Contenido

[1. TITULO 3](#_Toc276837009)

[2. ANTECEDENTES 3](#_Toc276837010)

[3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 4](#_Toc276837011)

[4. JUSTIFICACIÓN 5](#_Toc276837012)

[5. OBJETIVOS 6](#_Toc276837013)

[5.1 Objetivo general: 6](#_Toc276837014)

[5.2 Objetivos específicos: 6](#_Toc276837015)

[6. HIPÓTESIS 6](#_Toc276837016)

[HIPOTESIS ALTERNA: 6](#_Toc276837017)

[HIPOTESIS NULA: 6](#_Toc276837018)

[6. MARCO TEÓRICO 7](#_Toc276837019)

[KEFIR DE LECHE 7](#_Toc276837020)

[GENERALIDADES 7](#_Toc276837021)

[COMPOSICIÓN MICROBIOLÓGICA 7](#_Toc276837022)

[MICROORGANISMOS IMPORTANTES EN EL KÉFIR 7](#_Toc276837023)

[BAL (lactococci, lactobacilli y leuconostoc homo y heterofermentativos): 8](#_Toc276837024)

[LEVADURAS: 8](#_Toc276837025)

[BACTERIA ACIDO LÁCTICAS (BAL) 8](#_Toc276837026)

[TÉCNICAS DE AISLAMIENTO BAL 9](#_Toc276837027)

[Técnica del cultivo de enriquecimiento (BAL) 10](#_Toc276837028)

[PRESERVACIÓN 11](#_Toc276837029)

[Criopreservación 11](#_Toc276837030)

[LEVADURAS 12](#_Toc276837031)

[TÉCNICAS DE AISLAMIENTO LEVADURAS 13](#_Toc276837032)

[Medios de Enriquecimiento Levaduras 13](#_Toc276837033)

[7. MARCO METODOLÓGICO 17](#_Toc276837034)

[7.2 AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS MEJORES MICROORGANISMO DE LOS NÓDULOS DEL KÉFIR 17](#_Toc276837035)

[TECNICA A SEGUIR AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS MEJORES MICROORGANISMO DE LOS NÓDULOS DEL KÉFIR 17](#_Toc276837036)

[*Procedimiento para el aislamiento e identificación de los microorganimos presentes en el kéfir de leche* 17](#_Toc276837037)

[*Obtención de los cultivos puros* 17](#_Toc276837038)

[*Identificación de los microorganismos aislados* 17](#_Toc276837039)

[7.2.1 MÉTODOS ESPECÍFICOS DE ANÁLISIS 18](#_Toc276837040)

[7.2.1.1 TECNICA DE AISLAMIENTO DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS 18](#_Toc276837041)

[7.2.1.1.1 AISLAMIENTO 18](#_Toc276837042)

[7.2. 1.1. 2 SELECCIÖN 19](#_Toc276837043)

[SELECCIÓN DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS 19](#_Toc276837044)

[7.2.1.1. 3 IDENTIFICACIÓN 20](#_Toc276837045)

[ Técnicas de Identificación: 20](#_Toc276837046)

[7.2.1.1.4 PRESERVACIÓN 21](#_Toc276837047)

[7.2.1.2 TECNICA DE AISLAMIENTO DE LEVADURAS 21](#_Toc276837048)

[7.2.1.2.1 AISLAMIENTO LEVADURAS 21](#_Toc276837049)

[ Técnica de de enriquecimiento: 21](#_Toc276837050)

[SELECCIÓN DE LEVADURAS 21](#_Toc276837051)

[PRESERVACIÓN 22](#_Toc276837052)

[7.2.1.3.4 IDENTIFICACION 23](#_Toc276837053)

[PRUEBAS BIOQUIMICAS: 23](#_Toc276837054)

[9. FACTIBILIDAD 23](#_Toc276837055)

[10. CRONOGRAMA 24](#_Toc276837056)

[11. BIBLIOGRAFÍA 24](#_Toc276837057)

[12. ANEXOS 25](#_Toc276837058)

[ANEXO 1 MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN EL KEFIR DE LECHE 25](#_Toc276837059)

[COMPOSICIÓN DEL MEDIO ROGOSA 29](#_Toc276837060)

[ANEXO 4: ALGUNAS ESPECIES LACTOBACILUS 29](#_Toc276837061)

[ANEXO 5: CLASIFICACIÓN DE LOS GRUPOS DE LACTOBACILOS 30](#_Toc276837062)

# 1. TITULO

**AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y CONSERVACION DE LOS MEJORES MICRORGANISMOS PRESENTES EN KEFIR DE LECHE PARA SU INDUSTRIALIZACIÓN**

# 2. ANTECEDENTES

* El Kéfir de leche está elaborado a partir de cultivos con abundantes bacterias de origen intestinal (Lactobacillus acidophillus y Lactobacillus delbrueckil) que brinda al consumidor el sostenimiento de un balance satisfactorio en la flora intestinal que es fundamental para guardar la salud.
* En el Ecuador existen personas dedicadas a la venta de gránulos de kéfir para la elaboración de Kéfir de Leche pero este producto no ha alcanzado la dimensión real que debería tener por lo cual esta investigación hace uso de estos conocimientos para obtener un producto biotecnológico.
* En la Tesis Doctoral de “Aislamiento y Selección de cepas del Género Lactobacillus con capacidad Probiótica e Inmunomoduladora” elaborada en la Universidad Autónoma de Barcelona por María Rodríguez Gonzales, se logró aislar BAL usando medios de preenriquecimiento como: Caldo MRS para BAL , Caldo M17 , Caldo Pal-P, TSB.
* En la Universidad Complutense de Madrid se llevo a cabo una tesis en 1993 para caracterizar sustancias antimicrobianas producidas por Lactobacillus en el kéfir de leche . Las bacterias lácticas utilizadas en este trabajo se aislaron en un medio que contenía peptona y cloruro sódico en agua destilada.
* En el Departamento de Investigación y Estudios Avanzados Del Instituto Politécnico Nacional de México junto a otras entidades se realizó un trabajo que fue publicado el 13 de octubre de 2010 donde se estudió técnicas de ailamiento y selección de los microrganismos del kéfir de leche. Se realizó un ailamiento de los microorganismos incubando un gránulo de kefir en medio LB y otro gránulo en medio selectivo de cocos.

# 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

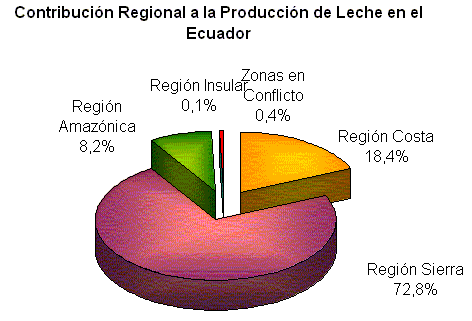
La problemática se centra en que en el Ecuador no se ha desarrollado investigaciones sobre beneficios, técnicas de aislamiento y selección de microorganismos con los cuales se desarrollan productos lácteos fermentados (Kéfir), además el desconocimiento de su existencia y sus propiedades probioticas han ocasionado que su elaboración se realiza de manera artesanal por algunas personas teniendo poca demanda y mala utilización de la materia prima.

Las cifras de personas con problemas gastrointestinales y que no toleran la lactosa han incrementado en los últimos anos, este es un factor importante para el desarrollo e industrialización de productos probioticos que ayuden al mejoramiento de este sector de la población y a fortalecer a los demás.

Los métodos utilizados para dar las condiciones apropiadas para el crecimiento de hongos y levaduras no se encuentran bien establecidos y las técnicas realizadas no son lo suficientemente eficientes como para dar valores fiables, es por ello que se quiere complementar y fianzar nuevas técnicas para su mejor aislamiento y selección.

# 4. JUSTIFICACIÓN

En el Ecuador, los datos del censo Agropecuario del año 2000 indican que la producción lechera se ha concentrado en la región de la sierra, donde se encuentran los mayores productores de leche con un 73% de la producción nacional, siguiendo con un 19 % la Costa, y un 8% la Amazonia y las Islas Galápagos (MAG 2000)



La disponibilidad de la leche cruda en el país es alrededor de 32,5 a 4,5 millones por día, siendo para consumo humano e industrias aproximadamente 75 % de producción. El 90 % de las principales industrias de lácteos se encuentran ubicadas en la Sierra y se dedican, principalmente, a la producción de leche pasteurizada, yogurt, quesos y crema de leche *ocupando un plano secundario los otros derivados. (Ver tabla 1)*

Bajo esta premisa se ha realizado este proyecto de investigación, tomando en cuenta la utilización de un ***proceso biotecnológico*** , en cual se pretende aislar, seleccionar y conservar los mejores microorganismos del kéfir para elaborar KEFIR DE LECHE industrialmente y así poder aportar muchos beneficios al organismo de los consumidores ya que esta leche fermentada tiene muchos valores agregados como lo es el de regenerar la flora intestinal y el intestino ayudando a digerir los alimentos en tránsito, siendo un alimento probiotico que previene enfermedades.

# 5. OBJETIVOS

## 5.1 Objetivo general:

* Aislar, seleccionar y conservar los mejores microorganismos presentes en diferentes muestras de kéfir de leche para su industrialización.

## 5.2 Objetivos específicos:

* Aislar los microorganismos presentes en el kéfir de leche para su industrialización
* Seleccionar los mejores microorganismos del cultivo aislado de gránulos de Kéfir
* Evaluar la adaptación de los mejores microorganismos presentes en el kéfir de leche.
* Conservar los mejores microorganismos presentes en el kéfir de leche.

# 6. HIPÓTESIS

## HIPOTESIS ALTERNA:

* Mediante al aislamiento, selección y preservación se encontraran los mejores microorganismos presentes en diferentes muestras de kéfir de leche para su industrialización

## HIPOTESIS NULA:

* Mediante al aislamiento, selección y preservación no se encontraran los mejores microorganismos presentes en las diferentes muestras de kéfir de leche para su industrialización

# 6. MARCO TEÓRICO

## KEFIR DE LECHE

### GENERALIDADES

Gránulos de kéfir:

Los gránulos de kefir (2-3 cm) son originarios de Rusia, Yugoslavia y Bulgaria. Son una combinación de bacterias y levaduras prebióticas embebidas en una matriz de proteínas y polisacáridos insoluble en agua. Su aspecto es similar al de la coliflor pero es más blando.

### COMPOSICIÓN MICROBIOLÓGICA

La composición microbiana depende del origen del granulo, de las condiciones de cultivo así como de las condiciones de almacenamiento y el proceso de elaboración.

### MICROORGANISMOS IMPORTANTES EN EL KÉFIR

MICRO FLORA:

### BAL (lactococci, lactobacilli y leuconostoc homo y heterofermentativos):

* *LACTOCOCCUS: lactis* subsp. *lactis*, *lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*
* *LACTOBACILLUS: kefir*, *parakefir*, *kefiranofaciens*, *plantarum, brevis, viridescens*, *gasseri*, *fermentum, casei, acidophilus, helveticus*
* *Leuconostoc mesenteroides*
* *Streptococcus thermophilus*

### LEVADURAS:

* *KLUYVEROMYCES: marxianus*, *kefir*
* *SACCHAROMYCES: cerevisiae*, *delbrueckii*, *unisporus*, *exiguus*

*Candida kefir, holmii, friedricchii, pseudotropicalis, tenuis*

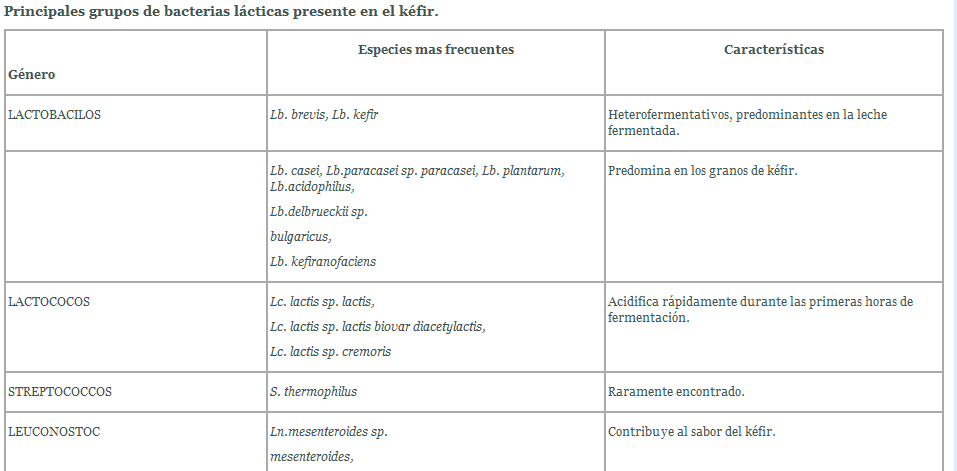
BACTERIAS ACÉTICAS:

* *Acetobacter*

### BACTERIA ACIDO LÁCTICAS (BAL)

Las bacterias lácticas son gram positivas, ácido tolerantes, algunos en rangos de [pH](http://es.wikipedia.org/wiki/PH) entre 4.8 y 9.6, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no aguantarían la aumentada actividad producida por los [ácidos](http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido) [orgánicos](http://es.wikipedia.org/wiki/Compuesto_org%C3%A1nico)[[1]](http://es.wikipedia.org/wiki/Cultivos_l%C3%A1cticos#cite_note-0) Son organismos que no forman [esporas](http://es.wikipedia.org/wiki/Espora), son inmóviles, [cocos](http://es.wikipedia.org/wiki/Coco_%28bacteria%29) o [bacilos](http://es.wikipedia.org/wiki/Bacilo) con bajo contenido de [guanina](http://es.wikipedia.org/wiki/Guanina) y [citocina](http://es.wikipedia.org/wiki/Citocina), y asociados todos por sus características [metabólicas](http://es.wikipedia.org/wiki/Metabolismo) y [fisiológicas](http://es.wikipedia.org/wiki/Fisiolog%C3%ADa) comunes. Estas son bacterias que generalmente se encuentran en [plantas](http://es.wikipedia.org/wiki/Planta) y [productos lácteos](http://es.wikipedia.org/wiki/Producto_l%C3%A1cteo) en [descomposición](http://es.wikipedia.org/wiki/Descomposici%C3%B3n) produciendo [ácido láctico](http://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_l%C3%A1ctico) como producto metabólico final de la [fermentación](http://es.wikipedia.org/wiki/Fermentaci%C3%B3n) de [carbohidratos](http://es.wikipedia.org/wiki/Carbohidrato). Esta particularidad ha enlazado, históricamente, a los BAL con la producción de [alimentos fermentados](http://es.wikipedia.org/wiki/Alimentos_fermentados), pues la acidificación que producen inhibe el crecimiento de agentes que causan [descomposición](http://es.wikipedia.org/wiki/Descomposici%C3%B3n). Más aún, algunas BAL son productoras de bacterocinas tóxicas, proveyendo un obstáculo adicional para los microorganismos [patogénicos](http://es.wikipedia.org/wiki/Pat%C3%B3geno). De hecho, el ácido láctico y otros productos metabólicos de las BAL contribuyen a las [propiedades organolépticas](http://es.wikipedia.org/wiki/Propiedades_organol%C3%A9pticas) y el perfil textural de un alimento específico. La importancia industrial de las BAL se evidencia también porque, por lo general consideradas no peligrosas, debido a que están en variados alimentos y por su contribución como [flora saprófita](http://es.wikipedia.org/wiki/Flora_sapr%C3%B3fita) de las superficies mucosas humanas. Los [géneros](http://es.wikipedia.org/wiki/G%C3%A9nero_%28biolog%C3%ADa%29) básicos que comprenden las BAL son [*Lactobacillus*](http://es.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus), [*Leuconostoc*](http://es.wikipedia.org/wiki/Leuconostoc), [*Pediococcus*](http://es.wikipedia.org/wiki/Pediococcus), [*Lactococcus*](http://es.wikipedia.org/wiki/Lactococcus), y [*Streptococcus*](http://es.wikipedia.org/wiki/Streptococcus) así como los [Lactobacillales](http://es.wikipedia.org/wiki/Lactobacillales) *Aerococcus*, *Carnobacterium*, [*Enterococcus*](http://es.wikipedia.org/wiki/Enterococcus), [*Oenococcus*](http://es.wikipedia.org/wiki/Oenococcus), *Teragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weisella*.

**Principales grupos de bacterias lácticas presente en el kéfir.**

****

## **TÉCNICAS DE AISLAMIENTO BAL**

Los medios de cultivo para bacterias lácticas típicamente incluyen fuentes de carbohidratos, siendo que la mayoría de estas especies son incapaces de aprovechar la respiración celular

Las bacterias ácido-lácticas constituyen un vasto conjunto de microorganismos benignos, dotados de propiedades similares, que fabrican ácido láctico como producto final del proceso de fermentación. Se encuentran en grandes cantidades en la naturaleza, así como en nuestro aparato digestivo. Aunque se las conoce sobre todo por su labor de fermentación de productos lácteos, se emplean asimismo para encurtir vegetales en la horneado, en la panificación del vino, y para curar pescado, carne y embutidos.

En la actualidad también se hace buen uso de estos ilustres aliados microbianos en la elaboración de una amplia gama de productos lácteos fermentados, ya sean líquidos, como el kéfir, o densos y semisólidos, como el queso o el yogurt.

La acción de estas bacterias desencadena un proceso microbiano por el cual la lactosa (el azúcar de la leche) se transforma en ácido láctico. A medida que el ácido se acumula, la estructura de las proteínas de la leche va modificándose (van cuajando), y lo mismo ocurre con la textura del producto. Existen otras variables, como la temperatura y la composición de la leche, que influyen en las cualidades particulares de los distintos productos resultantes.

El ácido láctico es también el que confiere a la leche fermentada ese sabor ligeramente acidulado. Los elementos derivados de las bacterias ácido-lácticas producen a menudo otros sabores o aromas característicos. Pueden añadirse asimismo al cultivo de microorganismos, como las levaduras, a fin de obtener sabores particulares. El alcohol y el dióxido de carbono producidos por la levadura, por ejemplo, dan al kéfir, una frescura y una esponjosidad características

En lo que concierne al yogurt, su elaboración deriva de la simbiosis entre dos bacterias, la *Streptococcus thermophilus* y la *Lactobacillus bulgaricus,* que se caracterizan porque cada una estimula el desarrollo de la otra. Esta interacción reduce considerablemente el tiempo de fermentación y el producto resultante tiene peculiaridades que lo distinguen de los fermentados mediante una sola cepa de bacteria.

Las bacterias ácido-lácticas resultan excelentes embajadoras del mundo de los microbios, tan poco apreciado por lo general. Su importancia no se limita al orden económico, sino que se debe ante todo a sus propiedades, que contribuyen a preservar y mejorar la salud.

### Técnica del cultivo de enriquecimiento (BAL)

Para la obtención de cultivos puros, se realizan varias transferencias en el medio diseñado, seguidas por siembra por método de estriación en placa (Brook, et ál, 2004).

LAS Bal son microorganismos con una limitada capacidad bio sintética, por lo tanto requiere factores de crecimiento complejos como: contenido reducido de oxígeno, concentración de CO2 de 10%, inhibidores como el acetato de talio o sodio y el acido ascórbico, vitaminas del grupo B, purinas, primidinas y aminoácidos. Como carecen de porfinas y citocromos, no realizan fosforilizacion por transporte de electrones, reciben energía por fosforilizacion a nivel sustrato. Producen energía únicamente por fermentación

Las BAL estos microorganismos están caracterizados por su notable resistencia al ácido láctico que ellas mismas producen al fermentar el azúcar, para el enriquecimiento de bacterias de acido láctico se usa un medio escasamente amortiguado, que contenga glucosa y una fuente rica en factores de crecimiento (por ejemplo: 20 g glucosa y 10 de extracto de levadura por litro). Después de la inoculación, preferentemente con materiales naturales ricos en bacteria lácticas, el medio se incuba bajo condiciones anaeróbicas.

**Medio minimal BAL**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| FORMULA (G/L) | | PROCEDIMIENTO | INCUBACIÓN |
| Proteosa peptona | **10** | Suspender 64 g del medio en un litro de agua destilada. Reposar 5 minutos y mezclar calentando a ebullición durante 1 ó 2 minutos. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 ºC. | En atmósfera aeróbica con 5-10 % CO2, a 35-37 ºC hasta 3 días ó a 30 ºC hasta 5 días. |
| Extracto de carne | **8** |
| Extracto de levadura | **4** |
| Glucosa | **20** |
| Monoleato de sorbitán | **1** |
| Fosfato dipotásico | **2** |
| Acetato de sodio | **5** |
| Citrato de amonio | **2** |
| Sulfato de magnesio | **0.2** |
| Sulfato de manganeso | **0.05** |
| Agar | **13** |

## PRESERVACIÓN

La preservación por congelación o Criopreservación consiste en la congelación y almacenamiento de células a muy bajas temperaturas.

### Criopreservación

Se congelan las células en suspensión en un líquido con un agente crioprotector y se guardan a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, con lo que el agua se congela. De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento. Cuando se quiere trabajar con las células así conservadas, se recuperan subiendo la temperatura. Este es el mejor método de conservación desde todos los puntos de vista, pero tiene el inconveniente de requerir aparatos especiales, y además existe el peligro de que algún fallo del sistema produzca una subida no deseada de la temperatura durante el almacenamiento. También resulta ser el método más molesto para realizar el envío de las cepas.

### LEVADURAS

Las levaduras son abundantes en la naturaleza, y se encuentran en el suelo y sobre las plantas. La mayoría de las levaduras que se cultivan pertenecen al género *Saccharomyces*, como la levadura de la cerveza, que son cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

Se definen como hongos microscópicos unicelulares que son importantes por su capacidad para realizar la fermentación de hidratos de carbono, produciendo distintas sustancias.

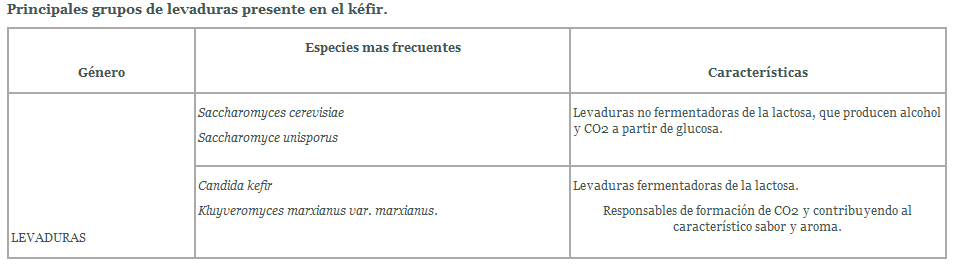
Las levaduras se han utilizado desde la prehistoria en la elaboración del pan y del vino, pero los fundamentos científicos de su cultivo y uso en grandes cantidades fueron descubiertos por el microbiólogo francés Luis Pasteur en el siglo XIX. Hoy se utilizan en distintos tipos de fermentación.

Los diferentes usos de las levaduras son:

* Como fuente de vitaminas del complejo B y de tiamina.
* En algunas fases de la producción de antibióticos.
* Hormonas y esteroides.
* Alimento para animales y seres humanos.

También pueden encontrarse en la leche levaduras esporulantes, como el *Kluyveromyces fragilis* y el *K. lactis* que fermentan la lactosa, con la producción de alcohol.

En el kéfir, leche fermentada oriental, se encuentra una variedad del llamada *Candida kefir (*ver cuadro).



## **TÉCNICAS DE AISLAMIENTO LEVADURAS**

Las cepas puras de levaduras se cultivan en un medio con azúcares, compuestos nitrogenados, sales minerales y agua. El producto final puede aparecer en forma de células secas de levadura o prensado en pastillas con algún material excipiente

### Medios de Enriquecimiento Levaduras

En el medio de cultivo Sabouraud, la pluripeptona y la glucosa, son los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. Las peptonas son fuente de nitrógeno. La glucosa (=dextrosa) es una fuente de energía para el crecimiento de los hongos. El cloranfenicol y la gentamicina son antibióticos de amplio espectro que inhiben una amplia variedad de bacterias gram negativas y gram positivas. El alto contenido de glucosa, la presencia de cloranfenicol y el pH ácido, favorecen el crecimiento de hongos por sobre el de bacterias.  
Además, al medio de cultivo, pueden agregarse otros agentes selectivos de crecimiento.

**Medio minimal levaduras**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| FORMULA G/L |  | PREPARACIÓN | INCUBACIÓN |
| Digerido enzimático de caseína | 10,0 g | Suspender 65 g de medio  deshidratado en un litro de agua  destilada.  Calentar agitando  frecuentemente y dejar hervir  durante 1 minuto para disolver  completamente los  ingredientes. Evitar el  sobrecalentamiento.  Esterilizar a 121°C durante 15  minutos. Distribuir y enfriar  a temperatura ambiente antes  de su utilización. | A 370 C 5 días |
| Dextrosa | 40,0 g |
| Agar | 15,0g |
|  |  |

ACETOBACTER:

***Acetobacter*** es un género de [bacterias del ácido acético](http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Acetic_acid_bacteria) caracterizado por la capacidad de convertir el alcohol ([etanol](http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Ethanol)) a [ácido acético](http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Acetic_acid) en presencia del aire. Hay varias especies dentro de este género, y hay otra [bacterias](http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Bacteria) capaz de formar el ácido acético bajo varias condiciones; pero todo el *Acetobacter* son sabidos por esta capacidad característica.

*Acetobacter* sea de importancia particular comercialmente, porque:

* se utilizan en la producción de [vinagre](http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Vinegar) (intencionalmente convirtiendo el etanol en [vino](http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Wine) al ácido acético);
* pueden destruir el vino que infecta produciendo cantidades excesivas de ácido acético o [acetato ethyl](http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Ethyl_acetate), que puede hacer el vino desagradable;
* los utilizan para acidificar intencionalmente [cerveza](http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Beer) durante períodos largos de la maduración en la producción de tradicional [Flamenco](http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Flanders) Amargo [Alés](http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Ale);
* *A*. *xylinus* es la fuente principal de [celulosa microbiana](http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Microbial_cellulose).

El crecimiento de *Acetobacter* en vino puede ser suprimido con el saneamiento eficaz, por la exclusión completa del aire de [vino](http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Wine) en almacenaje, y por el uso de cantidades moderadas de [dióxido de sulfuro](http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Sulfur_dioxide) en el vino como a [preservativo](http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Preservative).

*Acetobacter* se puede distinguir fácilmente en el laboratorio por su crecimiento de colonias en un medio contener el etanol del cerca de 7%, y bastante [carbonato de calcio](http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Calcium_carbonate) para hacer el medio parcialmente opaco. Cuando *Acetobacter* las colonias forman bastante ácido acético del etanol, el carbonato de calcio alrededor de las colonias disuelven, formando una zona clara muy distinta.

**FERMENTACION**

La **fermentación** es un tipo de catabolismo parcial, que se caracteriza por ser un proceso de oxidación incompleta, típico de los organismos anaeróbicos. Se realiza, sin la intervención del oxígeno.

TIPO DE FERMENTACION:

Cuando se colocan nódulos de kéfir en leche fresca, se produce una doble fermentación: una realizada por las levaduras y la otra por las bacterias. Los efectos más destacados que se producen son:

• Coagulación de las proteínas   
• producción de ácido láctico, ácido acético y etanol  
*Como principales subproductos obtenemos:*   
• CO2 y alcohol (gracias a la acción de las levaduras)   
• ácido láctico (gracias a la acción de las bacterias del ácido láctico). Estas bacterias reducen el azúcar de la leche (lactosa), dando lugar al ácido láctico, que es el responsable del sabor ácido del kéfir (4.2-4.6 pH).

* ***FERMENTACION ACETICA***

Es la fermentación causada por un género de bacterias aeróbicas *Acetobacter*, que transforman el alcohol en ácido acético.

La formación del ácido acético resulta de la oxidación de un alcohol por la bacteria del vinagre en presencia de oxígeno del aire. Estas bacterias, a diferencia de las levaduras productoras de alcohol, requieren un suministro generoso de oxígeno para su crecimiento y actividad.

* ***FERMENTACION ALCOHOLICA***

Es un proceso biológico de fermentación en plena ausencia de aire, originado por la actividad de algunos microorganismos que procesan los carbohidratos

Se realiza gracias a levaduras y ciertas bacterias que poseen el enzima *alcohol deshidrogenasa*.

Las moléculas de glucosa sufren glucólisis originando ácido pirúvico. Este ácido pirúvico en condiciones anaeróbicas se descarboxila para transformarse en acetaldehído, el cual se reduce a alcohol etílico por acción del NADH2 convirtiéndose así en el aceptor final de los electrones del NADH obtenido en la glucólisis.

Ácido pirúvico 🡪 acetaldehído + CO2

Acetaldehído + NADH2 🡪etanol + NAD+

* ***FERMENTACION LACTICA***

Es realizada por las bacterias del ácido láctico gracias a la presencia de un enzima, el *lactato deshidrogenasa*.

En este tipo de fermentación es el ácido pirúvico producto de la glucólisis, el que acepta los electrones y se convierte en ácido láctico.

Ácido pirúvico + NADH2 🡪 ácido láctico + NAD+

Tanto para las levaduras como para las bacterias que realizan estos procesos metabólicos, el producto importante es el ATP obtenido en la glucólisis, ya que el alcohol etílico y el ácido láctico, junto el CO2 desprendido, son productos de desecho.

* ***FERMENTACION BUTIRICA***

Es la conversión de los glúcidos en ácido butírico, por acción de las bacterias anaerobias Clostridium butyricum, en ausencia de oxigeno.

La fermentación butírica se produce a partir de la lactosa o del ácido láctico con formación de ácido butírico y gas. Es característica de las bacterias del género Clostridium y se caracteriza por la aparición de olores pútridos y desagradables entre ellos los intestinales. Se puede producir durante el proceso de ensilado si la cantidad de azúcares en el forraje no es lo suficientemente grande como para producir una cantidad de ácido láctico que garantice un pH inferior a 5.

El ácido butírico es un ácido graso de cadena. Es el responsable del mal olor del vino alterado. El ácido butírico huele fuertemente a mantequilla rancia, de la que es un componente, como también lo es de lo que se acostumbra a llamar “olor corporal” así como el denominado "olor de pies". Es responsable también del olor del  queso ya que se encuentra en las [grasas](http://www.bedri.es/Libreta_de_apuntes/G/GR/Grasas.htm) de la [leche](http://www.bedri.es/Libreta_de_apuntes/L/LE/Leche.htm) al proceder de la fermentación de la lactosa.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Tipo de fermentación | Productos | Organismos |
| Alcohólica | Etanol + CO2 | Levadura (Saccharomyces) |
| Acido láctico | Acido láctico | Bacterias del ácido láctico (Streptococcus, lactobacillus, etc) |
| Acido mixto | Acido láctico, ácido acético, etanol, CO2, H2 | Bacterias entéricas (Escherichia, Salmonella) |
| Butanediol | Butanediol, ácido láctico, ácido acético, etanol, CO2, H2 | Bacterias entéricas (Aerobacter, Serratia) |
| Acido burítico | Acido burítico, ácido acético, CO2, H2 | Algunos clostridios (Clostridium butyricum) |
| Acetona – butanol | Acetona, butanol, etanol | Algunos clostridios (Clostridium acetobutylicum) |
| Acido propiónico | Acido propiónico | Propionibacterium |

# 7. MARCO METODOLÓGICO

## 7.2 AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS MEJORES MICROORGANISMO DE LOS NÓDULOS DEL KÉFIR

## TECNICA A SEGUIR AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS MEJORES MICROORGANISMO DE LOS NÓDULOS DEL KÉFIR

### *Procedimiento para el aislamiento e identificación de los microorganimos presentes en el kéfir de leche*

* Añadir 10g de kefir en 90g de caldo APT
* Realizar diluciones seriadas en agar MRS (para lactobacilos), M17-lactosa o glucosa (para lactococos) y Sabouraud-cloranfenicol (levaduras).
* Incubar a 31ºC por 72horas.

### *Obtención de los cultivos puros*

* De las colonias desarrolladas en cada tipo de agar se toman colonias diferente tamaño y se aíslan en otra placa del mismo agar.
* Se observa las características y se aíslan de acuerdo la morfología. Estos cultivos se conservaron a -80ºC

### *Identificación de los microorganismos aislados*

* Llevar a cabo tinción gram, reacciones de catalasa y oxidasa, crecimiento a diferentes temperaturas, en presencia de diferentes concentraciones de NaCl, producción de gas a partir de glucosa.

# 7.2.1 MÉTODOS ESPECÍFICOS DE ANÁLISIS

## 7.2.1.1 TECNICA DE AISLAMIENTO DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS

### 7.2.1.1.1 AISLAMIENTO

* **Técnica de diluciones seriadas:**

**Introducción:**

En general, para preparar diluciones seriadas, se parte de una solución concentrada y se preparan series de diluciones al décimo (1:10). De esta manera se obtiene una serie de soluciones relacionadas por un factor de dilución 10 es decir 1/10; 1/100; 1/1000 y así sucesivamente.

* **Técnica de enriquecimiento selectivo:**

El aislamiento de microorganismos (BAL), implica confeccionar un medio de cultivo minimal, este medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. El cual utiliza la peptona y glucosa como fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas.

**PROCEDIMIENTO:**

* Preparar el siguiente medio de cultivo:
* Los medios de cultivo de pre-enriquecimiento seleccionados fueron:
* Caldo MRS para BAL (lactobacillus, Leuconostocy Pediococcus)
* Caldo M17 para Lactococcus
* Caldo Pal-P para Propionibacterium.
* TSB para Streptococcus.
* Tras la pre incubación se prepara bancos de diluciones decimales seriadas en PBS (Phosphate Buffered Saline) y posteriormente se realiza la siembra en los medios de cultivo para aislamiento específico de cada grupo de microorganismos.
* Una vez incubadas se lleva a las bacterias que son presuntamente BAL a las pruebas de Tinción Gram, donde los que resultaron ser Bacillus Gram positivos se llevaron a la prueba de Catalasa-
* Las muestras fueron diluidas de 10 en 10 en el caldo MRS y a continuación fueron sembradas en placas de agar MRS para obtener las colonias, siendo incubadas en condiciones de microaerolia a 33-35.
* Después de 4 días de crecimiento se veriﬁcaron las características morfológicas por tinción (presencia de bastones/coloración de Gram).
* Las colonias seleccionadas fueron aisladas pasándolas a tubos conteniendo agar MRS en pico de ﬂauta. Una vez crecidas, se realizaron los test bioquimicos API correspondientes.

## 7.2. 1.1. 2 SELECCIÖN

## SELECCIÓN DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS

**Preselección de Cepa**

En cada cepa aislada se realizaron dos pruebas preliminares: tinción de Gram y prueba de la catalasa. A partir de los resultados de ambas pruebas, fueron seleccionadas las colonias catalasa negativa y aquellas cuyas células resultaran ser morfológicamente bacilos grama positivos.

**Disminución del pH del medio**

Las cepas preseleccionadas son sembradas en tubos de cultivo con 10 ml de caldo MRS a pH 6,5 y posteriormente incubadas por 24h a 37ºC. A partir de estos cultivos se toma 1 ml de muestra para inocular matraces con 50 ml de caldo MRS, a razón de 1:10 ml de inóculo, con tres réplicas por cada cepa. Todas las réplicas se incubaron por 14 a 37 º bajo condiciones estáticas. De cada réplica se tomaron muestras para medir el pH de los cultivos. Se tomo como criterio de selección aquellas cepas que disminuyeran el pH hasta valores ≤ 5,5.

**Resistencia a pH ácido**

Las cepas seleccionadas se cultivaron en caldo MRS a pH 6,5 y 37ºC durante 18 h. posteriormente, de cada cultivo se toma 1 ml con 109 UFC mL y se inoculó en un tubo con caldo MRS y pH ajustado a 2 con HCL 0,1 N. todas las muestras fueron incubadas a 37ºC por 3 h.

Antes de la incubación (h 0) y después de esta (h3), se realizó el conteo de las células viables la técnica de las diluciones seriadas en agua de peptona, así como la siembre en placas con Agar MRS y la incubación bajo condiciones anaerobias a 37ºC por 48 h. la tolerancia a la acidez se estimo al comparara el conteo de bacterias viables en Agar MRS para la h0 y las células sobrevivientes después de la incubación a pH ácido por 3 h.

El porcentaje de resistencia a pH ácido fue calculado por la siguiente ecuación

Se estableció como criterio de selección escoger aquellas cepas que resistieron el pH acido por encima del 50%, para pasar entonces a la siguiente prueba de resistencia de sales biliares.

**Resistencia a las sales biliares**

Las cepas seleccionadas se pre cultivaron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. 1 ml de cada cultivo fue inoculado en tubos con 9 ml de caldo MRS con y sin 1.5 gL-1de Ox-Bilis (OXOID). Al caldo MRS se le adicionaron previamente 1,38 ml de ácido acético. La incubación se realizó durante 3, 12, y 24 h a 37ºC, en condiciones estáticas.

La tolerancia a las sales biliares fue estimada al comparar el conteo de células viables en MRS con y sin sales biliares, después de realizar disoluciones seriadas y conteo en placa con agar MRS, previamente incubados a 37ºC durante 48 h. De igual forma, se determinó el % de sobrevivencia.

## 7.2.1.1. 3 IDENTIFICACIÓN

## **Técnicas de Identificación:**

A partir de las cepas aisladas de las muestra de los gránulos de kéfir, se procedió a la selección de aquellas que cumplían las características que presumiblemente permitían considerarlas como BAL de interés para nuestro estudio

* Características morfológicas de las cepas
* Las pruebas iniciales podemos diferencialas en;
* Observación microscópica de las colonias
* Tinciom Gram

**PROCEDIMIENTO:**

* Las muestras fueron diluidas de 10 en 10 en el caldo MRS y a continuación fueron sembradas en placas de agar MRS para obtener las colonias, siendo incubadas en condiciones de microaerolia a 33-35.
* Después de 4 días de crecimiento se veriﬁcaron las características morfológicas por tinción (presencia de bastones/coloración de Gram).
* Las colonias seleccionadas fueron aisladas pasándolas a tubos conteniendo agar MRS en pico de ﬂauta. Una vez crecidas, se realizaron las pruebas bioquímicas.

## 7.2.1.1.4 PRESERVACIÓN

Las cepas de aisladas se transfieren a caldo BHI con glicerol (20% v/v) y se congelaron a

-80 ºC hasta su posterior análisis.

## 7.2.1.2 TECNICA DE AISLAMIENTO DE LEVADURAS

## 7.2.1.2.1 AISLAMIENTO LEVADURAS

## **Técnica de de enriquecimiento:**

Cada una de las levaduras estudiadas se inoculó en un Erlenmeyer con 100 ml de caldo Sabouraud glucosado

Incubar a 45°C con agitación (120rpm) durante 15 a 20 horas hasta que la turbidez indique evidencia de crecimiento celular

7.2.1.2.2 FASE DE SELECCION

A partir de los cultivos diluidos efectuar siembras por estriado sobre agar saboroud Incubar las cajas a 35°C por 48 horas

## SELECCIÓN DE LEVADURAS

**Resistencia al etanol**

La resistencia al etanol de las levaduras en estudio fue determinada sometiéndolas a fermentaciones de un granulo de Kéfir estándar, con un contenido en azúcar correspondiente a 12º Bé (212 g/L), en presencia de distintas concentraciones de etanol de 99,9% de pureza v/v. (4%, 6%, 8%, 10% etanol)

Para ello se hizo una resiembra de las levaduras en 10 ml de medio YEPD previamente esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 120º C.

Se inoculó 0,1 ml de cada una de las levaduras en doce tubos con 10 ml de gránulos de kéfir, esterilizados en las mismas condiciones que los anteriores.

Para determinar la resistencia al estrés fermentativo que supone las elevadas concentraciones de etanol, se hizo un seguimiento del crecimiento de las levaduras en las diferentes muestras. Para ello, se hizo un recuento de las unidades formadoras de colonias presentes por mililitro haciendo uso de un microscopio electrónico

Los conteos se realizaron cada 2 días para un mejor seguimiento del crecimiento microbiano.

**Resistencia a altas temperaturas**

Crecimiento a altas temperaturas (37 y 42ºC). Se intentó siempre tomar cepas capaces de crecer a 42ºC.

7.2.1.2.3 FASE DE CONSERVACIÓN

Del cultivo puro obtenido en la fase anterior seleccionar las mejores

### PRESERVACIÓN

La preservación por congelación o Criopreservación consiste en la congelación y almacenamiento de células a muy bajas temperaturas.

Criopreservación

Se congelan las células en suspensión en un líquido con un agente crioprotector y se guardan a temperaturas inferiores a cero grados centígrados, con lo que el agua se congela. De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay crecimiento. Cuando se quiere trabajar con las células así conservadas, se recuperan subiendo la temperatura. Este es el mejor método de conservación desde todos los puntos de vista, pero tiene el inconveniente de requerir aparatos especiales, y además existe el peligro de que algún fallo del sistema produzca una subida no deseada de la temperatura durante el almacenamiento. También resulta ser el método más molesto para realizar el envío de las cepas.

## 7.2.1.3.4 IDENTIFICACION

### PRUEBAS BIOQUIMICAS:

* Tinción Gram
* Catalasa
* Oxidasa
* Indol

# 9. FACTIBILIDAD

**Medios de cultivos para aislamiento, identificación de los mejores microorganismos presentes en los nódulos de kéfir:**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Medio de Cultivo | M.O | CANTIDAD | Justificación | Disponibilidad |
| **Agar Rogosa** | **Flora acido láctica** | Suspender 64 g del medio en un litro de agua | La peptona de caseína, el extracto de levadura y la sal de amonio proporcionan nitrógeno. El polisorbato 80 suministra ácidos grasos necesarios para el crecimiento de lactobacilos. El manganeso y el magnesio son factores de crecimiento. La glucosa es una fuente universal de energía y carbono. El citrato de amonio, el acetato de sodio, el ácido acético y el sulfato ferroso actúan como inhibidores de los estreptococos y otros organismos contaminantes y suministran el bajo pH que es tolerado por los lactobacilos, pero no por muchos otros organismos. El fosfato, junto con acetato y ácido acético, estabiliza el pH. | SI |
| **Agar Sabouraud dextrosa + clorarrifenicol** | **Mohos y levaduras** | Suspender 65 g de medio  deshidratado en un litro de agua destilada. | La peptona suplementado con la dextrosa favorece el crecimiento de hongos. La dextrosa proporciona la fuente de crecimiento, el cloranfenicol es un antibiótico de amplio espectro inhibidor para gran variedad de bacterias gran(-) y gran(+). | SI |
| **Agua de peptona tamponada (ATP)** |  | Disolver 20 g del polvo en 1 litro de agua | Enriquecimiento de las bacterias exigente En el caso del agua peptonada tamponada (pH 7.2) ésta asegura la mantención del pH durante 24horas, lo que sumado al período de incubación permite el incremento de células que son sensibles a la disminución del pH. | SI |

# 10. CRONOGRAMA

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **ACTIVIDADES** | | **OCRUBRE** | **NOVIEMBRE** | | | | | | **DICIEMBRE** | | | | |
| **D1** | **D2** | **D3** | **D4** | **D7** | **D8** | **D1** | **D3** | **D5** | **D8** | **D10** |
| ACTIVIDAD 1 | Crecimiento de los gránulos de kéfir |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACTIVIDAD 2 | Preparación de diluciones y medios |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACTIVIDAD 3  Aislamiento de los M.O kéfir | Siembra por estriado |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACTIVIDAD 4 | Lectura de cajas |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACTIVIDAD 5 | Purificación |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACTIVIDAD 6 | Selección |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| ACTIVIDAD 7 | Identificación |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

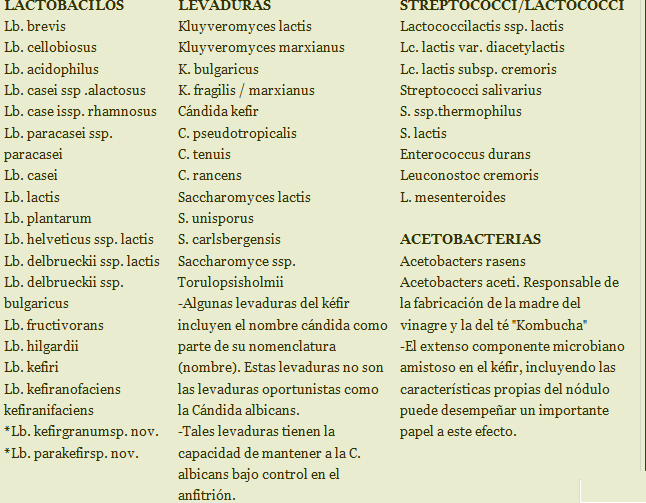
# 11. BIBLIOGRAFÍA

* Microbiología 2da edición Roger Y. Stanier pág. 39
* Biotecnología alimentaria. GARCÍA GARIBAY. 2004 Editorial LIMUSA pág.: 153-158
* <http://www.monografias.com/trabajos30/leche-kefir/leche-kefir.shtml#bacter>
* <http://www.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/ES-PA-254515.pdf>
* <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602003000300016>
* http://slidefinder.net/i/identificacion\_levaduras/3444191
* http://redalyc.uaemex.mx/pdf/437/43717202.pdf
* <http://www.scribd.com/doc/34238676/Informe-Final-AISLAMIENTO-SELECCION-Y-CONSERVACION-DE-BACTERIAS-PRODUCTORAS-DE-ACIDO-ACETICO-A-PARTIR-DE-BEBIDAS-FERMENTADAS-DE-PLATANO-Y-MORA-SILVES>
* <http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0526110-152220//mrg1de1.pdf>

# 12. ANEXOS

## ANEXO 1 **MICROORGANISMOS DE IMPORTANCIA EN EL KEFIR DE LECHE**

A continuación presentamos una descripción de los principales microorganismos que pueden encontrarse en los gránulos de kéfir.



ANEXO 2.- ESQUEMA DEL AISLAMIENTO IDENTIFICACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS MEJORES MICROORGANISMOS DE LOS NÓDULOS DEL KÉFIR





10g de KEFIR

TECNICA DE AISLAMIENTOS DE LOS M.O DEL KÉFIR DE LECHE



Diluciones seriadas

10-1

10-3

10-4

10-5



Siembra por duplicado

Técnica de

Estriado

PURIFICACIÓN

Purificación



Agar MRS

Lactobacillus

Sabouraud con

Cloranfenicol Levaduras

M-17 lactosa

Lactococcus



Purificación

Según su morfología

Pruebas de Catalasa

Tinción Gram

MRS

Lactobacillus

Sabouraud con

cloranfenicol

Levaduras

M-17 lactosa

Lactococcus

31ºC

72h

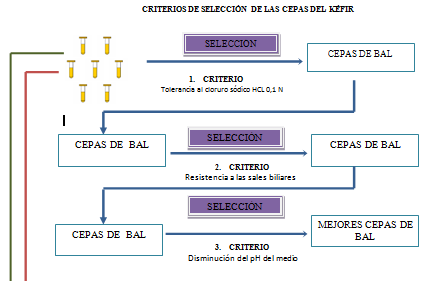
90ml ATP

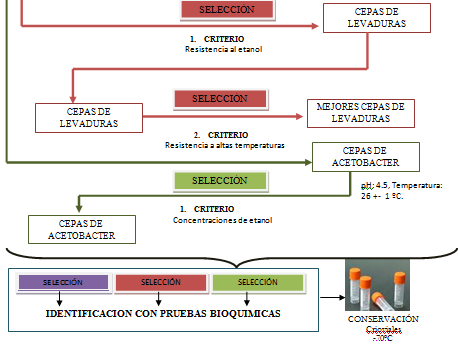


CONSERVACIÓN

Crioviales

-70ºC





ANEXO 3

## **COMPOSICIÓN DEL MEDIO ROGOSA**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Digerido pancreático de caseína | 10,0 g | Incubación |  | Hidrato acetato de sodio |  | 25,0 g |  |
| De 2 a 3  días a 35 –  37 °C. |
| Extracto de levadura | 5,0 |  |  | Acido acético |  | 1,3 mL |  |
| Fosfato monopotásico | 6,0 |  |  | Sulfato magnésico |  | 0,575 g |  |
| Citrato de amonio | 2,0 |  |  | Sulfato de manganeso |  | 0,12 |  |
| Glucosa | 20,0 |  |  | Sulfato ferroso |  | 0,034 |  |
| Polisorbato 80 | 1,0 |  |  | Agar |  | 15,0 |  |

## ANEXO 4: ALGUNAS ESPECIES LACTOBACILUS

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Crecimiento a | | Ácido de | | | | | | NH3  arginina | Crecimiento en caldo  4 % NaCl |
| 15 ºC | 45 ºC | la | su | sal | mn | so | xi |
| L. acidophilus | - | + | + | + | + | - | - | - | - | - |
| L. bulgaricus | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| L. casei | + | V | +/- | +/- | + | + | + | - | - | + |
| L. plantarum | + | V | + | + | + | + | - | - | - | + |
| L. delbruckii | - | + | - | + | - | - | - | - | - | - |
| L. leichmanii | - | + | +/- | + | + | - | - | - | +/- | - |
| L. brevis | + | - | +/- | + | +/- | +/- | - | + | + | + |
| L. fermenti | - | + | + | +/- | - | - | - | +/- | + | - |

## ANEXO 5: CLASIFICACIÓN DE LOS GRUPOS DE LACTOBACILOS

factores de crecimiento: R, riboflavina; P, piridoxal; C, cianocobalmina (B12); F, ácido fólico; T, Tiamina

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | Homofermentativos | | | | | | | Heterofermentativos | |
| Termófilos | | | | | Mesófilos | | Termófilo | Mesófilo |
| Helveticus | Jugurti | Bulgaricus | Lactis | ÁcidoPhilus | casei | Plantarum | Fermentis | Brevis |
| Cultivo a | 15º | - | - | - | - | - | + | + | - | + |
| 45º | + | + | + | + | + | - | - | + | - |
| Resistencia a | 60º / 90 min | + |  | - | + | - | - | - | - | - |
| 65º / 30 min | - |  | - | + | - | - | - | - | - |
| Ácido (%) en la leche | | 2,7 | 2,7 | 1,7 | 1,7 | 0,8 | 1,2 –  1,5 | 0,3 – 1,2 | 0,5 | 0,5 |
| Tipo de ácido láctico | | DL | Dl | D | D | DL | L | DL | DL | DL |
| Producción de | CO2 (azúcares) | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| NH3 (arginina) | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| Cultivo en presencia de | NaCl 2% | - |  | - | - | + | + | + | + | + |
| NaCl 4 & | - |  | - | - | - | + | + | + | + |
| Teepol 0,4 % |  |  |  |  |  | - | + | - | + |
| Exigencias nutritivas a) | | RP | RP | R | RC | RFC | PF | - | T | TF |
| Fermentación de pentosas b) | | - | - | - | - | - | - | +/- | - | + |
| Fermentación de otros azúcares c) | | 1 (4) | (4) | - | 1,2,3,4 | 1,2,3,4  (5), 6, 7 | 1,2,3,4,  6,7,9,0 | 1,2,3,4  5,6,7,8,  9,0 | 1, (4,5),8 | 1,5 |
| Hidrólisis de la esculina | | - | - | - | - | - | + | + | - | +/- |
| Grupo Serológico (Sharpe) | | A | A | E | E | ¿ | B, C | D | F | E |