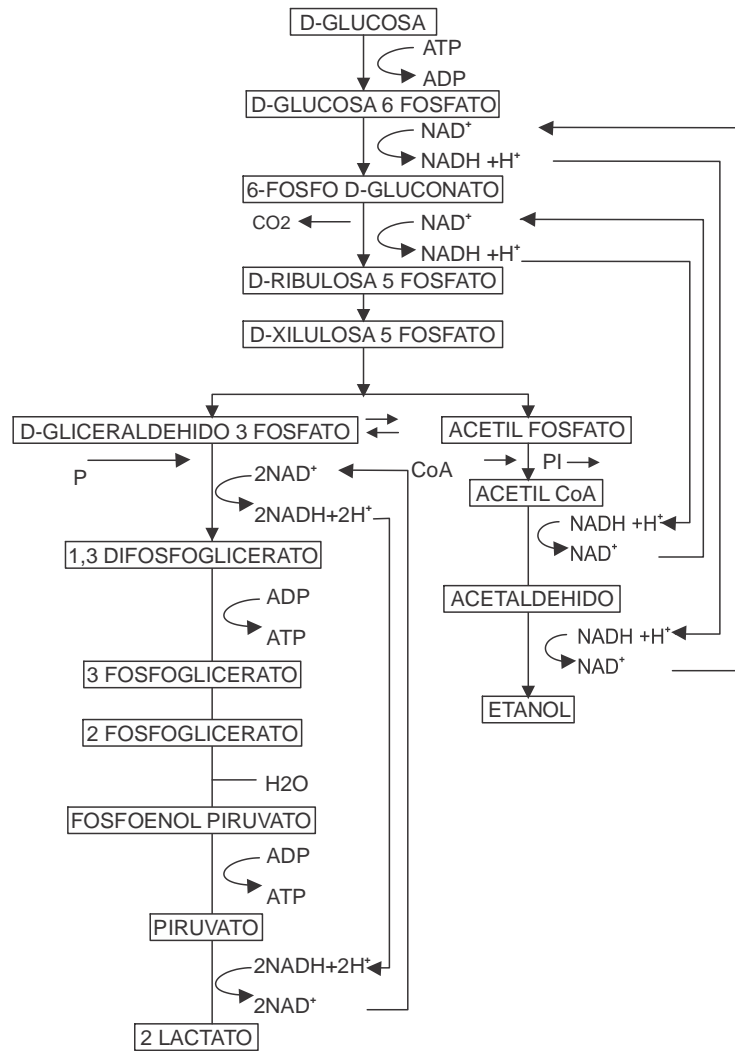


Figura 3. Ruta Embden-Meyerhoff

En la fermentación heteroláctica, los *Lactobacillus* están conformados por: *plantarum*, *ramnosus*, *coryneformis*, *curvatus*, *casei*, *paracasei*, *brevis*, *buchneri*, *fermentun*, *kéfir*, *reuteri*, *leuconostc*; en la fermentación homoláctica, *Lactobacillus acidophilus*, *helveticus*, *delbrueckii subsp delbrueckii*, *debrueckii subsp lactis*, *delbrueckii subsp bulgaricus*, *lactis*, *thermophilus* (Blanco et al., 2006).

Como las bacterias lácticas homofermentativas no tienen piruvato-descarboxilasa, transfieren el hidrógeno formado por acción de la fosfotriosa-*deshidrogenasa* al ácido

pirúvico, con ayuda de la nicotinamida-adenina-dinucleotido (NAD), y lo transforman en ácido láctico. Las especies heterofermentativas metabolizan hexosas a través de la ruta glicolítica de Embden–Meyerhoff. Estas especies usan solamente la fosfoctolasa dependiendo de la vía para el metabolismo del azúcar, y además de ácido láctico, producen cantidades significativas de ácido acético o etanol, con la generación de dióxido de carbono (Gálvez *et al.*, 2007).

Las BAL iniciadoras producen enzimas intracelulares (peptidasas, lipasas y enzimas de catabolismo de aminoácidos), las cuales desempeñan un papel importante en el desarrollo del sabor de los quesos durante la maduración. Después del rompimiento inicial de caseínas por la renina, proteasas endógenas de la leche y proteasas bacteriales de la pared celular, las peptidasas son capaces de degradar los péptidos resultantes en aminoácidos libres. Estos pueden ser subsecuentemente catabolizados en componentes de aroma volátiles por varias rutas enzimáticas. También esterasas y lipasas catalizan hidrólisis de triglicéridos de la grasa de leche en ácidos grasos libres, que son convertidos en componentes aromáticos. Ellas también pueden sintetizar ésteres a partir de alcoholes y glicéridos (Mathur y Singh, 2005).

Las BAL también se clasifican según la temperatura ideal de crecimiento en: mesófilas y termófilas.

Mesófilas

Temperatura óptima de incubación, 20-25 °C; volumen de cultivo líquido, 1-2%; tiempo de incubación, 18-20 horas; acidez final, 0,8% de ácido láctico. Especies: *Lactococcus lactis* subs *lactis*, *Lactococcus lactis* subs *cremoris*, *Lactococcus lactis*, biovariedad *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subs *cremoris*. Utilización: kumis, quesos semimadurados (Blanco *et al.*, 2006).

Termófilas

Temperatura óptima de incubación, 40-45 °C; volumen de cultivo líquido, 2-3%; tiempo de incubación, 2-4 horas; acidez final, 0,9% de ácido láctico. Especies: *Lactobacillus delbruekii* subsp *bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* (Blanco *et al.*, 2006).