



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Estudio de la diversidad de bacterias lácticas
nativas con actividad antimicrobiana, proteolítica
y aminogénica aisladas de salchichas huachanas
de elaboración artesanal**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga
Parasitóloga

AUTOR

Yessica Liliana HERRERA TORRES

ASESOR

Mg. Elena Luzgarda QUILLAMA POLO

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Herrera, Y. (2021). *Estudio de la diversidad de bacterias lácticas nativas con actividad antimicrobiana, proteolítica y aminogénica aisladas de salchichas huachanas de elaboración artesanal*. Tesis para optar el título de Bióloga Microbióloga Parasitóloga. Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	0000-0002-6334-3719 https://orcid.org/0000-0002-6334-3719
DNI del autor	70972827
Código ORCID del asesor (es)	0000-0002-7765-7874 https://orcid.org/0000-0002-7765-7874
DNI del asesor	10143497
Grupo de investigación	BIOPROSPECCIÓN DE MICROORGANISMOS CON POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO
Financiamiento	Perú Vicerrectorado de Investigación y Posgrado – UNMSM-Lima-Perú Proyectos de investigación con Financiamiento CON-CON Cpodigo: 131001301
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Perú, Lima, Lima, Lima Latitud: -12.058974 Longitud: -77.082275 en GD
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018-2020
Disciplinas OCDE	2.09.01 -- Biotecnología industrial_ https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.09.01



Universidad Nacional

(Universidad del Perú, Decana de América)

Mayor de San Marcos

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)**

Siendo las 16:00 horas del 08 de enero de 2021, en el Salón de Grados Virtual, mediante la herramienta MEET de Google con enlace <https://meet.google.com/hjt-cror-yqq>, el jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** de **YESSICA LILIANA HERRERA TORRES**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20200040834, la titulando expuso su tesis: **“ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DE BACTERIAS LÁCTICAS NATIVAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA, PROTEOLÍTICA Y AMINOGÉNICA AISLADAS DE SALCHICHAS HUACHANAS DE ELABORACIÓN ARTESANAL”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18, calificativo: APROBADO CON MENCIÓN HONROSA.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga** a **YESSICA LILIANA HERRERA TORRES** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 17:50 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 08 de enero de 2021.

Dr. TITO SANCHEZ ROJAS
(PRESIDENTE)

Mg. ELENA QUILLAMA POLO
(ASESORA)

Mg. MARIO ALCARRAZ CURI
(MIEMBRO)

Blga. JEANNE ALBA LUNA
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

A Dios, por haberme dado la vida y permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi formación profesional.

A mis padres, por ser el pilar más importante y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional.

A mi estimada profesora, Elena Luzgarda Quillama Polo por ofrecerme sus valiosos conocimientos, experiencia profesional y por hacerme crecer como persona.

A mis hermanos, Mauro y Rufo, los quiero mucho.

Agradecimientos

A mi asesora Mg. Elena Luzgarda Quillama Polo por la confianza mostrada en mi trabajo y por poner a mi disposición los medios necesarios para la realización del mismo. Su orientación y apoyo en todo momento fueron fundamentales, no sólo en las fases iniciales de este proyecto, sino en la consecución final del mismo.

A mis padres Ramiro y Emma, que constituyeron la fuerza principal para llevar a cabo este proyecto. Su apoyo, cariño y comprensión han sido los ejes, físicos y psicológicos, en los que se ha basado mi formación personal y profesional.

A mis tías Rosario y Lucy por su apoyo en cumplir mis objetivos de estudiar una carrera universitaria.

A mis amigos James y Alexander por sus palabras de ánimos y confianza depositada.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Industrial y Biotecnología Alimentaria por su apoyo y por los momentos que hemos compartido juntos.

A todos, gracias.

INDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO.....	5
2.1.	Fermentación de alimentos	5
2.2.	Salchichas fermentadas	5
2.3.	Bacterias lácticas	7
2.4.	Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas	11
2.5.	Sistema proteolítico de las bacterias lácticas	12
2.6.	Aminas biógenas	12
2.7.	Cultivos iniciadores en productos cárnicos	15
3.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
3.1.	Hipótesis.....	17
3.2.	Objetivos	17
3.2.1	Objetivo general	17
3.2.2	Objetivos específicos	18
4.	MATERIAL Y METODOS.....	19
4.1.	Material.....	19
4.1.1	Material biológico.....	19
4.1.2	Muestras	19
4.2.	Métodos.....	20
4.2.1	Aislamiento e identificación de cepas silvestres de bacterias lácticas asociadas a <i>salchichas huachanas</i>	20
4.2.2	Caracterización fenotípica de las cepas de bacterias lácticas aisladas de <i>salchichas huachanas</i>	20
4.2.3	Determinación de la capacidad homofermentativa y heterofermentativa	21

4.2.4	Búsqueda de cepas de bacterias lácticas con capacidad antagonista aisladas de <i>salchichas huachanas</i>	21
4.2.5	Determinación del espectro antimicrobiano de cepas bacterias lácticas frente a bacterias patógenas.....	22
4.2.6	Selección de cepas de bacterias lácticas con capacidad proteolítica aisladas de <i>salchichas huachanas</i>	22
4.2.7	Preselección de cepas lácticas asociadas a <i>salchichas huachanas</i> con capacidad aminogénica	23
5.	RESULTADOS	24
5.1	Aislamiento primario de cepas de bacterias lácticas asociadas a salchichas huachanas de elaboración artesanal.....	24
5.2	Caracterización fenotípica de cepas de <i>Lactobacillus</i> aisladas de salchichas huachanas.....	26
5.3	Detección de bacterias lácticas con capacidad antagonista	30
5.4	Determinación del espectro antimicrobiano de cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> con actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas contaminantes de alimentos	31
5.5	Selección de cepas de bacterias lácticas con capacidad proteolítica aisladas de salchichas huachanas	34
5.6	Selección de cepas lácticas asociadas a salchichas huachanas con capacidad aminogénica	36
6.	DISCUSIÓN.....	38
7.	CONCLUSIONES.....	44
8.	RECOMENDACIONES	45
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	46
10.	ANEXOS Y GLOSARIO	62
10.1.	ANEXOS.....	62
10.2	GLOSARIO.....	76

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de salchichas tipo Huacho

Tabla 2. Características morfológicas y fisiológicas de bacterias lácticas aisladas de *salchichas huachanas*

Tabla 3. Caracterización fenotípica de cepas de *Lactobacillus* aisladas de salchichas artesanales elaboradas en la localidad de huacho – lima

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* aisladas de *salchichas huachanas* frente a bacterias taxonómicamente afines

Tabla 5. Actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* aisladas de *salchichas huachanas* frente a bacterias patógenas contaminantes de alimentos

Tabla 6. Actividad proteolítica de cepas de *Lactobacillus* aisladas de *salchichas huachanas* de elaboración artesanal

Tabla 7. Descarboxilación de aminoácidos por cepas de *Lactobacillus* aisladas de salchichas fermentadas de la localidad de Huacho

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta metabólica de bacterias lácticas homofermentativas.

Figura 2. Ruta metabólica de bacterias lácticas heterofermentativas.

Figura 3. Principales aminas biógenas, aminoácidos precursores y enzimas que llevan a cabo su síntesis

Figura 4. Características morfológicas y culturales de *Lactobacillus plantarum* aisladas a partir de *salchichas huachanas*

Figura 5. Perfil de fermentación de carbohidratos de *Lactobacillus plantarum* aislados de “salchicha huachana” INDOL (+).

Figura 6. Perfil de fermentación de carbohidratos de *Lactobacillus sakei* aislados de “salchicha huachana” INDOL (-).

Figura 7. Producción de sustancias aromáticas (diacetilo) por *Lactobacillus plantarum* en medio Voges Proskauer.

Figura 8. Actividad antimicrobiana de *Lactobacillus plantarum* aisladas de salchichas de elaboración artesanal de Huacho frente a *Bacillus cereus*.

Figura 9. Capacidad de hidrólisis de proteínas *Lactobacillus plantarum* aisladas de salchichas de elaboración artesanal en Agar Leche descremada al 5%.

Figura 10. Capacidad de hidrólisis de proteínas de *Lactobacillus plantarum* en Agar MRS suplementado con Leche descremada al 5%.

Figura 11. Actividad aminogénica de *Lactobacillus plantarum* Sh9.LA4 y cepa referencial: *Klebsiella pneumoniae*

RESUMEN

Los productos cárnicos fermentados de origen peruano de importancia económica y nutricional, son las *salchichas huachanas* de elaboración artesanal. Estos embutidos, promueven el crecimiento de una microbiota nativa compuesta principalmente por bacterias lácticas productoras de sustancias antimicrobianas y enzimas proteolíticas. Algunas cepas pueden inhibir microorganismos contaminantes de alimentos e hidrolizar proteínas hasta aminoácidos libres, ocasionando en algunos casos la descarboxilación de ciertos aminoácidos hasta aminas biógenas. El objetivo, fue evaluar la diversidad de bacterias lácticas nativas con actividad antimicrobiana, proteolítica y aminogénica aisladas de *salchichas huachanas*.

Para el aislamiento primario, diluciones seriadas de las muestras procedentes de la localidad de Huacho, fueron sembradas por diseminación en agar Man Rogosa Sharpe (MRS) pH 6.5 e incubadas a 30°C por 72 horas en condiciones de microaerofilia. La identificación bioquímica se realizó utilizando el medio base de fermentación conteniendo diversos carbohidratos, incluyendo las pruebas de Gluconato de potasio y Voges Proskauer. La determinación de la actividad proteolítica y aminogénica de las cepas lácticas, se realizó por métodos bioquímicos y la búsqueda de la actividad antagonista por el método de bicapa respectivamente.

De un total de 117 cepas de bacterias lácticas aisladas de *salchichas huachanas* se identificaron 112 cepas de *Lactobacillus* (95,7%); 40 cepas de *Lactobacillus sakei* (35,7%), 32 de *Lactobacillus plantarum* (28,6%) y en menor porcentaje las especies de *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus alimentarius* y *Lactobacillus* spp. Además, se identificaron 5 cepas de *Pediococcus* sp. (4,3%). Asimismo, de acuerdo a sus características antagonistas se seleccionaron cuatro cepas de *Lactobacillus* productoras de compuestos antimicrobianos y veintitrés cepas con capacidad proteolítica. Ninguna de las cepas evaluadas mostró actividad aminoácido descarboxilasa.

En conclusión, se ha verificado el predominio de *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus plantarum*. De las cuales, solo cuatro cepas de *Lactobacillus plantarum* Sh8.C1, Sh8.C2, Sh9.LA1, Sh9.LA2 mostraron actividad antagonista y proteolítica con posibilidades de ser utilizadas como controladores biológicos y seguras desde un punto de vista nutricional.

PALABRAS CLAVE: Biodiversidad, *Lactobacillus*, *salchichas huachanas*, actividad antagonista y proteolítica.

ABSTRACT

The fermented meat products of Peruvian origin of economic and nutritional importance are artisanal *huachanas sausages*. These sausages promote the growth of a native microbiota composed mainly of lactic acid bacteria that produce antimicrobial substances and proteolytic enzymes. Some strains can inhibit food contaminating microorganisms and hydrolyze proteins to free amino acids, in some cases causing the decarboxylation of certain amino acids to biogenic amines. The objective was to evaluate the diversity of native lactic bacteria with antimicrobial, proteolytic and aminogenic activity isolated from *huachanas sausages*.

For primary isolation, serial dilutions of samples from the Huacho locality were seeded by dissemination on Man Rogosa Sharpe agar (MRS) pH 6.5 and incubated at 30 °C for 72 hours under microaerophilic conditions. Biochemical identification was performed using the base fermentation medium containing various carbohydrates, including the Potassium Gluconate and Voges Proskauer tests. The determination of the proteolytic and aminogenic activity of the lactic strains was carried out by biochemical methods and the search for antagonistic activity by the bilayer method, respectively.

From a total of 117 strains of lactic acid bacteria isolated from *huachanas sausages*, 112 strains of *Lactobacillus* (95.7%) were identified, of which 40 resulted from strains of *Lactobacillus sakei* (35.7%), 32 from *Lactobacillus plantarum* (28.6%) and in a smaller percentage the species of *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus alimentary* and *Lactobacillus* spp. In addition, 5 strains of *Pediococcus* sp. (4.3%). Also, according to their antagonistic characteristics, four *Lactobacillus* strains that produce antimicrobial compounds and twenty-three strains with proteolytic capacity were selected. None of the strains evaluated showed amino acid decarboxylase activity.

In conclusion, the predominance of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus plantarum* has been verified. Of which, only four strains of *Lactobacillus plantarum* Sh8.C1, Sh8.C2, Sh9.LA1, Sh9.LA2 showed antagonistic and proteolytic activity with possibilities of being used as biological controllers and safe from a nutritional point of view.

KEY WORDS: Biodiversity, *Lactobacillus*, *huachanas sausages*, antagonistic and proteolytic activity.

1. INTRODUCCIÓN

La fermentación es un método de conservación y prolongación de la vida útil de la carne, donde los microorganismos como las bacterias lácticas y ciertas especies de *Staphylococcus* intervienen. Para su propagación estos microorganismos utilizan estos alimentos como un sustrato, y constituye una de las tecnologías de preservación de alimentos utilizadas desde la antigüedad (Cvrtila *et al.*, 2012).

Con el transcurrir de los años, se convirtió en parte de la norma cultural y tradicional en la mayoría de las comunidades rurales. La gente del campo ha llegado a preferir los alimentos fermentados por su agradable sabor, textura y color. Esta popularidad ha hecho de los alimentos fermentados uno de los principales componentes dietéticos y varían según las regiones debido a la variación en el clima, patrones sociales, prácticas de consumo entre otros (Law *et al.*, 2011).

Los productos cárnicos fermentados, denominados embutidos, han sido preparados artesanalmente porque no se sabía la participación microbiana benéfica, así como sus actividades metabólicas y los cambios sensoriales que se desarrollaban en el producto final. Actualmente, para obtener productos cárnicos fermentados más estables se adicionan cultivos iniciadores naturales o comerciales a la materia prima. Estos microorganismos intervienen durante el proceso de fermentación y maduración de los productos cárnicos ejerciendo una actividad enzimática intensa (Price & Schweigert, 1994).

Las salchichas manufacturadas con tecnologías tradicionales, favorece el crecimiento de una microbiota autóctona, especialmente bacterias lácticas. Estos microorganismos tienen la capacidad de producir ácido láctico por la fermentación de

carbohidratos, el cual puede contribuir a la seguridad del proceso (Montel *et al.*, 1998). Sin embargo, no siempre se puede asegurar que el número y la variedad de estos microorganismos presentes en la materia cruda sea la misma y tenga el mismo comportamiento. En este sentido, la producción de salchichas de cerdo de elaboración artesanal, puede generar problemas de normalización y homogenización. Además, es improbable que se obtengan productos seguros garantizados bajo estas condiciones (Coppola *et al.*, 1997).

Durante la fermentación, maduración y secado de las salchichas, ocurren diversos procesos fisicoquímicos, bioquímicos y microbianos e influyen en la calidad y seguridad de los productos. Diferentes microorganismos derivados de la materia prima y del ambiente se establecen de forma natural en las salchichas, siendo las bacterias lácticas los microorganismos predominantes (Sawitzki *et al.*, 2009).

Las bacterias lácticas, son microorganismos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos y contaminantes de alimentos. Debido a que producen sustancias antimicrobianas como: ácidos orgánicos, con el consiguiente descenso del pH, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, bacteriocinas, reuterinas, entre otros (Holzapfel *et al.*, 1995; Casaus, 1998).

Por otro lado, ciertas cepas de bacterias lácticas y de *Staphylococcus* tienen la capacidad de hidrolizar las proteínas y lípidos hasta aminoácidos y ácidos grasos libres respectivamente, contribuyendo a potenciar la calidad nutricional y organoléptica de los mismos (Stiles & Hastings, 1991; Kato *et al.*, 1994; Drosinos *et al.*, 2007; Benito *et al.*, 2007 y Arrazola *et al.*, 2016). Sin embargo, algunos aminoácidos pueden sufrir una descarboxilación y transformarse en aminas secundarias (histamina, tiramina y putrescina) ocasionando serios problemas en la salud del consumidor. Diversos

estudios han evidenciado que la concentración de estas aminas biógenas es más elevada en los productos de fermentación natural (no controlada) que en los productos en los que se emplean cultivos iniciadores comerciales dado que estos carecen de descarboxilasas (Bover-Cid *et al.*, 2005; Casaus, 1998).

Las salchichas elaboradas por fermentación espontánea, constituyen una fuente natural de una diversidad de microorganismos, principalmente bacterias lácticas. Muchas de estas bacterias, sintetizan una variedad de metabolitos de importancia biotecnológica como: ácido láctico, ácido acético, bacteriocinas, reuterina, compuestos aromáticos, enzimas proteolíticas, lipolíticas, amilolíticas, y otros de interés industrial. Además, están conformadas por los géneros *Lactobacillus*, *Leuconoscoc* y *Pediococcus*; predominando *Lactobacillus*, siendo las especies más importantes *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus plantarum*, seguido de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus alimentarius*, etc. Actualmente, estas especies son utilizadas como cultivos iniciadores o starter (Bottazzi, 1988; Krockel, 1995).

Según Hammes (1996) y Lucke (2000), los cultivos iniciadores de carne, son microorganismos vivos o en reposo con actividad metabólica deseable y pueden ser utilizados para resaltar las propiedades sensoriales, mejorar la seguridad sanitaria mediante la inactivación de patógenos, optimizar la estabilidad del producto, extender la vida útil y la calidad higiénica de los embutidos.

Se sabe también que las salchichas de elaboración artesanal sometidas a un periodo de maduración, adquieren características sensoriales más agradables como consecuencia de la composición y actividad metabólica de la microbiota autóctona, en comparación con las salchichas fabricadas con cultivos iniciadores comerciales y producidos a escala industrial (Samelis *et al.*, 1998). Por lo tanto, las bacterias lácticas

nativas debidamente seleccionadas que se logren aislar e identificar a través de este estudio, pueden ser utilizadas como cultivos bioprotectores y/o sus metabolitos antimicrobianos en la producción y conservación de salchichas regionales. Además, su empleo puede estandarizar las características sensoriales típicas del producto, asegurar su calidad higiénico-sanitaria y tener importantes repercusiones económicas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Fermentación de alimentos

La fermentación es una de las tecnologías de procesamiento de productos fermentados más antiguas que se conoce para preservar alimentos y bebidas. Desde los albores de la civilización, se han descrito métodos para la fermentación de leches, carnes y vegetales, con los registros más antiguos que datan del año 6000 a.C. (Caplice & Fitzgerald, 1999). Los procesos de fermentación se utilizan para prolongar la vida útil y la seguridad de los alimentos, lo que permite a las personas sobrevivir a las estaciones invernales y los períodos de sequía en regiones moderadas y frías (Sawitzski *et al.*, 2009).

Los alimentos fermentados se definen en general como productos agradables que se preparan a partir de diversas materias primas mediante un proceso en el que participan microorganismos benéficos como las bacterias lácticas, cocos, levaduras entre otros (Buckenhuskes, 1993; Sawitzski *et al.*, 2009).

2.2. Salchichas fermentadas

Las salchichas fermentadas en general se producen como resultado de la fermentación láctica de una mezcla de carne picada mezclada con grasa, sal, agentes de curado (nitrito / nitrito), azúcar y especias, y representan alimentos tradicionales de Europa central y meridional (Caplice & Fitzgerald, 1999).

En el Perú, el consumo de embutidos especialmente las *salchichas huachanas* de elaboración artesanal tienen gran aceptación por los consumidores porque durante su

producción y comercialización utilizan materia prima de excelente calidad, no se agrega aditivos ni preservantes químicos. Además, tienen propiedades nutritivas y un sabor muy agradable apreciado por los consumidores por lo que pueden contribuir al desarrollo socioeconómico de Lima y pueblos aledaños.

La salchicha huachana en especial, es un embutido típico de la gastronomía de la región de Lima, cuyo origen es la localidad de Huacho. Hasta la fecha, se elaboran aún estos productos en base a métodos tradicionales transmitidos de generación en generación. Según los productores locales de *salchichas huachanas*, la preparación consiste en utilizar 12 kilogramos de carne, 2 kilogramos de grasa de cerdo (*Sus scrofa domesticus*) de buena calidad, pimienta (*Piper nigrum*) y comino (*Cuminum cyminum*) en proporción de 30% y 70% respectivamente, 250 gramos de ajos (*Allium sativum*) molidos y sal al gusto. Después, se adiciona a la mezcla anterior, achiote (*Bixa orellana*) rojo o amarillo previamente frito y jugo de una naranja agria (*Citrus × aurantium*). Ocasionalmente algunos productores le agregan nuez moscada (*Myristica fragrans*) y ají amarillo (*Capsicum baccatum*). Seguidamente todos los ingredientes se mezclan homogéneamente y se deja reposar por un tiempo de 8 horas. Transcurrido el tiempo de macerado, se rellena la mezcla en tripas naturales de cerdo tratadas previamente en salmuera con 24 horas de anticipación, luego, son colgadas en ganchos de acero a temperatura ambiente por 24 a 72 horas. Durante esta etapa los microorganismos presentes en la carne metabolizan los azúcares y disminuyen el pH hasta valores próximos a 5.0 (Pablo, 2010; Martín, 2005).

Tabla 1. Composición de salchichas tipo Huacho

Composición por 100 g de porción comestible	Gramos (g)
Agua	38.2
Proteína	12.9
Grasa	44.0
Carbohidratos totales	2.4
Fibra	-
Composición por 100 g de porción comestible	Miligramos (mg)
Calcio	80
Fosforo	92
Hierro	5.5
Tiamina	0.03
Riboflavina	0.20
Niacina	2.15

Fuente: Reyes *et al.*, 2009.

2.3. Bacterias lácticas

Las bacterias lácticas están ampliamente distribuidas en la naturaleza, comprenden un diverso grupo de microorganismos cocos o bacilos Gram positivos, anaerobios facultativos, catalasa negativos y no formadoras de esporas, son quimioorganotróficos y solamente crecen en medios complejos, producen ácido láctico como el principal producto metabólico y son muy exigentes nutricionalmente. Además, contribuyen al sabor, aroma, textura y el valor nutricional de los alimentos fermentados mejorando la digestibilidad y preservación del producto final (Parra, 2010).

Las bacterias lácticas pertenecen al phylum Firmicutes que comprende alrededor de 20 géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenocooccus*, *Vagococcus* y *Weisella*, siendo el género *Lactobacillus* más relevante. La identificación fenotípica de bacterias lácticas se basa en métodos microscópicos, culturales, fisiológicos, metabólicos y bioquímicos (Sharpe, 1962; Parra, 2010).

Las rutas metabólicas que siguen las bacterias lácticas para utilizar las hexosas están divididas en dos grupos: homofermentativo y heterofermentativo (Figura 1 y Figura 2). Las bacterias homofermentativas como *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y algunos lactobacilos, producen ácido láctico como producto principal o único de la fermentación de la glucosa. Sin embargo, bajo condiciones de crecimiento alteradas y cuando el sustrato inicial es una pentosa, esto puede cambiar (Kandler, 1983). Los homofermentadores utilizan la vía de Embden-Meyerhof-Parnas para generar dos moles de lactato por mol de glucosa y obtienen aproximadamente el doble de energía por mol de glucosa que los heterofermentadores. Los heterofermentadores como *Weisella* y *Leuconostoc* y algunos lactobacilos producen cantidades equimolares de lactato, CO₂ y etanol a partir de la glucosa a través de la vía de monofosfato de hexosa o pentosa.

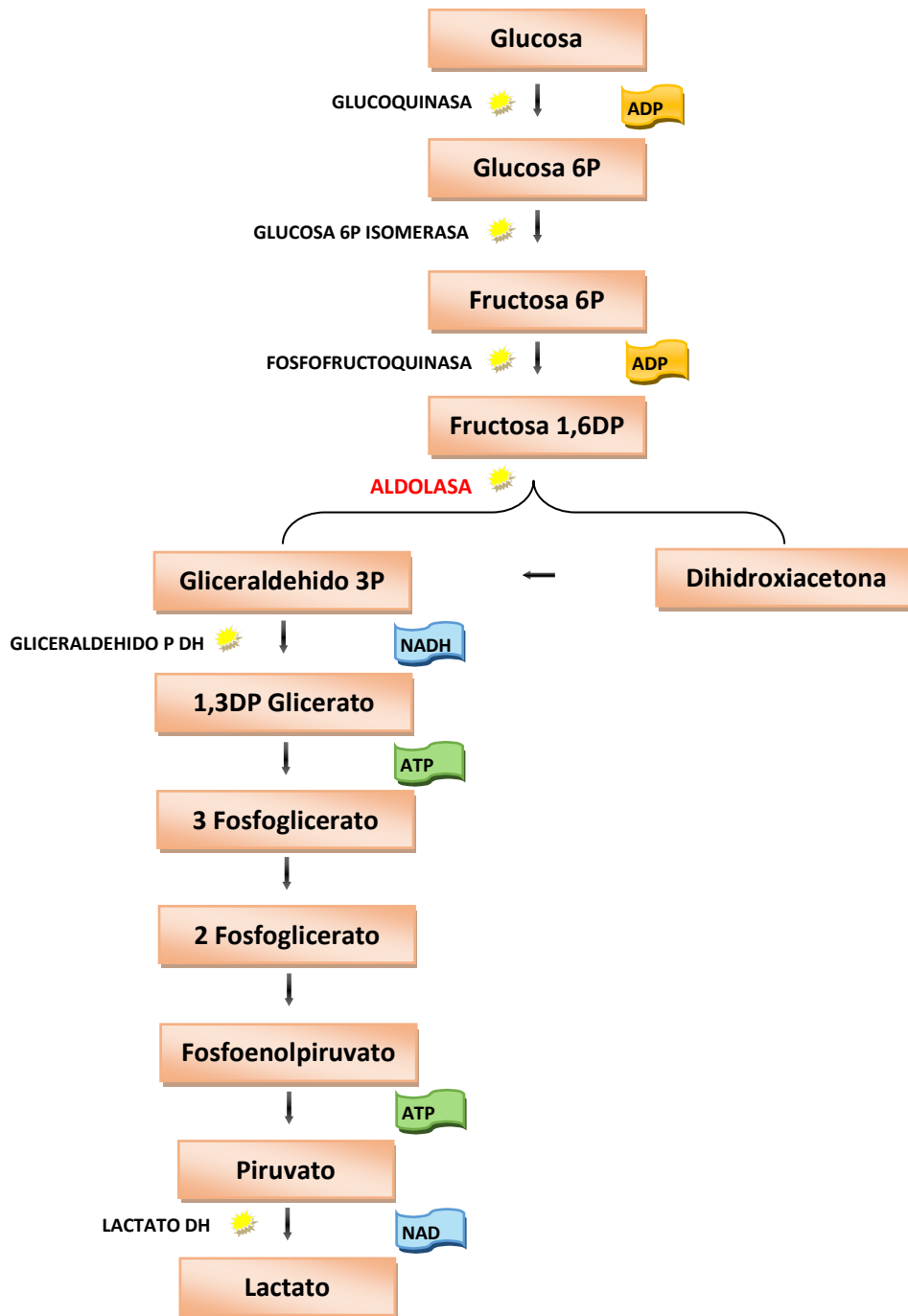


Figura 1. Ruta metabólica de bacterias lácticas homofermentativas. Adaptado de Lucio (2014).

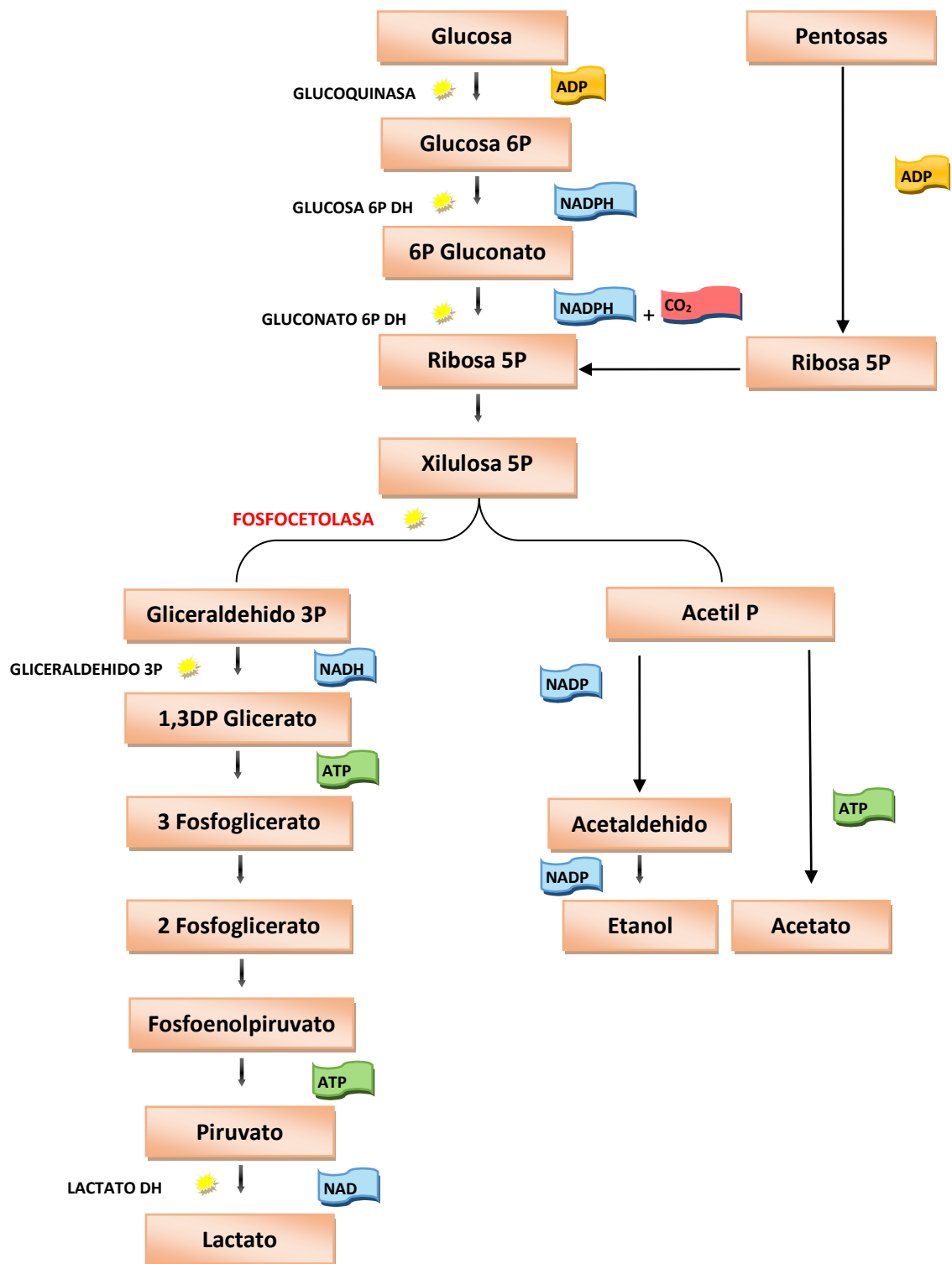


Figura 2. Ruta metabólica de bacterias lácticas heterofermentativas (Adaptado de Lucio, 2014).

2.4. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas

Algunas bacterias lácticas, además de sus propiedades tecnológicas tienen la capacidad de producir sustancias antimicrobianas que suprimen el crecimiento de microorganismos patógenos contaminantes de alimentos. La actividad antagonista de las bacterias lácticas se debe a la formación de ácidos orgánicos, especialmente ácido láctico, ácido acético, etc.; así como la producción de otras sustancias antimicrobianas como etanol, CO₂, diacetilo, peróxido de hidrógeno, reuterinas y bacteriocinas que son sustancias proteicas de síntesis ribosomal. Las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son las más utilizadas para la preservación de alimentos porque son fácilmente degradadas por las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal, además, no son tóxicas ni inmunógenas (Klaenhammer, 1993; Cintas *et al.*, 2000; Caplice & Fitzgerald, 1999; Lücke, 2000; Galvez *et al.*, 2007; Da Costa *et al.*, 2019). Asimismo, estos microorganismos predominan en los embutidos y participan en todos los procesos de maduración (Hammes *et al.*, 1990), siendo las especies más frecuentes *Lactobacillus sakei*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, *L. pentosus*, *Pediococcus acidilactici* y *P. pentasaceus* (Geisen *et al.*, 1992). Estos microorganismos son reconocidos generalmente como seguros (GRAS) por la FAO (1997) por ser inocuos. En estos últimos años han sido considerados como excelentes candidatos para su uso como cultivos iniciadores y/o probióticos. La demanda actual del consumidor se orienta hacia la búsqueda de microorganismos con propiedades benéficas para la salud; y al desarrollo e incorporación de nuevos alimentos funcionales.

2.5. Capacidad proteolítica de las bacterias lácticas

La proteólisis es la transformación de las proteínas por acción del sistema proteolítico de las bacterias lácticas en aminoácidos y compuestos derivados simples para su transporte dentro de la célula (Smit *et al.*, 2005). La hidrólisis de las proteínas cárnicas en particular ha sido estudiada ampliamente debido a su capacidad de mejorar las características sensoriales del producto. La capacidad de algunas cepas de *Lactobacillus* es convertir las proteínas de músculo sarcoplásmico de cerdo en péptidos que podrían desempeñar un papel en el sabor. Los aminoácidos intracelulares, di-, y tripeptidasas de *Lactobacillus* fueron reportados como responsables de la generación de pequeños péptidos y aminoácidos, que contribuyen ya sea como potenciadores directos del sabor o como precursores de otros compuestos de sabor durante la maduración de salchichas fermentadas (Kok & De Vos, 1994; Christensen *et al.*, 1999; Doeven *et al.*, 2005; Fontana *et al.*, 2011).

2.6. Aminas biógenas

Las aminas biógenas son sintetizadas por ciertas bacterias lácticas, a partir de la descarboxilación de aminoácidos residuales presentes en el medio, como la histidina, tirosina u ornitina (Muñoz *et al.*, 2011; Sumbly *et al.*, 2014). La descarboxilación de los aminoácidos es llevada a cabo mediante las enzimas histidina descarboxilasa, tirosina descarboxilasa u ornitina descarboxilasa, generando aminas biógenas como histamina, tiramina o putrescina respectivamente (Figura 3). Estas tres aminas biógenas, junto con la cadaverina, son las que prevalecen en productos alimentarios, seguidas de la feniletilamina, espermina o triptamina (Smit *et al.*, 2008). El consumo de concentraciones elevadas de aminas biógenas puede ocasionar una intoxicación

similar a alergias y otras intoxicaciones de tipo alimentario (cefaleas, trastornos gastrointestinales, urticarias, etc.) (Ruiz-Capillas & Jiménez-Colmenero, 2004).

Como riesgo adicional indirecto de algunas aminas biógenas puede mencionarse su intervención en la formación de nitrosaminas potencialmente cancerígenas, especialmente en los productos cárnicos con nitratos y nitritos tratados térmicamente o ahumados. Sin embargo, las concentraciones de nitrosaminas en carne y productos cárnicos, excepto en el bacon, suelen ser bajas. Dado que son muy pocos los estudios sobre la posible relación entre el contenido de aminas biógenas y la aparición de nitrosaminas, se hace difícil confirmar el verdadero riesgo de formación de las mismas a partir de las aminas biógenas de los productos cárnicos. Por lo tanto, la detección de aminas biógenas en embutidos, especialmente en las salchichas de elaboración artesanal, es importante desde un punto de vista higiénico sanitario como indicadores de seguridad (Bover Cid, 2005; Triki, 2013).

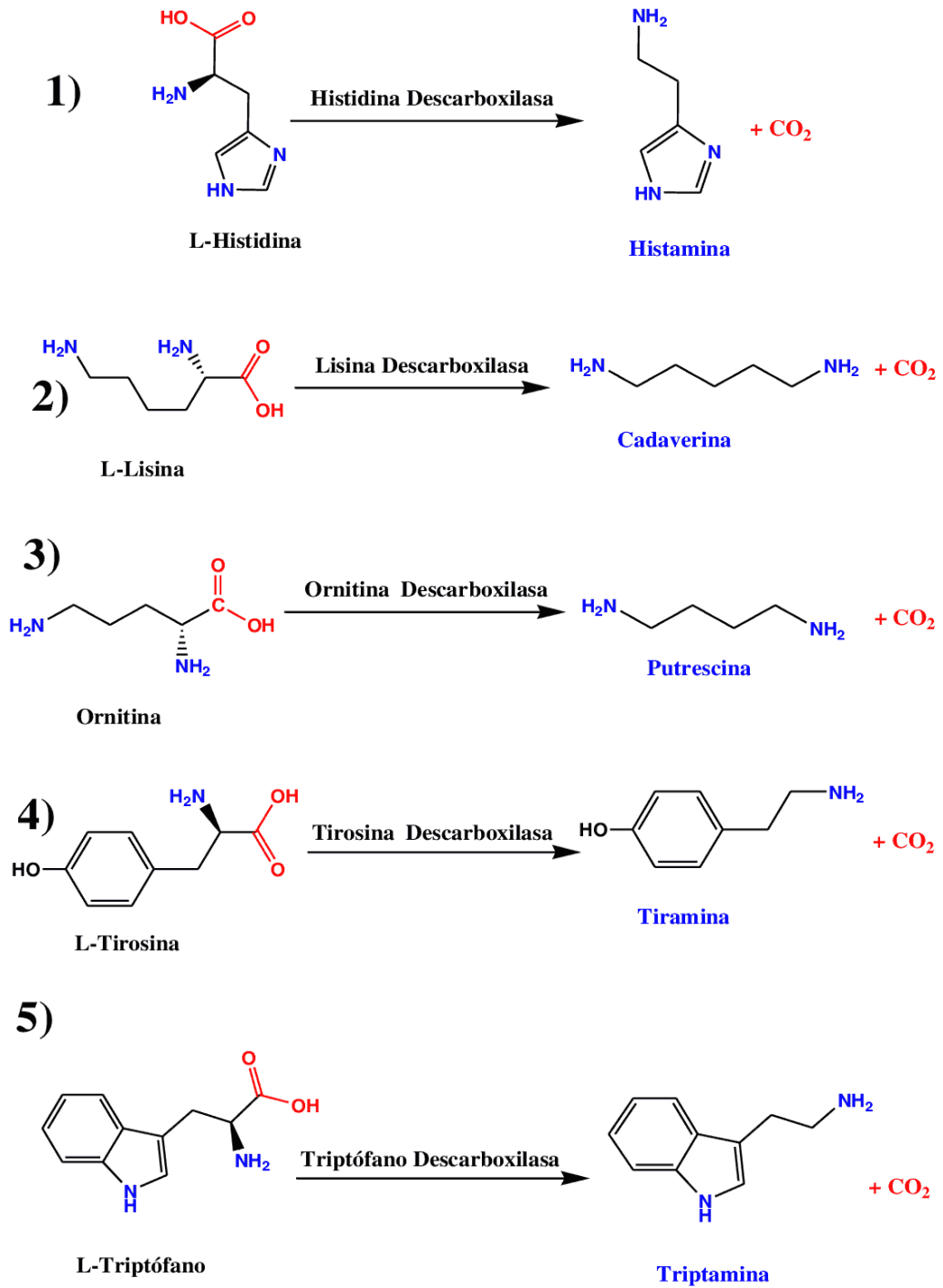


Figura 3. Principales aminoácidos precursores, aminas biógenas y enzimas descarboxilasas. Adaptado de López (2017).

2.7. Cultivos iniciadores en productos cárnicos

Los cultivos iniciadores son cultivos microbianos individuales o mixtos utilizados en concentraciones adecuadas para promover y realizar una adecuada fermentación de productos cárnicos. Las bacterias lácticas (BL) y los estafilococos coagulasa negativos (SNC), así como las levaduras y los mohos, pueden ser utilizados como cultivos iniciadores. Estos microorganismos aumentan la seguridad de los productos cárnicos fermentados mediante una rápida acidificación o producción de sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas. Además, los cultivos iniciadores pueden mejorar las características sensoriales del producto y acortar los tiempos de maduración. Los cultivos iniciadores pueden ser utilizados como controladores biológicos para suprimir agentes patógenos transmitidos por alimentos (*Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, etc.); y no producir aminas biógenas, nitrosaminas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) y micotoxinas. Los cultivos iniciadores son considerados GRAS (Generalmente reconocidos como seguros) por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) (Holzapfel *et al.*, 2003; Fraqueza *et al.*, 2016).

Ciertas especies de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus* son utilizados como cultivos iniciadores en la elaboración de productos cárnicos fermentados (Fraqueza *et al.*, 2016).

Para la selección de cultivos iniciadores es importante tener en cuenta los siguientes criterios: Materia prima óptima, las propiedades de la cepa, los requisitos de seguridad alimentaria y los atributos de calidad (Holzapfel *et al.*, 2003).

En la actualidad, los cultivos iniciadores de bacterias lácticas son utilizados para la fabricación de productos cárnicos fermentados como “Paio do Alentejo”, “Dacia” y “Painho da Beira Baixa” (PBB) de Portugal (Elias *et al.* 2014; Ciuciu Simion *et al.*, 2014; Dias *et al.* 2020); así como para obtener salchichas fermentadas chinas (Wang *et al.*, 2013); salchichas fermentadas griegas (Baka *et al.*, 2011); salchicha de cerdo tradicional tailandesa denominada “Nham” (Luxananil *et al.*, 2009); salchicha fermentada tipo Milano de Italia (Montanari *et al.* 2018), entre otros.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Formulación de la hipótesis

Los productos cárnicos obtenidos por fermentación espontánea son muy consumidos por la mayoría de los pobladores de cada región, por su alto valor nutritivo y cualidades sensoriales deseables. Uno de estos productos es la “salchicha huachana” de elaboración artesanal y constituye una fuente potencial de bacterias lácticas nativas. Por lo tanto, formulamos la siguiente Hipótesis:

Hipótesis

Es posible aislar y seleccionar nuevas bacterias lácticas autóctonas con capacidades antimicrobianas, proteolíticas y no aminogénicas a partir de *salchichas huachanas*, para ser utilizados como cultivos iniciadores y/o probióticos en la manufactura de productos mejorados.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

- Evaluar la diversidad de bacterias lácticas nativas con actividad antimicrobiana, proteolítica y aminogénica asociadas a *salchichas huachanas* de elaboración artesanal.

3.2.2 Objetivos específicos

- Aislar e identificar la diversidad de cepas nativas de bacterias lácticas a partir de *salchichas huachanas*.
- Seleccionar cepas silvestres de bacterias lácticas con actividad antimicrobiana frente a bacterias taxonómicamente afines.
- Determinar el espectro antimicrobiano de las cepas lácticas seleccionadas contra bacterias patógenas contaminantes de alimentos.
- Determinar cepas lácticas nativas con actividad proteolítica de *salchichas huachanas* tradicionales.
- Detectar bacterias lácticas silvestres productoras de aminas biógenas en salchichas de la región de Huacho.

4. MATERIAL Y METODOS

4.1 Material

4.1.1 Material biológico

Las cepas de *Lactobacillus plantarum* E2 (cepa productora de sustancia antimicrobiana) y *Lactobacillus fermentum* ChJ4C (cepa sensible) fueron utilizadas como cepas de referencia. Asimismo, las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria ivanovii subsp. Ivanovii* ATCC 19119 y *Listeria innocua* ATCC 33090, incluyendo *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes* fueron empleadas como posibles cepas indicadoras contaminantes de alimentos. Las cepas en mención, fueron obtenidas de la colección del banco de cepas Cultivos iniciadores y probióticos lácticos (CIPROLAC), que pertenece al Laboratorio de Microbiología Industrial y Biotecnología Alimentaria, Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM.

4.1.2 Muestras

Las salchichas manufacturadas tradicionalmente fueron obtenidas de dos mercados de la localidad de Huacho, y se transportaron en condiciones asépticas y en refrigeración al Laboratorio de Microbiología Industrial y Biotecnología Alimentaria – Facultad de Ciencias Biológicas – UNMSM para su inmediato procesamiento.

4.2 Métodos

4.2.1 Aislamiento e identificación de cepas silvestres de bacterias lácticas asociadas a *salchichas huachanas*

Para el aislamiento de bacterias lácticas, se procesaron 14 muestras de salchichas huachanas (100 gr / muestra) procedentes de la Región de Huacho – Lima, y se realizaron diluciones seriadas en solución salina estéril al 0.85%, luego fueron sembradas por diseminación en Agar Man Rogosa Sharpe (MRS) pH 6,5 más cicloheximida 0.02 %. La incubación se realizó en condiciones de microaerofilia a 30°C por 72 horas. Las cepas típicas identificadas como cocos, cocobacilos y bacilos Gram positivos, no móviles, no esporulados, oxidasa negativos y catalasa negativos, fueron mantenidas en caldo MRS pH 6.5 a 4°C por 3 meses.

4.2.2 Caracterización fenotípica de las cepas de bacterias lácticas aisladas de *salchichas huachanas*

La identificación de las cepas lácticas se realizó por métodos bioquímicos a partir de cultivos puros y activos previamente centrifugados a 4500 rpm por 20 minutos, fueron sembrados en medio base de fermentación conteniendo carbohidratos (1%): glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, manitol, ribosa, rafinosa, galactosa, arabinosa, celobiosa, melobiosa, sorbitol y xilosa, además se incluyó la prueba de Voges-Proskauer para detectar cepas lácticas con capacidad aromática, y se incubaron a 30°C por 24 a 96 horas en condiciones de microaerofilia (Sharpe, 1962; Jayne-Williams, 1975, 1976; Kandler, 1983; Kandler & Weiss, 1986 y Schillinger & Lücke, 1987).

4.2.3 Determinación de la capacidad homofermentativa y heterofermentativa

Para seleccionar cepas homolácticas y heterolácticas asociadas a las *salchichas huachanas*, los cultivos puros y activos de los aislados se sembraron en caldo Gluconato de Potasio pH 6,5 y se agregaron a los cultivos sembrados una capa de Vaspar (vaselina con parafina 1:1). Luego se incubaron a 30°C y la lectura se realizó de 48 a 94 horas. La producción de CO₂ se verificó por la presencia de burbujas y desplazamiento de la capa de Vaspar.

4.2.4 Búsqueda de cepas de bacterias lácticas con capacidad antagonista aisladas de *salchichas huachanas*

Para la búsqueda de cepas nativas de bacterias lácticas productoras de sustancias antimicrobianas y cepas sensibles taxonómicamente afines a dichos compuestos, los cultivos de 24 horas en grupos de 10 cepas, fueron moteados en la superficie de placas con agar MRS (1.5% de agar) por el método de la bicapa e incubadas a 30°C por 24 horas en condiciones de microaerofilia hasta conseguir colonias bien desarrolladas (posibles productoras), a continuación, los cultivos activos de las bacterias lácticas en fase logarítmica (posibles cepas sensibles), se inocularon a cada tubo conteniendo 10 mL de Agar MRS semisólido (1% de agar) a 45°C, luego éstos cultivos debidamente homogenizados, fueron vertidos sobre la superficie de las colonias moteadas bien desarrolladas y previamente tratadas con cloroformo por 30 minutos. La lectura se realizó después de 24 horas de incubación y los diámetros de los halos de inhibición que se formaron fueron expresados en milímetros.

4.2.5 Determinación del espectro antimicrobiano de cepas bacterias lácticas frente a bacterias patógenas

Los cultivos activos de las cepas seleccionadas productoras de sustancias antimicrobianas en fase logarítmica tardía, fueron sembradas por puntura o moteado en la superficie de placas con agar MRS (1.5% de agar) e incubadas a 30°C por 24 horas en condiciones de microaerofilia hasta conseguir colonias bien desarrolladas. Luego, los cultivos de 12 horas de crecimiento de las bacterias patógenas contaminantes de alimentos, se inocularon 100 µL de cada una de las cepas a los frascos respectivos conteniendo 10 mL de agar Brain Heart Infusion (BHI) semisólido a 45°C. Seguidamente, los cultivos debidamente homogenizados fueron vertidos sobre la superficie de las colonias desarrolladas de bacterias lácticas productoras de sustancias antimicrobianas por el método de la bicapa. La lectura se realizó después de 24 horas de incubación y los diámetros de los halos de inhibición fueron expresados en milímetros (Kékessy & Piguet, 1970).

4.2.6 Selección de cepas de bacterias lácticas con capacidad proteolítica aisladas de *salchichas huachanas*

Para la exploración de las bacterias lácticas con capacidad proteolítica, los cultivos activos de las respectivas cepas bacterianas de 18 horas de crecimiento, fueron sembrados por puntura o por inoculación en agar leche descremada, agar caseinato de calcio y agar MRS suplementado con extracto sarcoplásmico respectivamente. Luego fueron incubados a 30°C por 24 a 48 horas. Las cepas con mayor capacidad de hidrólisis (halos de mayor diámetro) fueron seleccionadas para su posterior estudio (Molina & Tóldra, 1992; Mauriello *et al.*, 2002).

4.2.7 Preselección de cepas lácticas asociadas a *salchichas huachanas* con capacidad aminogénica

La producción de aminas biogénicas se evaluó usando el medio descarboxilasa modificado descrito por Bover-Cid & Holzapfel (1999). Los cultivos bacterianos de 12 horas de crecimiento, se inocularon en el medio de cultivo (g/L): triptona 5 g; extracto de levadura 5 g; extracto de carne 5 g; cloruro de sodio 2,5 g; glucosa 0,5 g; Tween 80 1 mL ; MgSO₄ 0,2 g; MnSO₄ 0,05 g; FeSO₄ 0,04 g (Merck); citrato de amonio 2 g; tiamina 0,01 g; K₂HPO₄ 2 g; CaCO₃ (Merck) 0,1 g; piridoxal-5-fosfato 0,05 g; púrpura de bromocresol 0,05 g a pH 5,3 y suplementado independientemente con 10 g de lisina, tirosina, ornitina o histidina (todas de Sigma-Aldrich). Como resultado, el cambio de color de amarillo a púrpura indica la presencia de la actividad aminoácido descarboxilasa.

5. RESULTADOS

5.1 Aislamiento primario de cepas de bacterias lácticas asociadas a *salchichas huachanas* de elaboración artesanal

De un total de 14 muestras de *salchichas huachanas* artesanales procedentes de 02 mercados de la localidad de Huacho – Perú, se aislaron 117 cepas de bacterias lácticas, de los cuales se identificaron presuntivamente 112 cepas de *Lactobacillus spp* (95.7%) y 5 cepas de *Pediococcus sp* (4.3%) (Tabla 2, Figura 4).

Tabla 2. Características morfológicas y fisiológicas de bacterias lácticas aisladas de *salchichas huachanas*

Características	<i>Lactobacillus</i> (112 cepas)	<i>Pediococcus</i> (05 cepas)
Comportamiento en caldo MRS pH 6.5	Sedimento en botón blanco moderado, turbidez en neblina u homogénea, sin película.	Sedimento en botón blanco moderado, turbidez homogénea, sin película.
Coloración Gram	Bacilos largos o cortos y cocobacilos Gram positivos.	Cocos Gram positivo en pares o en cadenas, pleomórficas.
Morfología de las colonias	Colonias grandes y medianas (3-2 mm), borde entero y liso, blanco lechosas, brillosas y elevadas.	Colonias pequeñas (1 mm), borde entero y liso, blanco cremosas y ligeramente brillosas.
Prueba catalasa	-	-

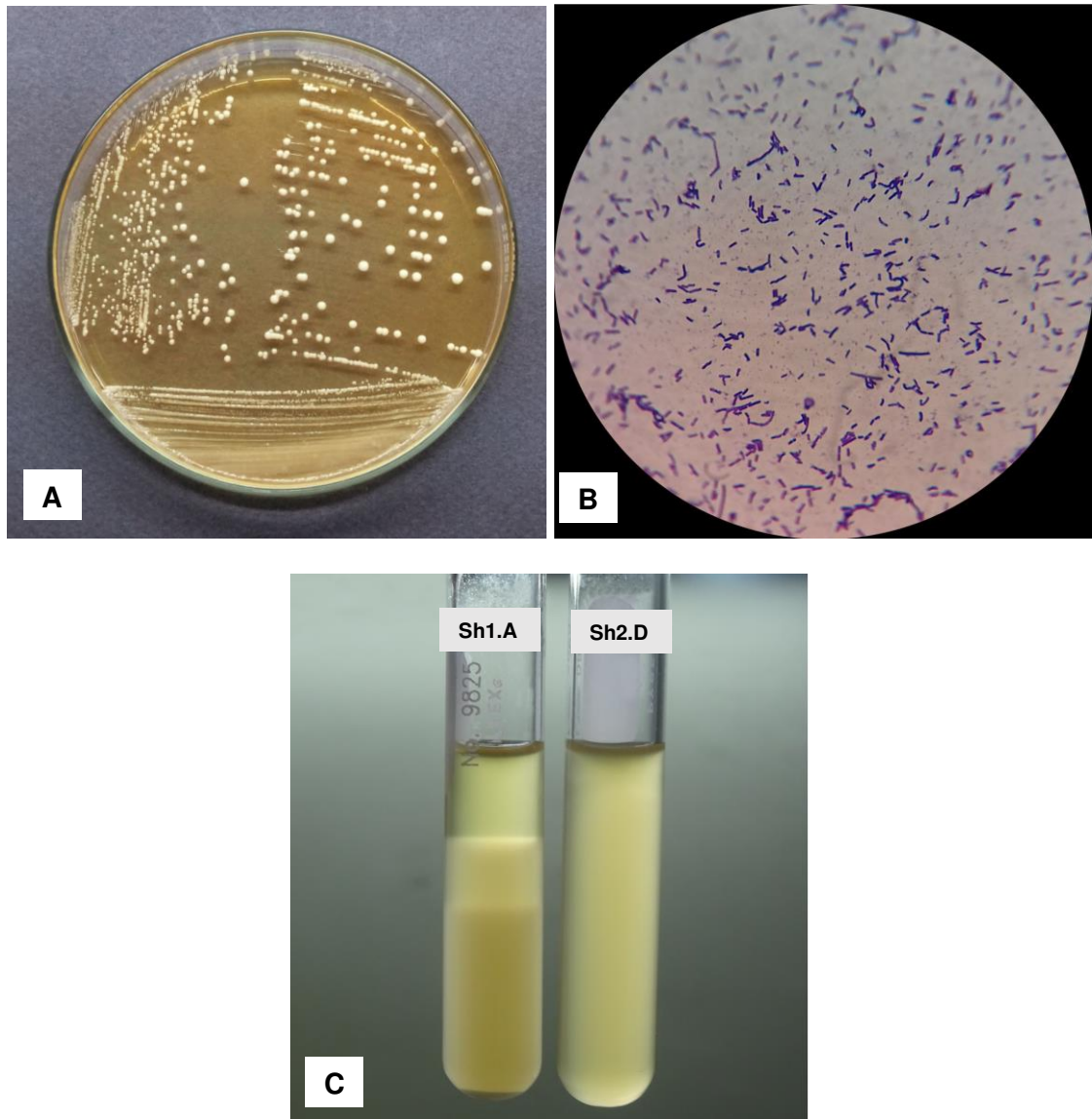


Figura 4. Características morfológicas y culturales de cepas de *Lactobacillus* aisladas a partir de *salchichas huachanas*

A: Colonias típicas de *Lactobacillus* en agar MRS pH 6.5

B: Bacilos Gram positivos

C: Comportamiento en caldo MRS pH 6.5 de cepas de *Lactobacillus*

5.2 Caracterización fenotípica de cepas de *Lactobacillus* aisladas de salchichas huachanas

De un total de 112 cepas del género *Lactobacillus* aisladas a partir de *salchichas huachanas*, se logró identificar 40 de cepas de *Lactobacillus sakei* (35.7%), 32 de *Lactobacillus plantarum* (28.6%), 10 de *Lactobacillus curvatus* (8.9%), 5 de *Lactobacillus alimentarius* (4.5%) y 25 de *Lactobacillus* spp. (22.3%) no se identificaron (Tabla 3, Figura 5, 6 y 7).

Tabla 3. Caracterización fenotípica de cepas de *Lactobacillus* aisladas de salchichas artesanales elaboradas en la localidad de Huacho – Lima

	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Lactobacillus sp</i>
Numero de aislados	5 (4.5%)	10 (8.9%)	32 (28.6%)	40 (35.7%)	25 (22.3%)
Comportamiento en caldo MRS pH 6.5	Turbidez homogénea, sedimento blanco compacto	Turbidez homogénea, sedimento blanco compacto	Turbidez en neblina, sedimento blanco compacto	Turbidez homogénea, sedimento blanco compacto	Turbidez homogénea o neblina, sedimento blanco compacto
Morfología celular	B	B	B	B o CB	B o CB
Morfología de las colonias	Circular, borde entero, elevada, opacas, cremosa, 0.8-1 mm. de diámetro	Circular, borde entero, elevada, poco opacas, cremosa, 0.8-1.5 mm. de diámetro	Circular, borde entero, elevada, brillante, lechosa, 2-3 mm. de diámetro	Circular, borde entero, elevada, brillante, lechosa, 1.5-2 mm. de diámetro	Circular, borde entero, elevada, brillante, lechosa o cremosa, 1-3 mm. de diámetro
Producción de CO₂	d	-	-	-	-
Hidrólisis de Arginina	-	-	d	-	-
Gluconato de Potasio	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+
Fermentación de:					
Arabinosa	+	-	+	+	+
Celobiosa	d	+	+	+	d
Galactosa	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+
Lactosa	-	d	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	+	d	+
Melobiosa	-	-	+	+	d
Rafinosa	-	-	+	-	+
Ribosa	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	-	d
Sacarosa D	+	-	+	+	+
Xilosa D	-	d	d	d	+

B: Bacilo CB: Cocobacilo + : Positivo - : Negativo d: Reacción débil ND: No determinado

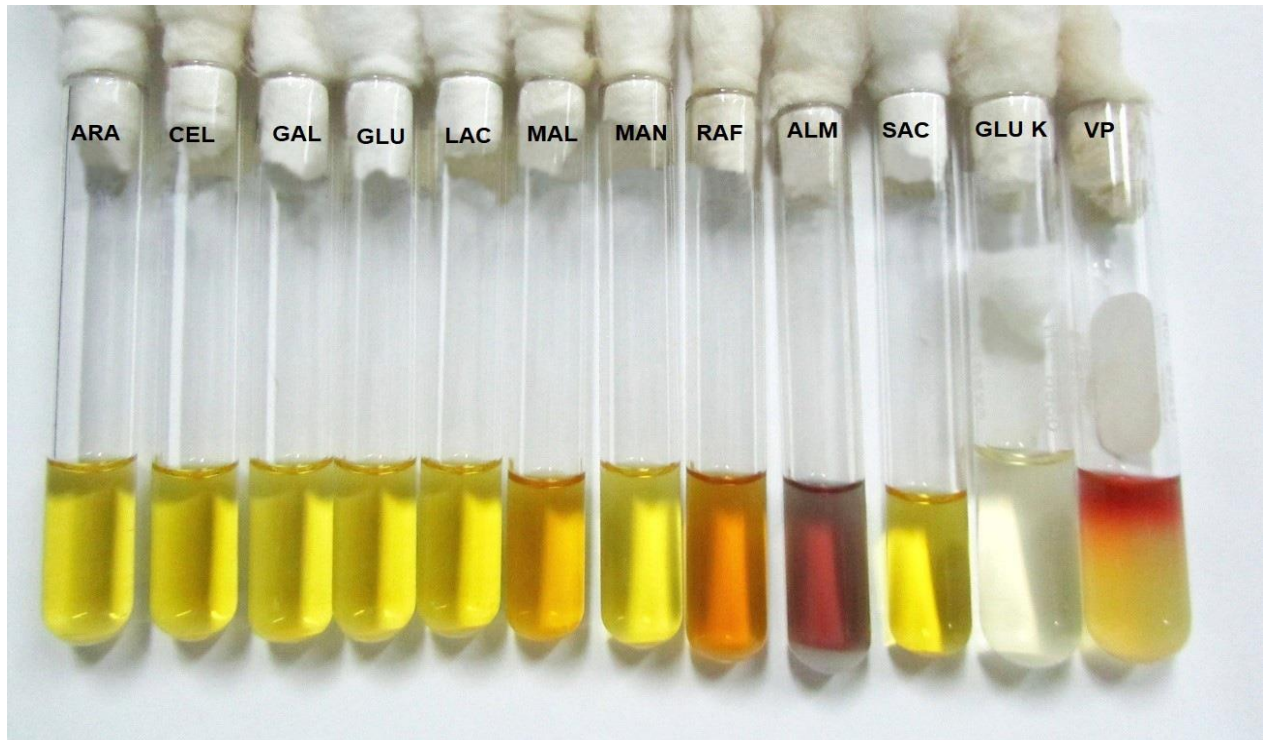


Figura 5. Perfil de fermentación de carbohidratos de *Lactobacillus plantarum* aislados de “salchicha huachana” INDOL (+).

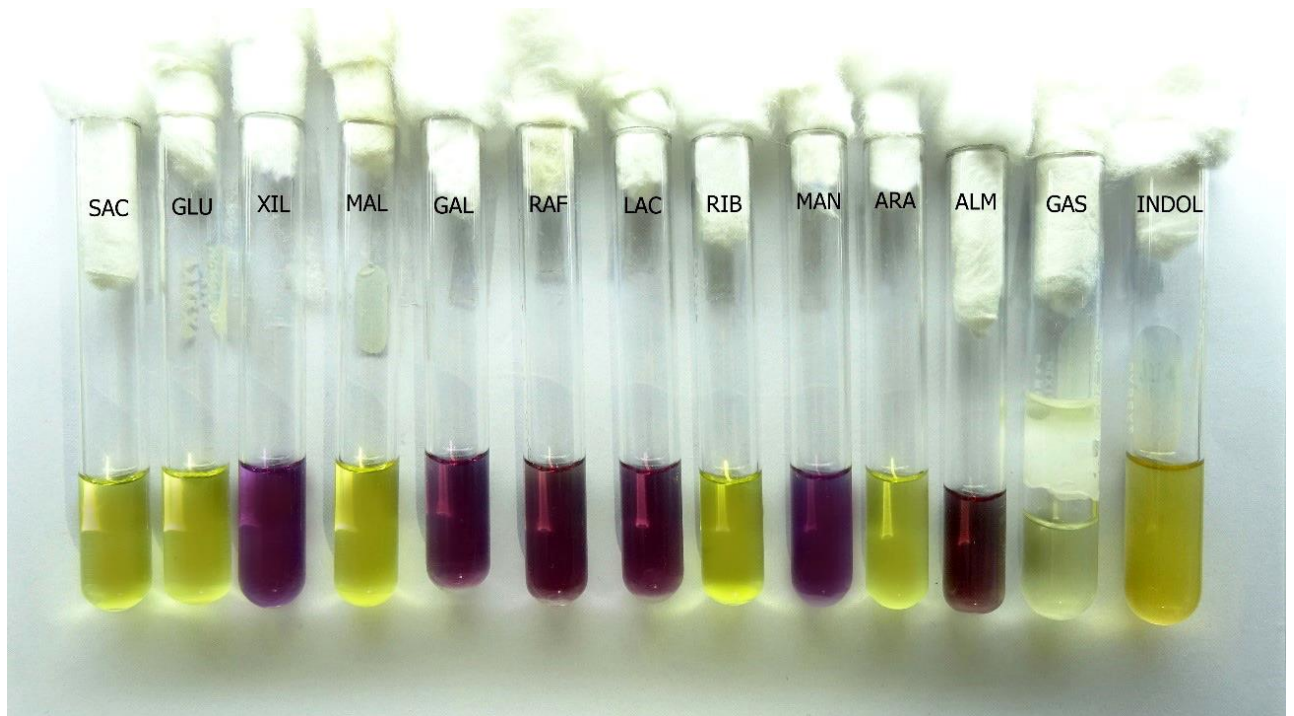


Figura 6. Perfil de fermentación de carbohidratos de *Lactobacillus alimentarius* aislados de “salchicha huachana” INDOL (-).



Figura 7. Producción de sustancias aromáticas (diacetilo) por *Lactobacillus plantarum* en medio Voges Proskauer.

5.3 Detección de bacterias lácticas con capacidad antagonista

De 117 cepas de bacterias lácticas aisladas de *salchichas huachanas*, se seleccionaron solo cuatro cepas de *Lactobacillus plantarum* productoras de sustancias antimicrobianas: *Lactobacillus plantarum* Sh8.C1, Sh8.C2, Sh9.LA1 y Sh9.LA2; y dos cepas sensibles: *Lactobacillus plantarum* Sh2.c1, Sh2.c2 (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* aisladas de *salchichas huachanas* frente a bacterias taxonómicamente afines

Cepas Productoras	Cepas Sensibles		
	Diámetro de los halos de inhibición en milímetros (mm)		
	<i>L. plantarum</i> Sh2.c1	<i>L. plantarum</i> Sh2.c2	<i>L. fermentum</i> ChJ4C
<i>Lactobacillus plantarum</i> Sh8.C1	25	18	20
<i>Lactobacillus plantarum</i> Sh8.C2	25	18	18
<i>Lactobacillus plantarum</i> Sh9.LA1	22	16	20
<i>Lactobacillus plantarum</i> Sh9.LA2	22	16	20
<i>Lactobacillus plantarum</i> E2	20	16	25

Cepa Productora Referencial: *Lactobacillus plantarum* E2

Cepa Indicadora Referencial: *L. fermentum* ChJ4C

5.4 Determinación del espectro antimicrobiano de cepas de *Lactobacillus plantarum* con actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas contaminantes de alimentos

Las cepas *Lactobacillus plantarum* Sh8.C1, Sh8.C2, Sh9.LA1 y Sh9.LA2, productoras de sustancias antimicrobianas aisladas de *salchichas huachanas*, mostraron actividad antagonista contra seis cepas Gram positivas: *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus*, *Listeria ivanovii* subsp *ivanovii* ATCC19119, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* ATCC33090, y dos cepas Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC25922 y *Klebsiella pneumoniae*, todas patógenas contaminantes de alimentos. Las cepas que mostraron mayores tamaños de halos de inhibición (26 mm de diámetro), fueron *Lactobacillus plantarum* Sh8.C1 y Sh8.C2 contra *Bacillus cereus* y las especies de *Listeria*. Como cepas productora y sensible referenciales, se utilizaron *Lactobacillus plantarum* E2 y *Lactobacillus fermentum* Chj4C respectivamente (Tabla 5 y Figura 8).

Tabla 5. Actividad antimicrobiana de cepas seleccionadas de *Lactobacillus* aisladas de *salchichas huachanas* frente a bacterias patógenas contaminantes de alimentos

Cepas Productoras	Cepas Patógenas							
	Diámetro de los halos de inhibición en milímetros(mm)							
	<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Listeria ivanovii</i> subsp <i>ivanovii</i> ATCC19119	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i> ATCC33090
<i>Lactobacillus plantarum</i> Sh8.C1	16	22	20	12	26	22	23	23
<i>Lactobacillus plantarum</i> Sh8.C2	16	22	20	10	26	22	26	28
<i>Lactobacillus plantarum</i> Sh9.LA1	14	18	18	12	24	18	25	23
<i>Lactobacillus plantarum</i> Sh9.LA2	14	18	16	13	20	18	22	18
<i>Lactobacillus plantarum</i> E2	16	18	16	10	20	15	20	16

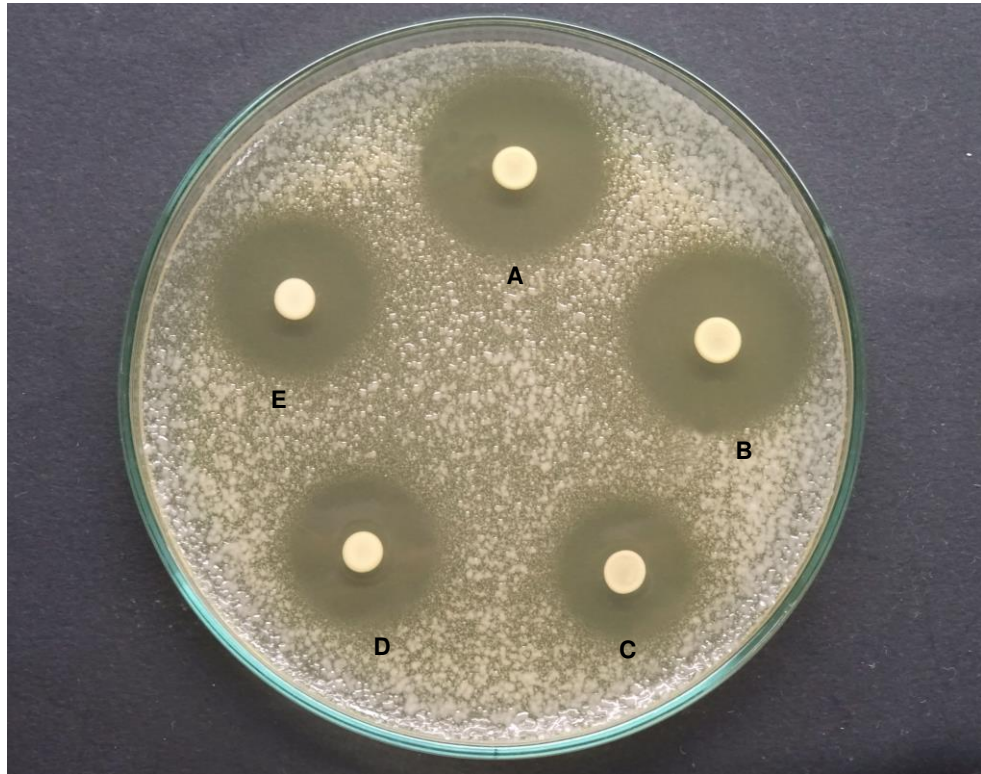


Figura 8. Actividad antimicrobiana de: (A) *Lactobacillus plantarum* Sh8.C1, (B) *Lactobacillus plantarum* Sh8.C2, (C) *Lactobacillus plantarum* Sh9.LA1 y (D) *Lactobacillus plantarum* Sh9.LA2 y (E) *Lactobacillus plantarum* E2 frente a *Bacillus cereus*.

5.5 Selección de cepas de bacterias lácticas con capacidad proteolítica aisladas de *salchichas huachanas*

De un total de 117 cepas de bacterias lácticas aisladas de *salchichas huachanas*, se detectaron 23 cepas de *Lactobacillus* (19,7%) con actividad proteolítica en los medios agar leche, agar MRS suplementado con leche, agar caseinato de calcio y agar MRS suplementado con extracto sarcoplásmico (Tabla 6 y Figura 9).

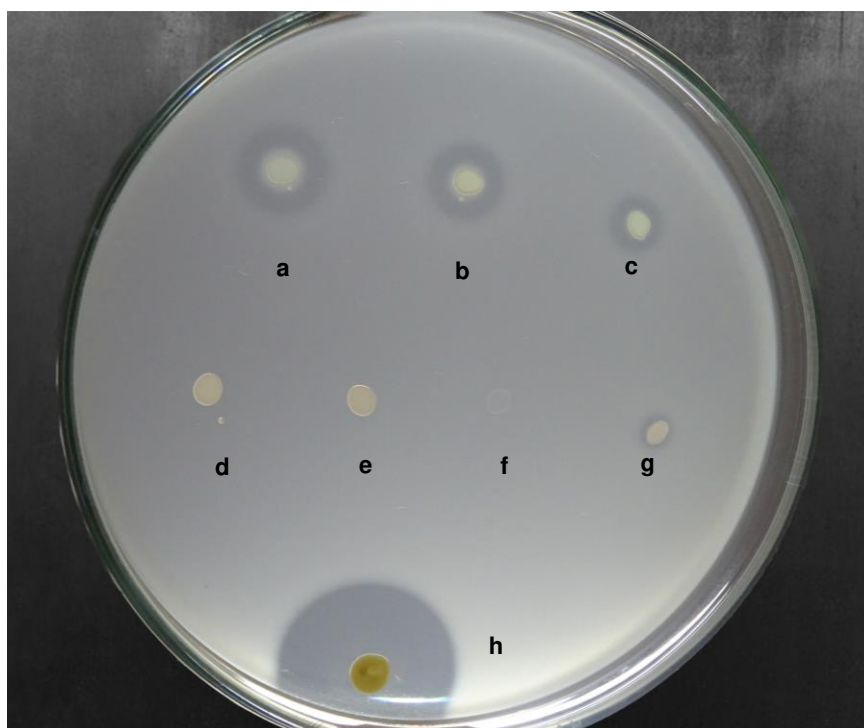


Figura 9. Capacidad de hidrólisis de proteínas de cepas lácticas aisladas de *salchichas huachanas*: *Lactobacillus plantarum* Sh8.C1 (a), Sh8.C2 (b), Sh9.LA1 (c), Sh9.LA2 (g); *Micrococcus* spp (h) (control positivo) e hidrólisis negativa Sh2.c1 (d), Sh2.c2 (e), Sh6.B1 (f) en Agar Leche descremada al 5%.

Tabla 6. Actividad proteolítica de cepas de *Lactobacillus* aisladas de *salchichas huachanas* de elaboración artesanal

Cepas de <i>Lactobacillus</i> (N°cepas)	Actividad Proteolítica		
	Agar Leche	Agar Caseína Hidrolizada	Agar MRS + Extracto Sarcoplásmico
<i>Lactobacillus plantarum</i> Sh1.A, Sh1.D, Sh1.E, Sh1.F, Sh1.B, Sh2.A, Sh2.D (7)	+	+	d
<i>Lactobacillus plantarum</i> Sh1.C (1)	+	+	-
<i>Lactobacillus sakei</i> Sh2.I1 (1)	+	d	d
<i>Lactobacillus plantarum</i> Sh3.e, Sh4.LL, Sh2.c4 (3)	+	+	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> Sh4.d (1)	+	+	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> Sh8.C1, Sh8.C2, Sh9.LA1, Sh9.LA2 (4)	+	+	d
<i>Lactobacillus plantarum</i> Sh8.C3 (1)	+	+	d
<i>Lactobacillus plantarum</i> Sh8.C4, Sh9.LA, Sh9.LA3, Sh9.LA4, Sh2.c3 (5)	+	d	d

+ : Reacción positiva (tamaño de halo de hidrólisis de 12 a 16mm)

d: Reacción débil (tamaño de halo de hidrólisis de 6 a 10 mm) - : Negativo

5.6 Selección de cepas lácticas asociadas a *salchichas huachanas* con capacidad aminogénica

De un total de 23 cepas lácticas con actividad proteolítica, ninguna de las cepas evaluadas mostró actividad aminogénica en el medio base descarboxilasa conteniendo los aminoácidos tirosina, lisina, arginina, ornitina e histidina, a diferencia de la cepa referencial *Klebsiella pneumoniae* (Tabla 7 y figura 11).

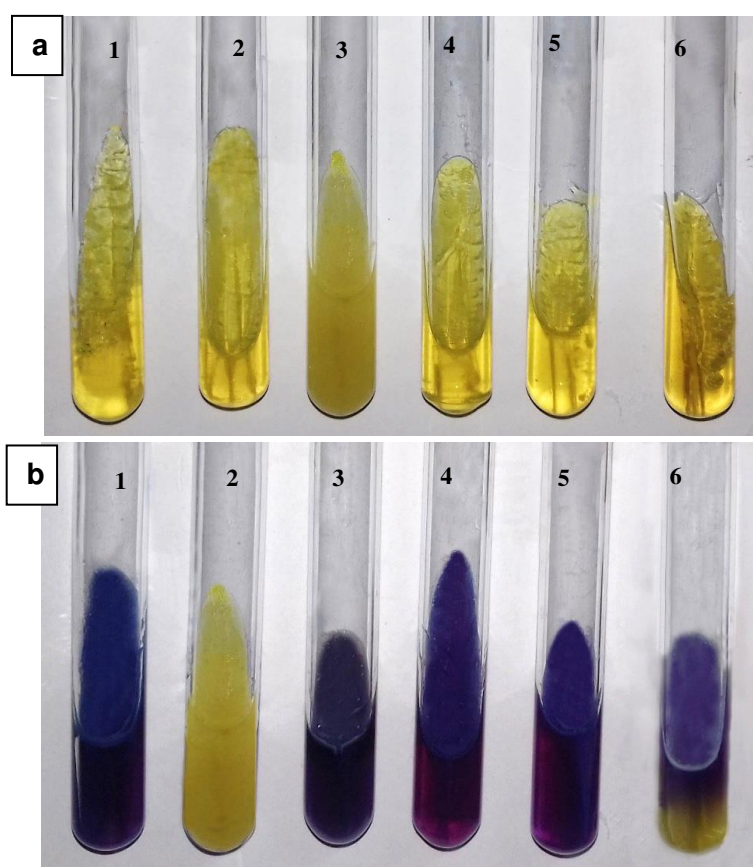


Figura 11.

a. Actividad aminogénica de *Lactobacillus plantarum* Sh9.LA4 Lisina (1), Ornitina (2), Tirosina (3), Arginina (4) e Histidina (5) descarboxilasa negativa (A/A) y medio base descarboxilasa sin aminoácido (6).

b. Actividad aminogénica de cepa referencial: *Klebsiella pneumoniae* Lisina (1), Tirosina (3), Arginina (4) e Histidina (5) descarboxilasa positiva (K/K) y Ornitina (2) y medio base descarboxilasa sin aminoácido negativo (K/A) (6).

Tabla 7. Descarboxilación de aminoácidos por cepas de *Lactobacillus* aisladas de salchichas fermentadas de la localidad de Huacho

Cepas de <i>Lactobacillus</i> (N°cepas)	Tirosina	Lisina	Ornitina	Arginina	Histidina	Control sin aminoácido
<i>Lactobacillus plantarum</i> Sh1.D (1)	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> Sh3.e (1)	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> Sh1.A, Sh1.B, Sh1.C, Sh1.E, Sh1.F, Sh2.A, Sh2.D, Sh4.d, Sh4.LL, Sh8.C1, Sh8.C2, Sh8.C3, Sh8.C4, Sh9.LA, Sh9.LA1, Sh9.LA2, Sh9.LA3, Sh9.LA4, Sh2.c3, Sh2.c4 (20)	-	-	-	-	-	-
<i>Lactobacillus sake</i> Sh2.I1 (1)	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Cepa Patrón) (1)	+	+	+	+	+	+

+ : Positivo - : Negativo ND: No determinado.

6. DISCUSIÓN

Identificación de la biodiversidad de cepas nativas de bacterias lácticas aisladas de salchichas fermentadas de Huacho.

A través de este estudio se logró aislar 117 cepas de bacterias lácticas a partir de *salchichas huachanas* fermentadas de elaboración artesanal, predominando *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus plantarum* seguido de *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus alimentarius* y *Pediococcus sp.* Resultados similares fueron reportados por Kaban & Kaya (2008), Drosinos *et al.* (2005, 2007) y Parente *et al.* (2001) quienes comprobaron que en salchichas fermentadas turcas, griegas e italianas dominaban especies de *Lactobacillus plantarum* seguida de *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus sakei* y ocasionalmente *Lactobacillus rhamnosus* y *Pediococcus pentosaceus*. Asimismo, Garcia-Fontán *et al.* (2007) demostraron que en salchichas españolas denominadas “androlla” prevalecía *Lactobacillus sakei*, y en menor porcentaje *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus alimentarius* y *Lactobacillus plantarum*. En cambio, Benito *et al.*, (2007) encontró un porcentaje significativo de especies de *Pediococcus pentosaceus*, *Lactococcus lactis*, y en menor proporción *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus brevis* y aislados esporádicos de *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus curvatus*, en salchichas fermentadas de Ibéria, coincidiendo parcialmente con nuestros resultados.

Vasilev *et al.* (2015) comprobaron que las bacterias lácticas eran la microbiota dominante en salchichas fermentadas secas tradicionales de Serbia, y en menor cantidad cepas de *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*. Según Rzepowska *et al.* (2017), las especies de bacterias lácticas más frecuentes presentes en los procesos de carnes fermentadas de Polonia son *Lactobacillus sakei*,

Lactobacillus curvatus y *Lactobacillus plantarum*, coincidiendo con los resultados del presente trabajo.

Búsqueda de cepas lácticas con actividad antagonista

Durante la producción de salchichas fermentadas, las bacterias lácticas juegan un rol importante en la formación del sabor, textura y el control de microorganismos contaminantes y patógenos. Algunas cepas de bacterias lácticas como *Lactobacillus sakei* y *Staphylococcus carnosus* han sido ampliamente utilizadas como cultivos iniciadores o starter para la fermentación de salchichas. Sin embargo, debido a la falta de adecuados cultivos iniciadores, la fermentación natural es aún el principal método para la producción de salchichas fermentadas (Gao *et al.*, 2014).

Las bacterias lácticas como cultivos protectores o productoras de sustancias antimicrobianas aisladas de productos cárnicos fermentados, tienen una aplicación potencial para asegurar, mejorar la calidad de los alimentos y tener acceso al mercado. Jones *et al.*, (2008) comprobaron que de 75 bacterias lácticas seleccionadas de productos cárnicos almacenados en frío y al vacío de Nueva Zelanda, solo 6 cepas lácticas identificadas como *Lactobacillus sakei* 27, *Lactobacillus sakei* 44, *Lactobacillus sakei* 63, *Leuconostoc carnosum* 15, *Lactococcus garvieae* 69 y *Lactococcus lactis* 75, incluyendo *Lactobacillus sakei* Lb706 como control, inhibieron una o más cepas sensibles, como *Listeria monocytogenes*, *Brochothrix thermosphacta*, *Campylobacter jejuni* y *Clostridium estertheticum* mediante el método difusión en agar. Según, Dias *et al.*, (2015), la selección de bacterias lácticas de salchichas es ventajosa porque los microorganismos están adaptados al sustrato y poseen los requisitos fisiológicos adecuados para la colonización de las carnes. Las bacterias lácticas incrementan la seguridad del producto al inactivar los patógenos, lo que mejora la estabilidad y la vida

útil del producto. Los autores en mención, identificaron por métodos fenotípicos y moleculares 31 cepas de *Lactobacillus plantarum* y una cepa de *Lactobacillus paracasei* a partir de salchichas de cerdo de Brasil, de los cuales 30 cepas de *Lactobacillus plantarum*, y una de *Lactobacillus paracasei* mostraron actividad inhibitoria, excepto *Lactobacillus plantarum* UFLA SAU1 contra *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli* mediante el método de difusión de disco en agar.

En carnes fermentadas búlgaras “lukanka”, Todorov *et al.*, (2017) también seleccionaron 13 cepas de *Lactobacillus plantarum* (S2, S3, S5, S7, S9, S18, S20, S23, S29, S30, S35, S37 y S39) y 4 cepas de *Lactobacillus brevis* (S11, S12, S13 y S15), de las cuales 6 cepas de *Lactobacillus plantarum* (S7, S9, S20, S30, S37 y S39) y 2 de *Lactobacillus brevis* (S8 y S36) inhibieron el crecimiento de varias cepas de *Listeria monocytogenes* por el método de bicapa en agar. Asimismo, de 141 cepas de bacterias lácticas aisladas de salchichas fermentadas argentinas, Castro *et al.*, (2011) comprobaron que sólo 27 cepas mostraban actividad antimicrobiana contra: *Listeria innocua* ATCC 33090, *Staphylococcus aureus* FBUNT, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 y *Brochothrix* spp. 396 y 405, pero ninguna de las cepas inhibieron bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, porque posiblemente la capa lipopolisacárida de la pared celular, protege a la membrana celular (Stevens *et al.*, 1991). Estos hallazgos concuerdan con De Martinis & Freitas (2003) y Mathieu *et al.*, (1993) y con los resultados obtenidos en el presente estudio.

Se han encontrado en otros tipos de alimentos fermentados, de 300 cepas de bacterias lácticas aisladas de col fermentada china solo 10 cepas productoras de sustancias antimicrobianas por el método de difusión en agar, y se utilizó

Staphylococcus aureus ATCC 63589 y *Escherichia coli* ATCC 25922 como indicadores (Gao *et al.*, 2010).

Capacidad proteolítica y aminogénica de bacterias lácticas aisladas de salchichas fermentadas tradicionales.

Algunas cepas de bacterias lácticas tienen un sistema proteolítico que les permite la hidrólisis de las proteínas presentes en el medio y el uso de los aminoácidos resultantes de la misma para su propio metabolismo. Estos sistemas proteolíticos están compuestos por tres componentes principales: Proteinasas, o enzimas capaces de romper las proteínas en péptidos; un sistema de transporte de estos al interior de la célula; y las peptidasas que se encuentran en el citoplasma, responsables de convertir los péptidos en aminoácidos libres (Mayo *et al.*, 2010). Este proceso proteolítico es muy importante en la industria alimentaria en general y en la industria láctica en particular (Endo & Dicks, 2014). En productos cárnicos como las salchichas, la proteólisis es el resultado de la actividad combinada de enzimas de origen endógeno y microbiano. Por lo tanto, la degradación inicial de la miosina y la actina en péptidos se debe a la catepsina D, mientras que la posterior descomposición de los péptidos en aminoácidos libres es bacteriana (Molly *et al.*, 1997, Verplaetse A., 1994), generándose en consecuencia una gran cantidad de productos finales, como péptidos y aminoácidos libres (Zapelena *et al.*, 1997). Cabe resaltar que las proteasas y peptidasas bacterianas contribuyen significativamente a la descomposición inicial de las proteínas miofibrilares, sarcoplásmicas y a la liberación de pequeños péptidos y aminoácidos (Fernández *et al.*, 2016). Por lo general, los aminoácidos libres son precursores de otros compuestos volátiles que tienen un impacto en el aroma (Montel *et al.*, 1992, Toldrà & Flores, 1998). Una reacción parecida se observa en productos cárnicos fermentados, donde las proteínas de la carne son convertidas en péptidos y

aminoácidos libres cuyo catabolismo tiene repercusiones organolépticas muy importantes. Los péptidos no solo contribuyen al desarrollo de un sabor característico en productos fermentados, sino que también ejercen diferentes bioactividades como antioxidantes, antihipertensivos e hipocolesterolémicos (Liu *et al.*, 2016).

A través de este estudio, se evidenció la capacidad proteolítica de bacterias lácticas nativas aisladas de *salchichas huachanas* en los medios agar leche y agar caseinato de calcio, así como en agar MRS suplementado con extracto sarcoplásmico. El diámetro de la zona clara de hidrolización de la caseína fue de 12 a 16 mm, y de la proteína sarcoplásmica de 6 a 10 mm en promedio, datos similares fueron reportados por otros autores (Essid *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2019). Mientras que Drosinos *et al.* (2007) reportó que, de un total de 300 bacterias lácticas aisladas de salchichas fermentadas tradicionales de Grecia, solo 6, tenían la capacidad de hidrolizar la fracción sarcoplásmica. Cabe destacar que la información de la actividad proteolítica de bacterias lácticas en la literatura es escasa. Papamanoli *et al.* (2003) verificaron que, de siete cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas de salchichas griegas, todas presentaban actividad proteolítica en caseína, pero no en medio Robertson's Cooked Meat (RCM) a base de carne cocida, estos datos coinciden con el comportamiento de las bacterias lácticas aisladas de *salchichas huachanas* especialmente en agar leche y agar caseinato de calcio. Asimismo, Carpiné *et al.* (2010) comprobaron que, de 46 cepas lácticas aisladas de salami artesanal de Brasil, la actividad proteolítica en agar leche fue superior al 84% de las cepas lácticas.

Es importante señalar que las reacciones microbianas y bioquímicas durante la fermentación de salchichas originan la acidificación, la hidrólisis de proteínas y la desecación característica. Estos procesos son responsables también de los sabores típicos de los productos fermentados. No obstante, la maduración de las salchichas

fermentadas puede favorecer las condiciones para la producción de aminas biógenas, como el crecimiento de poblaciones bacterianas con actividad descarboxilasa, así como la actividad proteolítica, que aumenta la concentración de aminoácidos precursores disponibles para ser descarboxilados (Bover-Cid *et al.*, 1999). Por lo general, las bacterias lácticas que fermentan los alimentos no son toxigénicas ni patógenas, sin embargo, algunas especies de los géneros de *Enterococcus* y *Leuconostoc* pueden producir aminas biógenas como la tiramina y ciertas cepas de *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus farciminis*, entre otras producen también la tiramina, considerada una amina biógena cuantitativamente importante (Suzzi & Gardini, 2003).

La actividad de aminoácido descarboxilasa de bacterias lácticas aisladas de embutidos fermentados tradicionales europeos, son consistentes con los resultados reportados para otras bacterias lácticas de diferentes tipos de embutidos (Montel *et al.*, 1999, De las Rivas *et al.*, 2008). Se ha demostrado que las cepas de *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus curvatus* aislados de productos cárnicos fermentados producen tiramina y, en algunos casos producen también feniletilamina, triptamina, putrescina y cadaverina (Bover-Cid *et al.*, 1999). En contraste, las cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus sakei* se describen con mayor frecuencia como no aminogénicas (Bover-Cid *et al.*, 2001; Silla-Santos, 1998), estos resultados coinciden con los obtenidos en este estudio; así mismo Bover-Cid *et al.*, (2001) demostraron que las cepas de *Lactobacillus curvatus* y *Enterococcus* spp aisladas de salchichas fermentadas españolas producían tiramina y en menor cantidad feniletilamina, triptamina y/o diaminas como la putrescina y cadaverina, datos que difieren con los reportados en esta investigación.

7. CONCLUSIONES

A través de este estudio, se pudo comprobar la existencia de una diversidad de cepas nativas de bacterias lácticas con actividad antimicrobiana en todas las muestras de salchichas de elaboración artesanal, predominando *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus plantarum*, lo que indica su activa participación en el proceso de fermentación de las *salchichas huachanas*.

Asimismo, se evidenció un buen porcentaje (20%) de cepas de *Lactobacillus plantarum* con elevada actividad proteolítica y nula actividad aminogénica.

Las cepas autóctonas de *Lactobacillus plantarum* Sh8.C1, Sh8.C2, Sh9.LA1 y Sh9.LA2 seleccionadas con capacidad antimicrobiana, proteolítica y nula actividad aminogénica, pueden ser utilizadas como cultivos bioprotectores y seguros desde un punto de vista sanitario.

8. RECOMENDACIONES

- La identificación fenotípica de las cepas seleccionadas de *Lactobacillus plantarum* deben ser confirmados por métodos moleculares.
- Continuar con la investigación de nuevas cepas lácticas nativas con propiedades antimicrobianas por métodos cuantitativos y determinar la naturaleza química de las sustancias inhibitorias.
- Para confirmar la ausencia de aminas biógenas producidas por bacterias lácticas en salchichas de elaboración artesanal, sería conveniente complementar estos estudios por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ARRAZOLA G., ALVIS A. Y PEREZ, A. Bacterias ácido lácticas como aditivo protector de microorganismos no deseables en carnes curadas. *Vitae*. 2016, vol.23, supl.1, p. 165-169.

BAKA, A. M., PAPAVERGOU, E. J., PRAGALAKI, T., BLOUKAS, J. G., AND KOTZEKIDOU, P. Effect of selected autochthonous starter cultures on processing and quality characteristics of Greek fermented sausages. *LWT Food Sci. Technol.* 2011, vol. 44, p. 54–61. doi: 10.1016/j.lwt.2010.05.019

BENITO, M. J., MARTÍN, A., ARANDA, E., PÉREZ-NEVADO, F., RUÍZ-MOYANO, S. AND CÓRDOBA, M.G. Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented salchichón and chorizo sausages. *Journal of Food Science*. 2007, vol. 72, nº 6, p. 193-201.

BOTTAZI, V. An introduction to rod-shaped lactic acid bacteria. *Biochimie*. 1988, vol. 70, p. 303-315.

BOVER-CID, S. AND HOLZAPFEL, W.H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, vol. 53, p. 33– 41.

BOVER-CID, S. , HUGAS, M. , IZQUIERDO- PULIDO, M. AND VIDAL - CAROU, M. C. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 66, p. 185- 189.

BOVER-CID S., LATORRE-MORATALLA M., GARRIGA M. Y VIDAL- CAROU M.

Aminas biógenas en productos cárnicos: Un repaso a su origen, importancia y control. *Eurocarne*. 2005, vol.141, p. 1-6.

BUCKENHUSKES H. J. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993, vol. 12, p. 253-272.

CAO, C.-C., FENG, M.-Q., SUN, J., XU, X.-L. AND ZHOU, G.-H. Screening of lactic acid bacteria with high protease activity from fermented sausages and antioxidant activity assesment of its fermented sausages. *CYTA- Journal of Food*. 2019, vol. 17, nº 1, p. 347-354.

CAPLICE, E. Y FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, vol. 50, p. 131–149.

CARPINE, D., ANDREOTTI, J.L., DALLA, H.S., CHACÓN, D., NASCIMENTO, N. & DALLA, O.R. Atividade proteolítica e lipolítica de bactérias lácticas isoladas de salames artesanais Proteolytic and lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from artisanal sausages. *Ambiência Guarapuava (PR)*. 2010, vol. 6 nº1 p. 125-132.

CASAUS LARA, María del Pilar. “Aislamiento e identificación de bacterias lácticas de origen cárnico productoras de bacteriocinas. Caracterización bioquímica y genética de la enterocina P de *Enterococcus faecium* P13 y de la enterocina B de *Enterococcus faecium*

T136". Asesores: Luis Cintas, Pablo Hernández e Ingolf Nes. Tesis doctoral. Universidad Computense de Madrid, España, 1998.

CASTRO, M.P., PALAVECINO, N.Z., HERMAN, C., GARRO, O.A., CAMPOS, C.A. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science*. 2011, vol. 87, nº 4, p. 321-329. doi: 10.1016/j.meatsci.2010.11.006. Epub 2010 Nov 13.

CHRISTENSEN, J. E., DUDLEY, E. G., PEDERSON, J. A. Y STEELE, J. L. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1999, vol.76, p. 217-246.

CIUCIU SIMION, A. M., VIZIREANU, C., ALEXE, P., FRANCO, I., AND CARBALLO, J. Effect of the use of selected starter cultures on some quality, safety and sensorial properties of Dacia sausage, a traditional Romanian dry-sausage variety. *Food Control*. 2014, vol. 35, p. 123–131. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.06.047

CINTAS, L. M., P. CASAUS Y P. E. HERNÁNDEZ. Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas (II). Bacteriocinas. *Alimentación, Equipos y Tecnología (Leche y productos lácteos)*. 2000, Septiembre, pp. 83-119.

COPPOLA, R., IORIZZO, M., SAOTTA, R., SORRENTINO, E. AND GRAZIA, L. Characterization of micrococci and staphylococci isolated from soppressata molisana, a Southern Italy fermented sausage. *Food Microbiology*. 1997, vol.14, p. 47–53.

CVRTILA Ž., SAVIĆ V., KOZAČINSKI L., NJARI B., ZDOLEC N. AND FILIPOVIĆ I.

Identification of lactic acid bacteria isolated from dry fermented sausages. *Veterinarski Arhiv*. 2012, vol.82, n°3, p. 265-272.

DA COSTA, R. J., VOLOSKI, F. L. S., MONDADORI, R. G., DUVAL, E. H. AND FIORENTINI, Â. M. Preservation of Meat Products with Bacteriocins Produced by

Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. *Journal of Food Quality*. 2019, vol. 19, p. 1-12.

<https://doi.org/10.1155/2019/4726510>

DE LAS RIVAS, B., RUIZ-CAPILLAS, C., CARRASCOSA, A.V, CURIEL, J.A.,

JIMÉNEZ-COLMENERO, F., MUÑOZ, R. Biogenic amine production by Gram-positive bacteria isolated from Spanish dry-cured “chorizo” sausage treated with high pressure

and kept in chilled storage. *Meat Science*. 2008, vol.80, p. 272-277.

<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.12.001>

DE MARTINIS, E. C. P. AND FREITAS, F. Z. Screening of lactic acid bacteria from

Brazilian meats for bacteriocin formation. *Food Control*. 2003, vol. 14, p. 197–200.

DIAS, F.S., SANTOS, M.R.R.M. AND SCHWAN, R.F. Enumeration, identification and

safety properties of lactic acid bacteria isolated from pork sausage. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2015, vol. 67, N° 3, p. 918-926.

DIAS, I., LARANJO, M., POTES, ME., AGULHEIRO-SANTOS, AC; RICARDO-

RODRIGUES, S., FIALHO, AR; VÉSTIA, J., FRAQUEZA, MJ; OLIVEIRA, M., ELIAS,

M. Autochthonous Starter Cultures Are Able to Reduce Biogenic Amines in a Traditional Portuguese Smoked Fermented Sausage. *Microorganisms* 2020, 8, 686.

DROSINOS, E. H., MATARAGAS, M., XIRAPHI, N., MOSCHONAS, G., GAITIS, F., METAXOPOULOS, J. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science*. 2005, vol. 69, issue 2, p. 307-317.

DROSINOS E., PARAMITHIOTIS S., KOLOVOS G., TSIKOURAS I. AND METAXOPOULOS I. Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiology*. 2007, vol. 24, p. 260-270.

DOEVEN, M. K., KOK, J. Y POOLMAN, B. Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Molecular Microbiology*. 2005, vol.57, n°3, p. 640-649.

ELIAS, M., POTES, M. E., ROSEIRO, L. C., SANTOS, C., GOMES, A., AND AGULHEIROSANTOS, A. C. The effect of starter cultures on the portuguese traditional sausage “Paio do Alentejo” in terms of its sensory and textural characteristics and polycyclic aromatic hydrocarbons profile. *J. Food Res*. 2014, vol. 3, p. 45–56.

ENDO, A., Y DICKS, L. M. Physiology of the LAB. *In: Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*. 1st edition. Holzapfel, W. H., & Wood, B. J (Eds.). John Wiley & Sons, New Jersey, USA, 2014.

ESSID, I., MEDINI, M. AND HASSOUNA, M. Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat Science*. 2009, vol. 81, p. 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.07.020>

FAO/WHO. Risk management and food safety. Report of a joint FAO/WHO consultation. *FAO Food and Nutrition*. January 1997, Paper N° 65, Rome, Italy, 27-31.

FERNÁNDEZ, M., MARTÍN, A., BENITO, M.J., CASQUETE, R., RECIO, I., & CÓRDOBA, M. D. G. Influence of starter cultures on the generation of antioxidant nitrogen compounds in Iberian dry-fermented sausages. *International Journal of Food Science & Technology*. 2016, vol. 51, p. 435–443.

FONTANA, C.A., FADDA, S., COCCONCELLI, P.S., VIGNOLO, G. Lactic Acid Bacteria. In: *Lactic Acid Bacteria in Meat Fermentations*. Ed. 4th. Boca Raton: CRC Press, 2011. 247-264.

FRAQUEZA, M. J., PATARATA, L., AND LAUKOVÁ, A. Protective starter cultures and bacteriocins in fermented meats. In: *Fermented Meat Products: Health Aspects*. Ed. N. Zdolec. New York, NY: CRC Press, 2016. 228–269.

GÁLVEZ, A., ABRIOUEL, H., LÓPEZ, R. L. Y BEN OMAR, N. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, vol.120, p. 51–70.

GAO, Y. LI, D. AND LIU, X. Bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* C2 as starter culture in fermented sausages. *Food Control*. 2014, vol. 35, p. 1-6.

GAO, Y. JIA, S., GAO, Q. AND TAN, Z. A novel bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus sakei* C2 isolated from traditional Chinese fermented cabbage. *Food Control*. 2010, vol. 21, p. 76-81.

GARCÍA-FONTÁN, M.C., LORENZO, J.M., PARADA, A., FRANCO, I. & CARBALLO, J. Microbial characteristics of “androlla”, a Spanish traditional pork sausage. *Food Microbiology*. 2007, vol. 24, p. 52 – 58.

GEISEN, R., LÜCKE, F.K. Y KRÖCKEL, L. Starter and protective cultures for meat and meat products. *Fleischwirtschaft*. 1992, vol. 72, p. 894-898.

HAMMES, W.P. AND HERTEL, C. Selection and improvement of lactic acid bacteria used in meat and sausage fermentation. *Lait*. 1996, vol. 76, p. 159-168.

HAMMES, W.P., BANTLEON, A. Y MIN, S. Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Letters*. 1990, vol. 87, p. 165-174.

HOLZAPFEL, W. H., SCHILLINGER, U., GEISEN, R., AND LÜCKE, F.-K. Starter and protective cultures. *In: Food Preservatives*. Eds N. J. Russell and G. W. Gould. Boston, MA: Springer, 2003. 291–320. doi: 10.1007/978-0-387-30042-9_14

HOLZAPFEL W., GEISEN R., AND SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology*. 1995, vol. 24, issue 3, p. 343-362.

JAYNE-WILLIAMS, D. J. Miniaturized methods for the characterization of bacterial isolates. *Journal Application Bacteriology*. 1975, vol. 38, p. 305-309.

JAYNE-WILLIAMS, D. J. The application of miniaturized methods for the characterization of various organisms isolated from animal gut. *Journal Application Bacteriology*. 1976, vol. 40, n°3, p. 189-200.

JONES, R.J., HUSSEIN, H.M., ZAGOREC, M., BRIGHTWELL, G. AND TAGG, J.R. Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiology*. 2008, vol. 25, p. 228-234.

KABAN, G. AND KAYA, M. Identification of lactic acid bacteria and Gram-positive catalase-positive cocci isolated from naturally fermented sausage (sucuk). *Journal of Food Science*. 2008, vol. 73, n° 8, p. M385-M388. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00906.x.

KANDLER, O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1983, vol. 49, issue 3, p. 209-224.

KANDLER, O. AND WEISS, N. *Genus Lactobacillus*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol. 2. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME & Holt JG (Eds.), 9th ed., Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1986. pp. 1063-1065.

KATO, T., MATSUDA, T., TAHARA, T., SUJIMOTO, M. AND NAKAMURA, R. Effects of meat conditioning and lactic fermentation on pork muscle proteins degradation. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 1994, vol. 58, n°2, p. 408-410.

KÉKESSY, D. A. AND PIGUET, J. D. New Method for Detecting Bacteriocin Production. *Applied Microbiology*. 1970, vol. 20, n°2, p. 282-283.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993, vol. 12, issue 1-3, p. 39–85.

KONEMAN, E., ALLEN, S., DOWELL, V. AND SOMMERS, H. *Diagnóstico microbiológico*. Buenos Aires, Argentina: Ed. Medica Panamericana, 1987. p. 176-177. ISBN 950-06-1222-4.

KOK, J. Y DE VOS, W. M. *Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. Cap. 4: The proteolytic system of lactic acid bacteria*. Editado por: Gasson, M., De Vos, W. Blackie Academic & Professional. Glasgow, Reino Unido, 1994. pp. 169-210.

KROCKEL, L. 1995. *Bacterial fermentation of meats*. En *Fermented Meat Cook*, P. E. (eds). Blackie Academic & Professional. Londres, Reino Unido.

LAW, S. V., ABU BAKAR, F., MAT HASHIM, D. AND ABDUL HAMID, A. Popular fermented foods and beverages in Southeast Asia. *International Food Research Journal*. 2011, vol. 18, p. 475-484.

LIU, R., XING, L., FU, Q., ZHOU, G. H. AND ZHANG, W. G. A Review of Antioxidant Peptides Derived from Meat Muscle and By-Products. *Antioxidants (Basel)*. 2016, vol. 5, n°3, p. 1-15.

LÓPEZ SEIJAS, JACOBO. “Biodiversidad de bacterias ácido lácticas asociada a la variedad Albariño (*Vitis vinifera* L.) cultivada en Val do Salnés. Estudio de sus aplicaciones”. Asesor: Carmen Sieiro. Tesis de doctorado. Universidad de Vigo, Galicia, España, 2017.

LUCIO COSTA, O. “Acidificación Biológica de Vinos de pH elevado mediante la utilización de bacterias lácticas”. Asesores: Sergi Ferrer Soler e Isabel Pardo Cubillos. Tesis Doctorado en Biotecnología. Universitat de València, España, 2014.

LÜCKE, F. K. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*. 2000, vol 56, issue 2, p. 105-115.

LUXANANIL, P., PROMCHAI, R., WANASEN, S., KAMDEE, S., THEPKASIKUL, P., PLENGVIDHYA, V., VISESSANGUAN, W., VALYASEVI, R. Monitoring *Lactobacillus plantarum* BCC 9546 starter culture during fermentation of Nham, a traditional Thai pork sausage. *Int. J. Food Microbiol.* 2009, vol. 129, p. 312–315. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.011

MAURIELLO, G., CASABURI, A. AND VILLANI, F. Proteolytic activity of *Staphylococcus xylosum* strains on pork myofibrillar and sarcoplasmic proteins and use of selected strains in the production of “Naples type” salami. *Journal of Applied Microbiology*. 2002, vol. 92, p. 482-490.

MARTÍN JUÁREZ, B. “Estudio de las comunidades microbianas de embutidos fermentados ligeramente acidificados mediante técnicas moleculares. Estandarización, seguridad y mejora tecnológica”. Asesores: Marta Hugas y Teresa Aymerich. Tesis Doctorado en Ciencias, Universitat de Girona, Centre de Tecnologia de la Carn (IRTA), 2005.

MATHIEU, F., SUWANDHI, S., REKHIF, N., MILLIÈRE, J. B., & LEFEVRE, G. Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* FR 52. *The Journal of Applied Bacteriology*. 1993, vol. 74, p. 372–379.

MAYO, B., ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, T., FERNÁNDEZ, M., KOWALCZYK, M., ÁLVAREZ-MARTÍN, P., Y BARDOWSKI, J. Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*. 2010, p. 3-33.

MOLINA, I. AND TOLDRÁ, F. Detection of Proteolytic Activity in Microorganisms Isolated from Dry-Cured Ham. *Journal of Food Science*. 1992, vol. 57 , n°6, p. 1308-1310.

MOLLY K., DEMEYER D., JOHANSSON G., RAEMAEKERS M., GHISTELINCK M., GREENEN I. The importance of meat enzymes in ripening and flavour generation in dry fermented sausages. First results of an European project. *Food Chemistry*. 1997, vol. 59, p. 539–545.

MONTANARI, CH., GATTO V., TORRIANI S., BARBIERI F., BARGOSSO E., LANCIOTTI R., GRAZIA L., MAGNANI R., TABANELLI G., GARDINI F. Effects of the diameter on physico-chemical, microbiological and volatile profile in dry fermented sausages produced with two different starter cultures. *Food Bioscience*. 2018, vol. 22, p. 9-18.

MONTEL M. C., TALON R., CANTONNET R., BERDAGUÉ J. L. *Activités métaboliques des bactéries lactiques des produits carnés. in Les bactéries lactiques.* eds Novel G., Le Querler J.-F. (Ardie Normandie, Caen, France), 1992. pp 67–76.

MONTEL, M. C., MASSON, F. AND TALON, R. Bacterial role in Flavour development. *Meat Science*. 1998, vol. 49, Suppl.1, S111- S123.

MONTEL, M.C., MASSON, F. AND TALÒN, R. Comparison of biogenic amine content in traditional and industrial French dry sausages. *Sciences des aliments*. 1999, vol. 19, p. 247-254.

MUÑOZ R., MORENO-ARRIBAS. M. V., Y DE LAS RIVAS. B. *Lactic acid bacteria*, In: *Molecular Wine Microbiology*. (Eds.). Elsevier, Carrascosa, A. V., Muñoz, R., and González, R. 1st edition. Amsterdam, Netherlands, 2011.

PABLO, N. L. *Elaboración de Salchicha Huachana*. Universidad Nacional José Faustino Sanchez Carrión, 2010. p. 1-41. <https://es.scribd.com/doc/117393721/Salchicha-Huachana>

PAPAMANOLI E., TZANETAKIS N., LITOPOULOU-TZANETAKI E., KOTZEKIDOU P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*. 2003, vol. 65, issue 2, p. 859-867.

PARENTE, E., GRIEGO, S., AND CRUDELE, M.A. Phenotypic diversity of lactic acid bacteria isolated from fermented sausages produced in Basilicata (Southern Italy). *Journal of Applied Microbiology*. 2001, vol. 90, p. 943-952.

PARRA HUERTAS, R. A. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2010, vol. 8, N°1, p. 93-105.

PRICE, J.F. Y SCHWEIGERT, B.S. *Ciencia de la carne y de los productos cárnicos*. Ed. Acribia, S.A. 2ª edición. Zaragoza, España. 1994. p. 200-416.

RZEPOWSKA, A., ZIELIŃSKA, D., OŁDAK, A. AND KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, D. Safety assessment and antimicrobial properties of the lactic acid bacteria strains isolated from polish raw fermented meat products. *International Journal of Food Properties*. 2017, vol. 20, N°. 11, p. 2736–2747.

REYES, M., GÓMEZ-SÁNCHEZ, I., ESPINOZA, C., BRAVO, F. y GANOZA, I. *Tablas Peruanas de Composición de Alimentos*. 8^{va} ed. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2009. p. 64. ISBN 978-9972-857-73-7.

RUIZ-CAPILLAS, C., JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Biogenic amines in meat and meat products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2004, vol. 44, p. 489–599.

SAMELIS J, METAXOPOULOS J, VLASSI M, PAPA A. Stability and safety of traditional Greek salami: a microbiological ecology study. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, vol. 44, issue 1-2, p. 69–82.

SAWITZKI, M.C., FIORENTINI, A., BERTOL, T. AND SANT-ANNA, E. *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented sausages and their technological properties for application as starter cultures. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2009, vol. 29, n° 2, p. 340-345.

SCHILLINGER U, LÜCKE FK. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiology*. 1987, vol. 4, issue 3, p. 199-208.

SHARPE, M. E. Taxonomy of the lactobacilli. *Dairy Science Abstracts*. 1962, vol. 24, p. 109-118.

SILLA-SANTOS, H. Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, vol. 39, n° 3, p. 227-230

SMIT, G., SMIT, B.A. AND ENGELS, W.J. M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, vol. 29, n°3, p. 591–610.

SMIT, A. Y., DU TOIT, W. J., Y DU TOIT, M. Biogenic amines in wine: Understanding the headache. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2008, vol. 29, n° 2, p. 109–127.

STEVENS, K. A., SHELDON, B. W., KLAPES, N. A., & KLAENHAMMER, T. R. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Applied and Environment Microbiology*. 1991, vol. 57, p. 3613–3615.

STILES M. E. AND HASTINGS J. W. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends in Food Science & Technology*. 1991, vol. 2, p. 247-251.

SUMBY, K. M., GRBIN, P. R., Y JIRANEK, V. Implications of new research and technologies for malolactic fermentation in wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014, vol. 98, p. 8111–8132.

SUZZI, G. AND GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, vol. 88, n° 1, p. 41-54.

TODOROV, S.D., STOJANOVSKI, S., ILIEV, I., MONCHEVA, P., NERO, L.A., IVANOVA, I.V. Technology and safety assessment for lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian fermented meat product "lukanka". *Brazilian Journal of Microbiology*. 2017, vol. 48, nº 3, p. 576-586. doi: 10.1016/j.bjm.2017.02.005. Epub 2017 May 11.

TOLDRÁ F., FLORES M. The role of muscle proteases and lipases in flavour development during the processing of dry-cured ham. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1998, vol. 38, p. 331–352.

TRIKI, M. "Aminas biógenas en productos cárnicos más saludables en base a su contenido lipídico". Asesores: Claudia Ruiz-Capillas, Ana María Herrero y Francisco Jiménez. Tesis para optar al Grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Madrid, 2013.

VASILEV, D.; ALEKSIC, B.; TARBUK, A.; DIMITRIJEVIC, M.; KARABASIL, N.; COBANOVIC, N.; VASILJEVIC, N. Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Serbian Traditional Fermented Sausages Sremski and Lemeski Kulen. *Procedia Food Science*. 2015, vol. 5, p. 300–303.

VERPLAETSE, A. *Influence of raw meat properties and processing technology on aroma quality of raw fermented meat products*. Proceedings of the 40th International Congress on Meat and Technology. The Hague, The Netherlands, 1994. pp. 45–65.

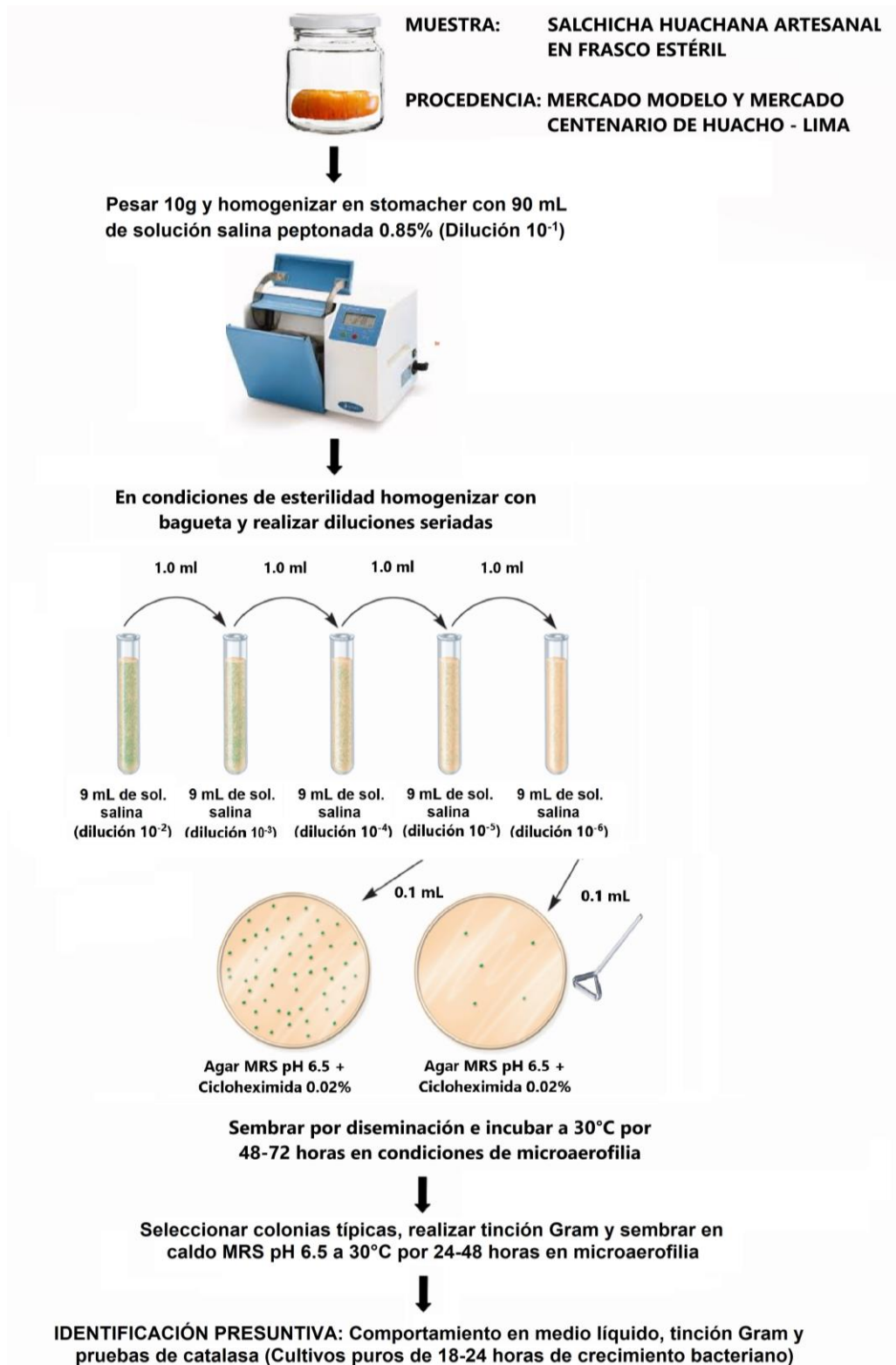
WANG, X. H., REN, H. Y., LIU, D. Y., ZHU, W. Y., AND WANG, W. Effects of inoculating *Lactobacillus sakei* starter cultures on the microbiological quality and nitrite depletion of Chinese fermented sausages. *Food Control*. 2013, vol. 32, p. 591–596. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.01.050

ZAPELENA M. J., ZALACAIN I., DE LA PEÑA M. P., ASTIASSARÁN I., BELLO J. Addition of a neutral proteinase from *Bacillus subtilis* (neutrased) together with a starter to a dry fermented sausage elaboration and its effects on the amino acid profiles and the flavour development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997, vol. 45, p. 472–475.

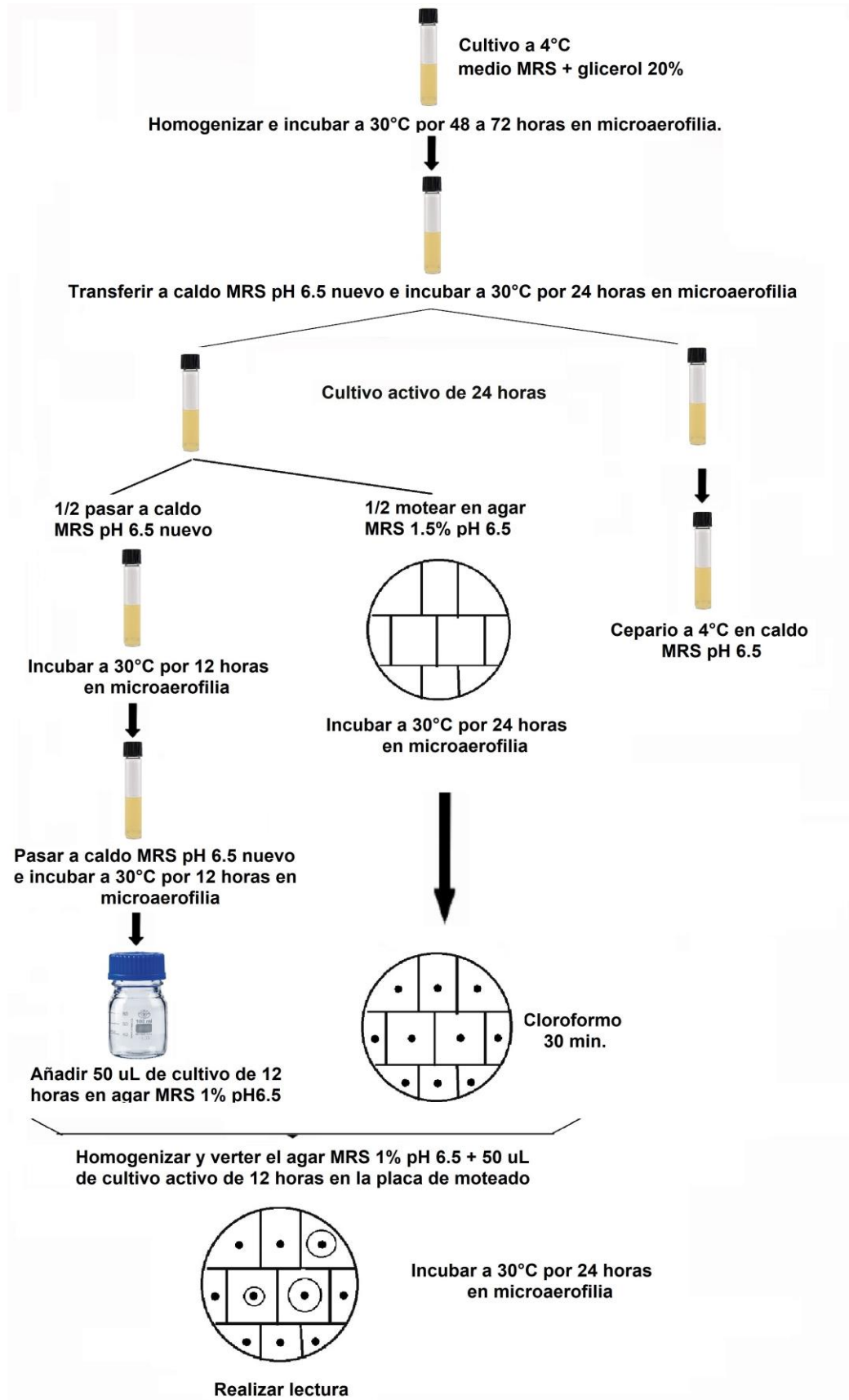
10. ANEXOS Y GLOSARIO

10.1. ANEXOS

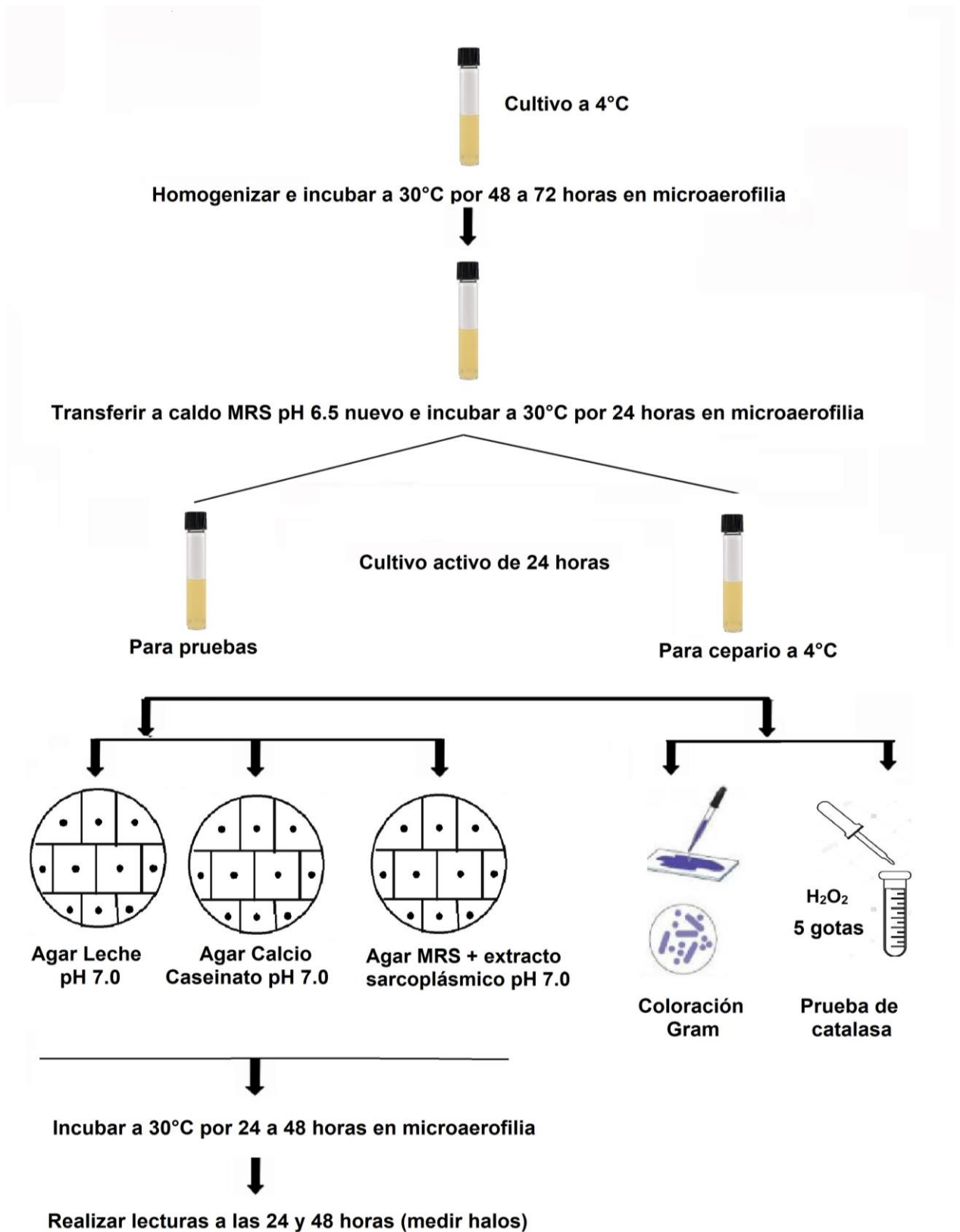
PROTOCOLO N°1. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS DE SALCHICHAS HUACHANAS ARTESANALES



PROTOCOLO N°2. ANTAGONISMO DE BACTERIAS LÁCTICAS. MÉTODO BICAPA EN AGAR



PROCOLO N°3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE BACTERIAS LÁCTICAS EN MEDIOS SINTÉTICOS



PROTOCOLO N°4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE BACTERIAS LÁCTICAS EN EXTRACTO SARCOPLÁSMICO



Carne magra de cerdo



Homogenizar 3 min. en stomacher 20g de carne magra de cerdo con 200 mL de Buffer fosfato 0.03N pH 7.0



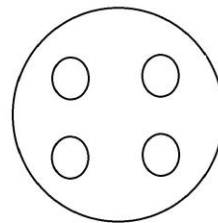
Centrifugar a 10 000g x 20 minutos a 4°C



Recolectar sobrenadante (fracción sarcoplásmica) en tubos estériles y esterilizar por filtración (membrana Millipore 0.22 µm)



Plaques y realizar pocillos.
Emplear un medio MRS (80%) y extracto sarcoplásmico (20%)



Inocular 70 mL de cultivo activo de 24 horas e incubar a 30°C por 48 horas



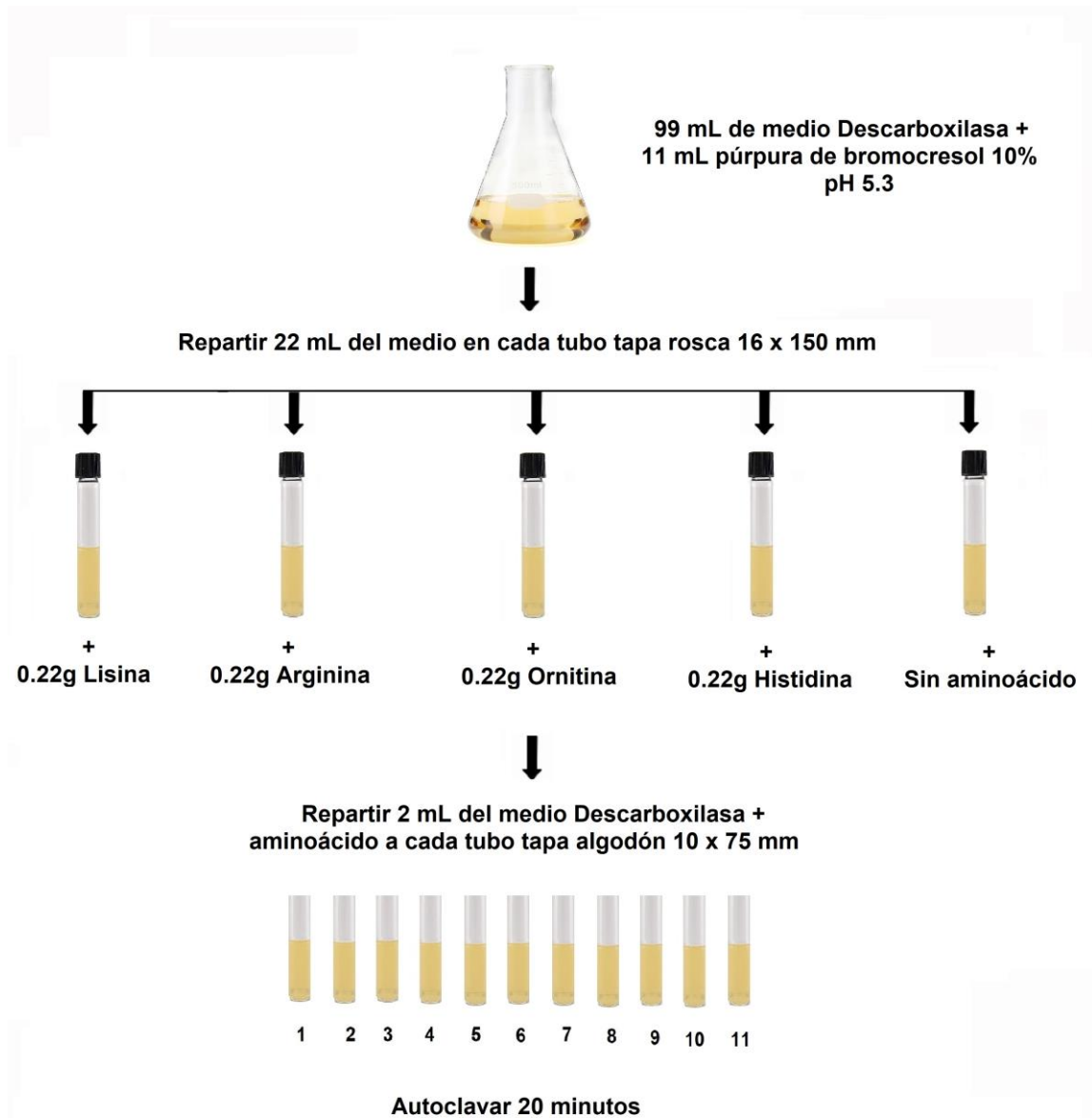
Teñir con Azul brillante de Coomassie durante 5 minutos



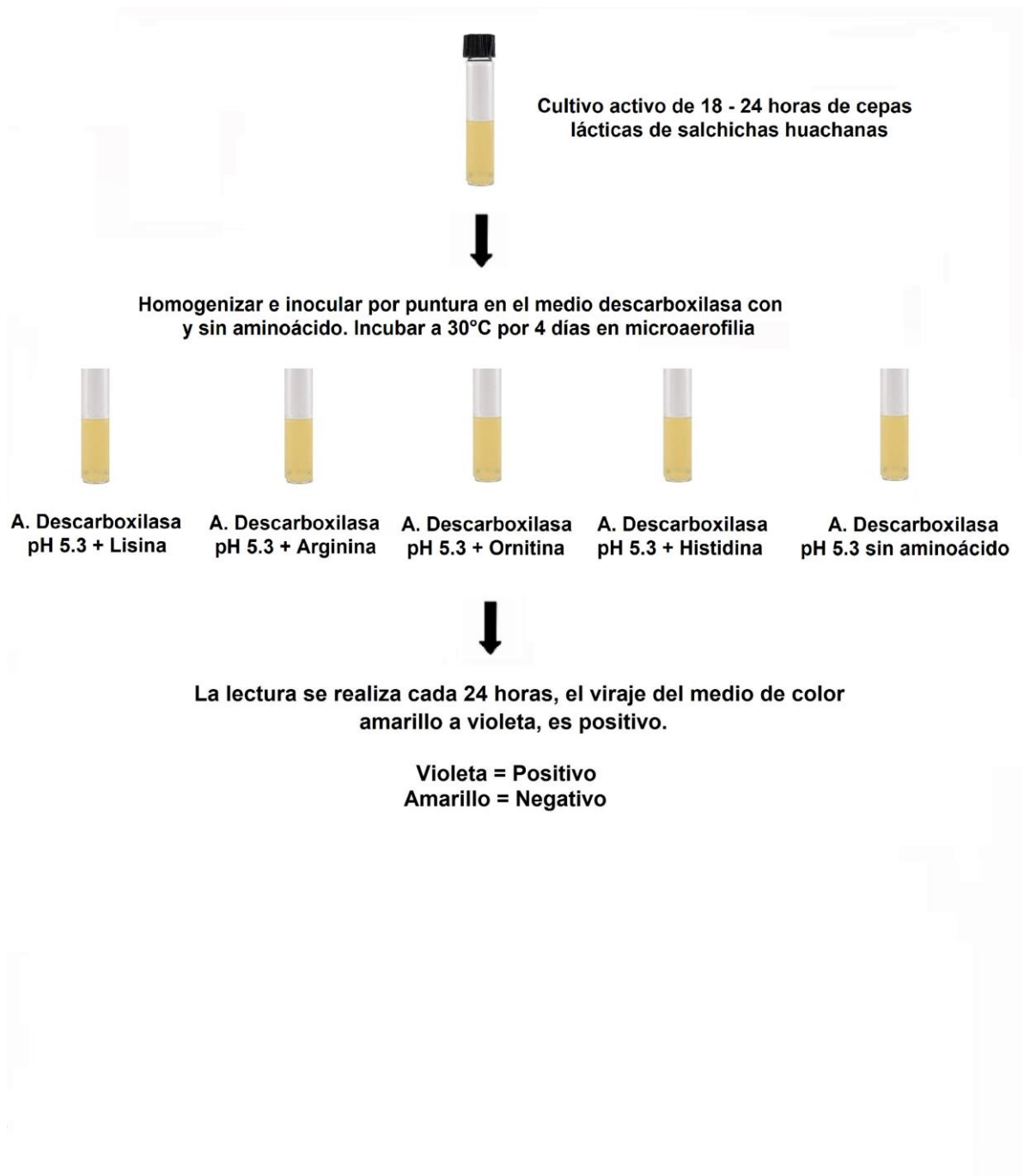
Destañir en solución de ácido acético y metanol para evidenciar halos claros

PROCOLO N°5. BÚSQUEDA DE BACTERIAS LÁCTICAS PRODUCTORAS DE AMINAS BIÓGENAS

a. Preparación del medio Descarboxilada



b. Búsqueda de bacterias lácticas productoras de aminos biógenas



MEDIOS DE CULTIVO

1. SOLUCION SALINA

Cloruro de sodio _____ 8,5 g/L

Agua destilada c.s.p. _____ 1,0 L

Esterilizar por 15 minutos a 121°C.

2. AGAR MRS + CICLOHEXIMIDA 0.02%

Peptona de caseína _____ 10,0 g/L

Extracto de carne _____ 10,0 g/L

Extracto de levadura _____ 5,0 g/L

Glucosa _____ 20,0 g/L

K₂HPO₄ _____ 5,0 g/L

Citrato diamónico _____ 2,0 g/L

Acetato de sodio _____ 5,0 g/L

MgSO₄.7H₂O _____ 0,5 g/L

MnSO₄.7H₂O _____ 0,2 g/L

Tween 80 _____ 1,0 mL/L

Agar _____ 20,0 g/L

Ajustar a pH 6,5, esterilizar por 15 minutos a 121°C. Agregar en condiciones de esterilidad 0.02% de cicloheximida (previamente tratada con luz UV durante 20 minutos).

3. CALDO MRS

Peptona de caseína	_____	10,0 g/L
Extracto de carne	_____	10,0 g/L
Extracto de levadura	_____	5,0 g/L
Glucosa	_____	20,0 g/L
K ₂ HPO ₄	_____	5,0 g/L
Citrato diamónico	_____	2,0 g/L
Acetato de sodio	_____	5,0 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	_____	0,5 g/L
MnSO ₄ .7H ₂ O	_____	0,2 g/L
Tween 80	_____	1,0 mL/L

Ajustar a pH 6,5, esterilizar por 15 minutos a 121°C.

4. MEDIO BASE FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS PARA BACTERIAS LÁCTICAS

Peptona de caseína	_____	10,0 g/L
Extracto de levadura	_____	5,0 g/L
K ₂ HPO ₄	_____	5,0 g/L
Citrato diamónico	_____	2,0 g/L
Acetato de sodio	_____	5,0 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	_____	0,5 g/L
MnSO ₄ .7H ₂ O	_____	0,2 g/L
Tween 80	_____	1,0 mL/L

Ajustar a pH 6,5, adicionar indicador Púrpura de Bromocresol 10% (v/v). Luego agregar 1% (v/v) de cada carbohidrato. Esterilizar por 15 minutos a 121°C.

5. CALDO MR-VP

Peptona de carne _____ 7,0 g/L

Glucosa _____ 2,0 g/L

K₂HPO₄ _____ 5,0 g/L

Ajustar a pH 7,0, esterilizar por 15 minutos a 121°C.

REACTIVOS:

1. α-Naftol (5%) _____ 5,0 g/L

Alcohol etílico absoluto (99.8%) _____ 100,0 mL/L

2. KOH _____ 40,0 g/L

Agua destilada c.s.p. _____ 100,0 mL/L

6. GLUCONATO DE POTASIO

Peptona de carne _____ 1,0 g/L

Extracto de levadura _____ 1,0 g/L

K₂HPO₄ _____ 1,0 g/L

Gluconato de potasio _____ 40,0 g/L

Ajustar a pH 6,5, esterilizar por 15 minutos a 121°C.

7. AGAR BHI

Extracto de cerebro _____ 12,5 g/L

Extracto de corazón _____ 5,0 g/L

Proteosa-peptona _____ 5,0 g/L

Dextrosa _____ 2,0 g/L

Cloruro sódico _____ 5,0 g/L

Fosfato disódico _____ 2,5 g/L

Agar _____ 18,0 g/L

Ajustar a pH 7,0, esterilizar por 15 minutos a 121°C.

8. AGAR LECHE según (HARRIGAN AND MCCANCE, 1979)

Peptona de carne	_____	10,0 g/L
Extracto de carne	_____	5,0 g/L
Extracto de levadura	_____	5,0 g/L
Cloruro de sodio	_____	5,0 g/L
Leche descremada	_____	5,0 mL/L

Ajustar a pH 7,0, esterilizar por 15 minutos a 121°C.

9. AGAR CASEINA HIDROLIZADA (CALCIO CASEINATO)

Peptona de carne	_____	3,0 g/L
Extracto de carne	_____	5,0 g/L
Cloruro de sodio	_____	5,0 g/L
Caseina hidrolizada	_____	2,5 g/L
CaOH	_____	0,15 g/L
Agar	_____	18,0 g/L

Ajustar a pH 6,5, adicionar indicador Púrpura de Bromocresol 10% (v/v).

Esterilizar por 15 minutos a 121°C.

10. AGAR BASE TGY

Triptona	_____	5,0 g/L
Extracto de levadura	_____	2,5 g/L
Glucosa	_____	1,0 g/L
Agar	_____	15,0 g/L

Ajustar a pH 7,0 y esterilizar por 15 minutos a 121°C. Adicionar 1 g/L de extracto de proteína sarcoplásmico.

11. AGAR MRS + EXTRACTO DE PROTEINA SARCOPLASMICA

Extracto de carne	_____	10,0 g/L
Extracto de levadura	_____	5,0 g/L
Glucosa	_____	1,0 g/L
K ₂ HPO ₄	_____	5,0 g/L
Citrato diamónico	_____	2,0 g/L
Acetato de sodio	_____	5,0 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	_____	0,5 g/L
MnSO ₄ .7H ₂ O	_____	0,2 g/L
Tween 80	_____	1,0 mL/L
Agar	_____	15,0 g/L

Ajustar a pH 6,5, esterilizar por 15 minutos a 121°C. En condiciones de esterilizada agregar 20% (v/v) de extracto sarcoplásmico previamente filtrado.

12. MEDIO DESCARBOXILASA MODIFICADO PROPUESTO POR BOVER-CID

AND HOLZAPTEL

Carbonato de potasio	_____	0,1 g/L
Sulfato de manganeso	_____	0,05 g/L
Triptona	_____	5,0 g/L
Extracto de carne	_____	5,0 g/L
Extracto de levadura	_____	5,0 g/L
Glucosa	_____	0,5 g/L
K ₂ HPO ₄	_____	2,0 g/L
Citrato diamónico	_____	2,0 g/L
Cloruro de sodio	_____	2,5 g/L
Sulfato de hierro III	_____	0,04 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	_____	0,2 g/L
Tiamina	_____	0,01 g/L
Piridoxal-5-fosfato	_____	0,05 g/L
Tween 80	_____	1,0 mL/L
Agar	_____	15,0 g/L

Agregar el indicador Púrpura de Bromocresol 10% (w/v), ajustar a pH 5,3 y esterilizar por 15 minutos a 121°C. En condiciones de esterilidad agregar 1% (w/v) de cada aminoácido previamente tratado con luz UV durante 20 minutos.

SOLUCIONES BUFFER

1. BUFFER FOSFATO SALINO 0,03 N

KH_2PO_4 _____ 4,08 g/L

K_2HPO_4 _____ 5,22 g/L

Agua destilada _____ 1 L

Ajustar a pH 7,0, esterilizar por 15 minutos a 121°C.

COLORANTES

1. CRISTAL VIOLETA

Solución A: Cristal violeta _____ 2,0 g

Alcohol etílico (95%) _____ 20,0 mL

Solución B: Oxalato de amonio _____ 0,8 g

Agua destilada _____ 80,0 mL

Mezclar Solución A y B luego filtrar.

2. LUGOL

Yodo metálico _____ 1,0 g

Yoduro de Potasio _____ 2,0 g

Agua destilada _____ 200,0 mL

Disolver el yoduro en pequeña cantidad de agua, agregar y disolver, luego añadir el resto del agua destilada

3. ALCOHOL ACETONA

Etanol 70% _____ 70 mL

Acetona _____ 30 mL

Mezclar y homogenizar.

4. SAFRANINA

Safranina _____ 2,5 g

Alcohol 95% _____ 100,0 mL

Agregar 10 ml a 100,0 ml de agua destilada.

5. SOLUCION DE TEÑIDO DE PROTEINAS SARCOPLASMICAS

Azul brillante de Coomasie G250 _____ 0,01 % (W/V)

Mezcla metanol:ácido acético:agua _____ 50:40:10

Agregar azul brillante de Coomasie a la mezcla y homogenizar.

6. SOLUCION DE DESTEÑIDO DE PROTEINAS SARCOPLASMICAS

Metanol _____ 10%

Ácido acético _____ 7,5%

Mezclar y homogenizar.

10.2 GLOSARIO

MRS	Man Rogosa Sharpe
BHI	Brain heart infusion
a.C.	antes de Cristo
g	gramo
mg	miligramo
mm	milímetro
pH	medida de acidez o alcalinidad de una disolución
CO ₂	Dióxido de carbono
ATP	Adenosin Trifosfato
ADP	Adenosin Difosfato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
GRAS	Generally Reconized As Safe
FDA	Food and Drug Administration
BAL	Bacterias ácido lácticas
SNC	Estafilococos coagulasa negativos
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
ATCC	American Type Culture Collection
CIPROLAC	Cultivos iniciadores y probióticos lácticos

v/v	Relación volumen por volumen
w/v	Relación peso por volumen
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro
N	Normal
L.	Lactobacillus
P.	Pediococcus
rpm	Revoluciones por minuto
g/L	Gramos por litro
μL	Microlitro
°C	Grados centígrados