



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE
PRODUCTOS CÁRNICOS MADURADOS**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA:

HÉCTOR RICHARDS GRANADOS



MÉXICO, Cd. Mx.

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: OSCAR HERNÁNDEZ MELENDEZ
VOCAL: Profesor: CAROLINA PEÑA MONTES
SECRETARIO: Profesor: ISRAEL GARCÍA CANO
1er. SUPLENTE: Profesor: ALFONSO RAFAEL SALGADO AGUAYO
2° SUPLENTE: Profesor: CARMINA MONTIEL PACHECO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO S-132, EDIFICIO “S”,
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD
IZTAPALAPA.**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Israel García Cano

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Edith Ponce Alquicira

SUSTENTANTE:

Héctor Richards Granados

Contenido

RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCIÓN	5
Bacterias ácido lácticas (BAL).....	5
Clasificación de bacterias ácido lácticas	6
Productos de la fermentación de BAL.....	8
Orgánicos	8
Proteínicos.....	9
2. ANTECEDENTES	16
Biodiversidad microbiana de los productos cárnicos curados-fermentados.....	16
Importancia de los microorganismos en la elaboración de productos cárnicos	16
Actividad antimicrobiana	17
Actividad lipolítica	18
Actividad proteolítica	18
Actividad descarboxilasa.....	19
Actividad multicobre-oxidasa (MCO) y amino-oxidasa (AOX).....	20
3. HIPÓTESIS.....	23
4. OBJETIVO GENERAL.....	23
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO	24
6. METODOLOGÍA	25
Cultivo de cepas aisladas.....	25
Identificación de microorganismos aislados.....	25
Obtención de las fracciones de estudio.....	25
Cuantificación de proteína	26
Determinación de perfil proteínico en SDS-PAGE.....	26
Estudio de las actividades enzimáticas	26
Actividad antimicrobiana	26
Actividad lipolítica.....	29
Actividad proteolítica	30
Actividad aminoácido descarboxilasa	31
Actividad oxidasa.....	32

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
<i>Identificación de microorganismos aislados.</i>	34
<i>Perfil proteínico en SDS-PAGE.</i>	36
Detección y localización de actividad enzimática	36
<i>Lactobacillus</i>	36
<i>Pediococcus</i>	46
<i>Enterococcus</i>	55
<i>Weissella</i>	61
8. CONCLUSIONES	65
9. PERSPECTIVAS	66
10. REFERENCIAS	67

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son fundamentales en la elaboración de productos cárnicos fermentados, ya que sus metabolitos producen efectos de bioconservación, esto se debe a la actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos y alterantes. También las BAL producen enzimas con actividad lipolítica y proteolítica lo cual repercute en el desarrollo de aromas y sabores característicos del madurado. Sin embargo, en los últimos años las BAL han sido estudiadas por su capacidad para producir de compuestos indeseables como; aminos biógenos (AB) las cuales pueden tener efectos tóxicos para algunos consumidores, debido a esta situación es importante evaluar la capacidad para degradar AB mediante la actividad de multicobre oxidasa (MCO) y amino oxidasa (AOX) de los cuales destacan los géneros *Pediococcus* y *Lactobacillus* con dichas actividades en diferentes fracciones celulares.

Previamente en el grupo de trabajo se aislaron bacterias lácticas de diversos productos cárnicos, las cuales fueron el objetivo de este estudio. Todos los microorganismos fueron identificados por métodos moleculares mediante la amplificación del gen 16S del ADNr. Se encontraron los siguientes géneros; *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella* y *Enterococcus*. Por medio de diversas técnicas cuantitativas y cualitativas, se evaluaron actividades enzimáticas como: antibacteriana, lipolítica, proteolítica, tirosina descarboxilasa, multicobre-oxidasa y amino-oxidasa. Los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus* presentaron actividad antimicrobiana contra las siguientes bacterias patógenas: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. También presentaron actividad lipolítica y proteolítica. Para el caso de *Enterococcus faecium* presentó actividad contra *Listeria innocua*. También dichas bacterias inhibieron bacterias deteriorantes del exudado de salami. Únicamente se detectó actividad MCO por parte de *Pediococcus lolii* en células y en extracto crudo libre de células por zimografía.

1. INTRODUCCIÓN

Los derivados cárnicos son productos alimentarios preparados con carnes, grasa y subproductos comestibles, procedentes de animales de abasto u otras especies y en su caso, de ingredientes de origen vegetal como lo son condimentos y especias, además pueden contener aditivos, siempre y cuando estén autorizados en su uso y se ajusten a las normas oficiales vigentes. Con base en la “NOM-145-SSA1-1995”. Se define como derivado cárnico aquel que en cierto tiempo a determinadas condiciones de almacenamiento desarrolla aromas, colores y sabores específicos causados por cambios físicos, químicos y por la presencia de microorganismos ácido lácticos adicionados o no. El proceso de elaboración de productos madurados incluye una etapa de secado, en la que se presenta una reducción de la actividad acuosa (a_w), que en combinación con la acidificación se adquiere un efecto de conservación, además de la consistencia del producto (Frey, 1983). Las bacterias ácido lácticas (BAL) se han empleado a través de los siglos como cultivos iniciadores para brindar atributos sensoriales, se ha reportado su capacidad conservadora, esto se debe a la amplia gama de metabolitos antibacterianos que actúan de forma sinérgica para prevenir o eliminar la microbiota tanto patógena como deteriorante (Grosu-Tudor *et al.*, 2014).

Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL son microorganismos Gram-positivos, en general presentan morfología de bacilos y cocabacilos, los géneros que pertenecen a los cocos son; *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* (Vandamme *et al.*, 1996). Los géneros que pertenecen a bacilos son; *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Bifidobacterium*, son anaerobios, microaerofílicos o aerotolerantes, como características metabólicas en general son, oxidasa y catalasa negativa, carecen de citocromos y no reducen el nitrato a nitrito, producen ácido láctico como principal producto de la fermentación de carbohidratos, normalmente no presentan movilidad y no son esporulados, además las BAL pueden crecer en condiciones ácidas a valores de pH de 3.2, en general su pH óptimo de crecimiento es de 4.0-4.5, permitiendo así sobrevivir de manera natural en alimentos como: cereales, lácteos, carnes y vegetales, donde otras bacterias no podrían hacerlo debido a la presencia de ácidos orgánicos (Carr *et al.*, 2002). Las BAL se desarrollan rápidamente a una temperatura de 20°C a 25°C durante el proceso fermentativo, desde

un orden de 10^3 UFC/g hasta 10^9 UFC/g después de 12 h (Andrighetto *et al.*, 2001). Con respecto a sus requerimientos nutricionales emplean fuentes de carbono como la glucosa y lactosa, además de aminoácidos, vitaminas, factores y cofactores de crecimiento como las sales de magnesio y manganeso (Kröckel, 2013).

Clasificación de bacterias ácido lácticas

Con base al metabolismo de carbohidratos las BAL se pueden clasificar en: homofermentativas, las cuales producen únicamente ácido láctico durante la fermentación, utilizando la vía metabólica de Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) al convertir 1 mol de glucosa en 2 mol de ácido láctico (Parra-Huertas, 2010). Este grupo se conforma por los géneros: *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y algunas especies de *Lactobacillus*. Las heterofermentativas convierten 1 mol de glucosa en 1 mol de ácido láctico, etanol y bióxido de carbono, esta ruta metabólica emplea fosfoacetolasa, pero carece de aldolasa y fosfohexosa isomerasa; así que, en lugar seguir la vía EMP, siguen las vías de las hexosas monofosfato, obteniendo una molécula de ATP (Figura 1). Este grupo de bacterias incluye a los géneros *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium* y algunas especies de *Lactobacillus*.

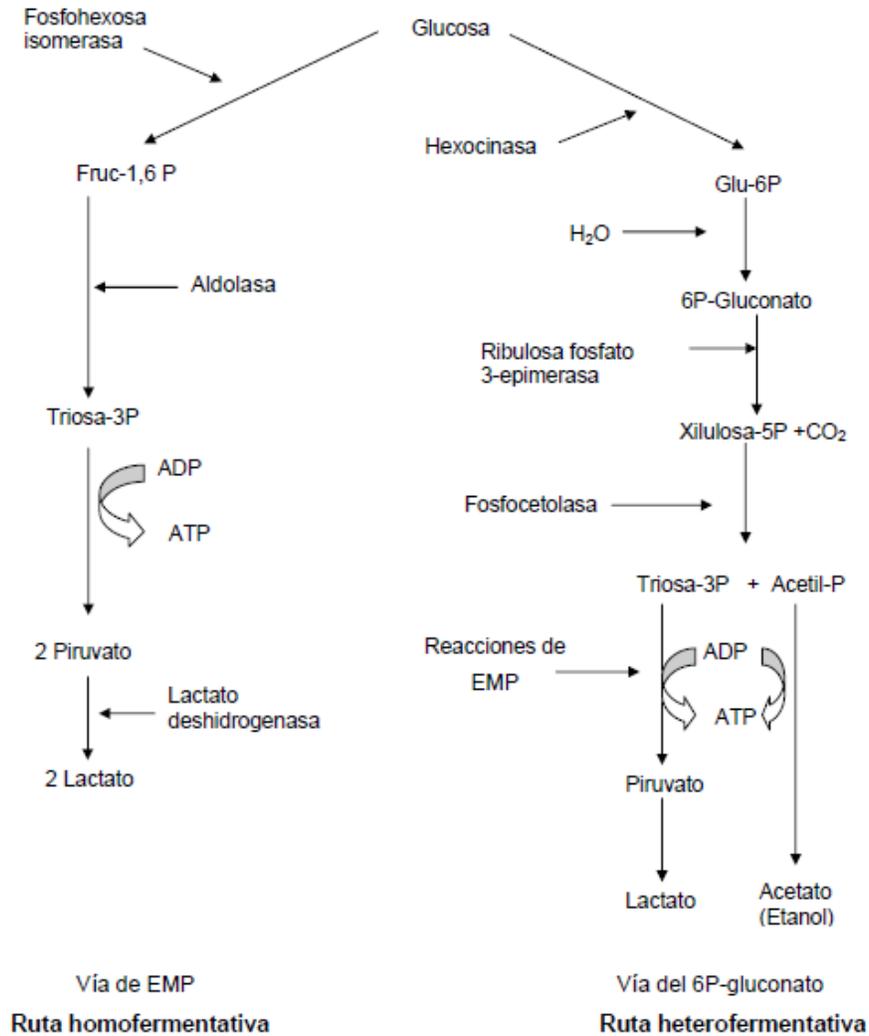


Figura 1. Rutas metabólicas de carbohidratos en BAL (Ramírez-Cuenca, 2005).

Las BAL también se pueden clasificar en función de su temperatura de crecimiento, siendo estas mesófilas o termófilas.

Las BAL mesófilas crecen a una temperatura óptima de 20-25°C en un tiempo de 18-20 h, dentro de este grupo, las especies más comunes son: *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris* y *Leuconostoc mesenteroides* (Tarté, 2009).

El grupo de BAL termófilas crecen a una temperatura óptima de 40-45°C en un tiempo de 2-4 h y las especies más comunes son: *Lactobacillus delbruekii*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salivarius* (Tarté, 2009).

Productos de la fermentación de BAL

Las BAL producen una serie de metabolitos que pueden cumplir diversas funciones en los alimentos, por ello desde la antigüedad se han empleado como cultivos iniciadores para la producción de yogurt, bebidas alcohólicas fermentadas, quesos y embutidos madurados; estos metabolitos brindan propiedades tanto funcionales como efectos bioconservantes y sensoriales (García-Fontan *et al.*, 2007). Los podemos clasificar en función de su naturaleza química; es decir, de origen orgánico y proteínico.

Orgánicos

Ácidos orgánicos

El ácido láctico es el principal ácido orgánico que producen las BAL por la vía homofermentativa, es importante en productos como mantequillas, quesos, yogurt, bebidas y cárnicos ya que se emplea como acidulante e inhibidor de bacterias en una amplia variedad de alimentos procesados. Este ácido débil tiene potencial antimicrobiano debido a que en su estado no disociado puede atravesar la membrana celular microbiana disipando el potencial de membrana y reduciendo el pH intracelular, lo que causa la muerte de células sensibles (Gloud, 1991).

Los ácidos acético y propiónico son producidos por la vía heterofermentativa, pueden interactuar con las membranas celulares y causar acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas. Estos compuestos presentan mayor efectividad antimicrobiana con respecto al ácido láctico debido a los valores elevados de pKa (ácido láctico 3.08, ácido propiónico 4.87 y acético 4.75) por lo que la actividad antimicrobiana aumenta contra levaduras, mohos y bacterias (Yang, 2000).

Peróxido de hidrógeno

Es producido principalmente por el género *Lactococcus* a través de la acción de NADH oxidasa la cual cataliza la oxidación de NADH por oxígeno molecular, se ha reportado que reacciona con el ión superóxido liberando radicales hidroxilos capaces de oxidar lípidos de la membrana celular y alterar el material genético de la célula sensible (Block, 1991). La acumulación de este compuesto en productos cárnicos puede provocar reacciones de rancidez de grasas provocando olores

desagradables y pérdida de color característico del curado. Se ha reportado que el peróxido de hidrógeno producido por *Lactobacillus* y *Lactococcus* es capaz de inhibir cepas de *S. aureus* y *Pseudomonas* spp. (Yang, 2000).

Dióxido de carbono

El dióxido de carbono es un producto final de BAL heterofermentativas y algunas homofermentativas, se puede generar por descarboxilación de aminoácidos como arginina, histidina y tirosina y de la fermentación de carbohidratos como malato, citrato, gluconato, lactato y lactosa (Lyte, 2004; Callejón *et al.*, 2013). En altas concentraciones el dióxido de carbono crea un ambiente anaerobio el cual inhibe las descarboxilaciones enzimáticas; por otra parte, la acumulación en la bicapa lipídica causa una disfunción en la permeabilidad de la membrana. A bajas concentraciones puede favorecer el crecimiento de algunos microorganismos deteriorantes. (Yang, 2000).

Proteínicos

Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos antibacterianos, generalmente catiónicos, hidrófobos o anfífilicos y capaces de permeabilizar la membrana celular de bacterias sensibles, pueden contener de 20 a 60 aminoácidos aproximadamente, con un peso molecular de 3 a 10 kDa. Estos péptidos difieren en su espectro de actividad, características bioquímicas y genéticas. De acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas se dividen en tres clases: la clase I son las bacteriocinas que contienen lantionina; la clase II, aquellas bacteriocinas que no contienen lantionina; y la clase III, son bacteriolisinas (Cotter *et al.*, 2005). En la Tabla 1 se listan algunos ejemplos y descripciones de cada clase

Tabla 1. Clases de bacteriocinas (Cotter *et al.*, 2005)

Clasificación	Descripción	Ejemplos
Clase I. Bacteriocinas que contienen lantionina	Lantibióticos de uno o dos péptidos	Nisina
Clase II. Bacteriocinas que no contienen lantionina	Clase heterogénea de pequeños péptidos	Pediocina PA1
Clase III. Bacteriolisinas	Proteínas termolábiles y de alto peso molecular	Enterolisina A

El modo de acción de las bacteriocinas es complejo. La nisina (clase I) y pediocina (clase II) son las más estudiadas y comparten algunas características en común (Montville y Chen, 1998). Por lo general, actúan formando agregados proteínicos que destruyen la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de iones (potasio y magnesio) y aminoácidos, produciendo la muerte celular debido a la inhibición de síntesis de macromoléculas, alteración de la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácidos nucleicos (Ramírez-Cuenca, 2005).

Peptidoglucano hidrolasas (PGH)

En las bacterias Gram-positivas, la pared celular contiene una capa gruesa de peptidoglucano la cual forma múltiples capas y presenta una conformación tridimensional que origina una pared celular muy fuerte y rígida, además se asocian a otros compuestos como ácidos teicóicos y lipoteicóicos y/o polisacáridos. En cambio, el peptidoglucano de la pared celular de las bacterias Gram-negativas constituye una sola capa delgada, la cual se encuentra rodeada por una segunda membrana lipídica exterior que contiene lipopolisacáridos y lipoproteínas, en este caso la capa de peptidoglucano se une a la membrana externa mediante lipoproteínas.

Las PGH son aquellas enzimas que hidrolizan el péptidoglucano en regiones específicas; las N-acetilglucoamididasas hidrolizan el enlace β -1,4 de la cadena de glicanos dejando un extremo N-

acetilglucosamina reductor, las N-acetilmuramidasa hidrolizan el mismo enlace, sin embargo, dejan un extremo N-acetilmurámico reductor libre, estas enzimas son llamadas comúnmente como lisozimas. Las N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa rompen el enlace amida entre el N-acetilmurámico y la L-alanina del péptido. Las peptidasas son capaces de hidrolizar el ultimo aminoácido del extremo carboxilo de los péptidos (carboxipeptidasas), o de hidrolizar completamente los enlaces peptídicos entre aminoácidos (García-Cano, 2013) (Figura 2).

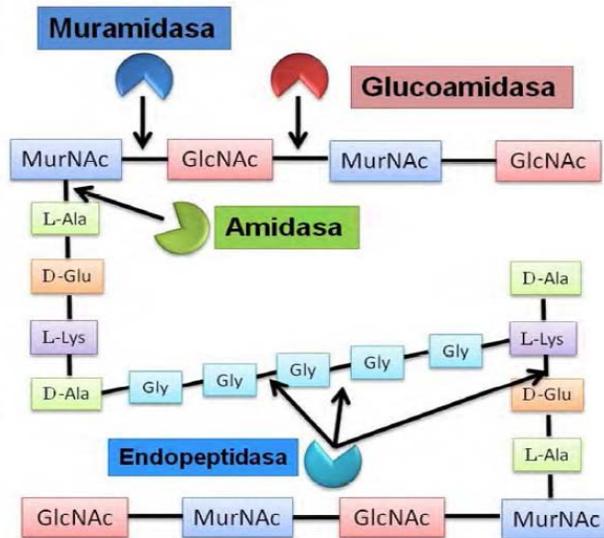


Figura 2. Estructura del péptidoglucano de *S. aureus*. Las flechas indican el tipo de enlace que hidrolizan las PGH sobre la pared bacteriana (MurNac, N-acetilmurámico; GlcNac, N-acetilglucosamina) (Tomado de García-Cano, 2013).

Lipasas

Las lipasas se definen como glicerol éster hidrolasas, las cuales hidrolizan enlaces de tipo éster presentes en tri, di y monoacilgliceroles teniendo como producto final glicerol y ácidos grasos libres cuando se trata de una hidrólisis total (Figura 3). El sustrato natural de las lipasas son triacilgliceroles (TAG) de cadena larga, que tienen muy baja solubilidad en agua y su catálisis sucede en una interfase aceite-agua, a diferencia de las carboxilesterasas que prefieren sustratos solubles en agua y de cadena corta (Jiménez-López, 2004).

Las lipasas bacterianas se clasifican en más de 50 carboxilesterasas, agrupándolas en 8 familias, basándose en la homología de su secuencia de aminoácidos y sus propiedades biológicas (Zuñiga-Rodriguez, 2004).

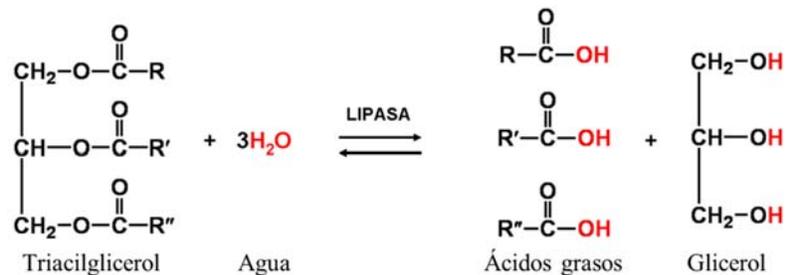


Figura 3. Ejemplo de catálisis enzimática de un triacilglicerol.

Las carboxilesterasas han sido estudiadas por ser altamente selectivas durante las reacciones de síntesis de ésteres y desacetilación, además de ser muy estables en solventes orgánicos. Catalizan otras reacciones no hidrolíticas (reacciones de síntesis) debido a que son capaces de mantener su actividad en medios no acuosos (Bermúdez-García, 2010). Las reacciones de síntesis que catalizan las lipasas son útiles en la formación de ésteres a partir de diversos alcoholes (alcoholisis), ácidos grasos (acidólisis) y otros ésteres de ácidos grasos. Sin embargo, este tipo de reacciones tiene como factor limitante la eficiencia en la eliminación del agua en el medio. Se pueden distinguir dos tipos de reacción: la transesterificación e interesterificación. La transesterificación implica la transferencia de un grupo acilo de un TAG a un alcohol o a un glicerol. En la interesterificación el grupo acilo se intercambia entre un triglicérido y un ácido graso (acidólisis) o un éster de ácido graso a otro triglicérido (Jiménez-López, 2004).

Proteasas

Las proteasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de cadenas polipeptídicas, se ha reportado que poseen funciones en procesos bioquímicos y de regulación con la finalidad de mantener el equilibrio entre degradación y síntesis de proteínas. Un ejemplo son las proteínas existentes en productos cárnicos: caseína y colágeno, las cuales son hidrolizadas por BAL del género *Lactobacillus*, que posteriormente son asimiladas como fuente de nitrógeno. (Vendramin-Alegre, 2013).

Dependiendo del sitio donde actúan, pueden dividirse en dos grupos: exopeptidasas y endopeptidasas. Las exopeptidasas realizan la hidrólisis de un solo aminoácido o dipeptido desde el extremo N terminal (aminopeptidasas) o desde el extremo C terminal (carboxipeptidasas). Las endopeptidasas o proteinasas hidrolizan enlaces polipeptídicos a lo largo de la cadena polipeptídica (Figura 4).

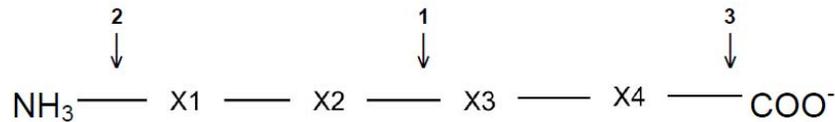


Figura 4. Sitio de catálisis enzimática de las proteasas. Exopeptidasas actúan en la posición N terminal (2) o en la posición C-terminal (3) del polipéptido. Las endopeptidasas hidrolizan enlaces peptídicos internos de los polipéptidos (1). (Tomado de Gonzáles y Robert-Baudouy, 1996).

Descarboxilasas

Las carboxi-liasas, también conocidas como descarboxilasas, son liasa carbono-carbono que agregan o remueven grupos carboxilo α de los aminoácidos, generando aminas biógenas, estas enzimas también pueden catalizar la descarboxilación de β -cetoácidos y α -cetoácidos. Por lo general se nombran de acuerdo al sustrato de la reacción de descarboxilación que catalizan, por ejemplo, la ornitina descarboxilasa cataliza la descarboxilación de la ornitina para obtener putrescina (Leuschner *et al.*, 1998).

Multicobre oxidasas

Las multicobre oxidasas son un tipo de metaloenzimas oxidoreductasas que se encuentran ampliamente distribuidas en plantas superiores, hongos, bacterias e insectos. Acoplan la oxidación de cuatro moléculas de sustrato con la reducción de una molécula de oxígeno a 2 moléculas de agua usando como mínimo cuatro átomos de cobre distribuidos en dos sitios activos (Solomon *et al.*, 2008). Estas proteínas conforman una gran familia de enzimas constituidas por lacasas, ferroxidasas, ascorbato oxidasa y ceruloplasmina (Hoegger *et al.*, 2006).

Los 4 átomos de cobre de las multicobre oxidasas se clasifican en: tipo 1, tipo 2 y tipo 3 de acuerdo a las propiedades espectroscópicas que presentan (Tabla 2) (Rodríguez y Toca, 2006).

Tabla 2. Clasificación de los 4 átomos de cobre en las multicobre oxidasas (Tomado y modificado de Rodríguez y Toca, 2006).

Tipo de Cu	Átomos de Cu/molécula de proteína	Absorción UV-visible
Tipo 1	1	610 nm
Tipo 2	1	Indetectable
Tipo 3	2	330 nm

Las lacasas son enzimas pertenecientes al grupo de las oxidasas, estas catalizan la oxidación de un sustrato orgánico o inorgánico y la reducción de oxígeno en agua. Principalmente sustratos fenólicos como; ferrocianidas, anilinas, benzotioles y otros compuestos con potenciales redox menores a 1V (Piscitelli, 2005). Su catálisis consiste en la reducción del Cu^{2+} tipo 1 debido a la oxidación del sustrato fenólico, el electrón extraído es transferido internamente del Cu^{2+} tipo 1 al Cu^{2+} tipo 3 a través de una cisteína y una histidina, finalmente se une un segundo sustrato (oxígeno molecular) el cual acepta el electrón transferido. Esta reacción genera radicales que se pueden rearrreglar espontáneamente para promover la apertura de enlaces covalentes como: C-C, C-O y en la apertura de anillos aromáticos (Kunamneni *et al.*, 2007).

Amino oxidasas

Las amino oxidasas son un tipo de metaloenzimas que pertenecen a la familia de las oxidoreductasas, presentan actividad sobre diaminas como la cadaverina, estas actúan sobre los grupos CH-NH_2 como donantes de electrones y con oxígeno como aceptor (Figura 5). Se clasifican en; monoamino oxidasas, las cuales contienen cobre en su estructura. Las diamino oxidasas son sensibles a la inhibición por reactivos con presencia de grupo carbonilo, tales como la semicarbazida, estas poseen verdadera actividad histaminasa por lo que se diferencian de las monoamino oxidasas (Haywood *et al.*, 1981).

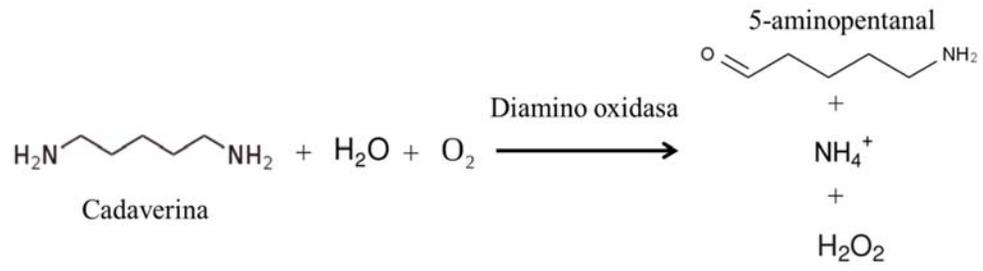


Figura 5. Catálisis de cadaverina mediante una diamino oxidasa.

2. ANTECEDENTES

Biodiversidad microbiana de los productos cárnicos curados-fermentados

La microbiota de los productos cárnicos curados-fermentados ha sido caracterizada en distintas regiones de Europa (Montel *et al.*, 1991) y se ha comprobado que no existen diferencias significativas entre los productos de diversos países europeos a nivel de especies bacterianas, ya que en general se han reportado bacterias ácido lácticas como; *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus plantarum*, así como mohos y levaduras. Con respecto a los microorganismos patógenos que están presentes en caso de malas prácticas de manufactura son; *Salmonella* spp. *S. aureus*, *Yersinia enterocolítica*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* spp., *E. coli* y *Listeria monocytogenes*, los cuales causan infecciones e intoxicaciones (Soomro *et al.*, 2002). Los microorganismos que provocan alteraciones en productos cárnicos fermentados, en su mayoría son psicrotrofos aerobios heterofermentativos como: *Leuconostoc*, *Weissella*, *Moraxella*, entre otros, los cuales producen acidificación, formación de exudados y abombamiento en productos empacados al vacío y atmósferas modificadas (Hui *et al.*, 2013).

Importancia de los microorganismos en la elaboración de productos cárnicos

En la industria cárnica los microorganismos desempeñan un papel decisivo en la elaboración de productos, ya que están implicados en la modificación de textura, color y aroma, reducción de nitratos, acidificación entre otros. Sin embargo, no todos los microorganismos presentes en las materias primas contribuyen de manera benéfica, y algunos de ellos pueden producir atributos indeseables. Una manera de obtener un producto de calidad consiste en utilizar microorganismos seleccionados que influyen de manera benéfica, además de inhibir el desarrollo de la microbiota acompañante que normalmente llega a la masa del embutido procedente de la materia prima o en el transcurso de su fabricación (Frey, 1983). Durante los últimos años la biotecnología de alimentos se ha involucrado en los procesos de elaboración tanto tradicionales e industriales.

Se ha demostrado que las BAL contribuyen a la maduración y deterioro de productos cárnicos, ya que presentan diferentes actividades metabólicas como: antimicrobiana, lipolítica, proteolítica,

descarboxilasa y oxidasa, lo cual repercute directamente en la inocuidad y en propiedades organolépticas, así como la vida de anaquel del producto final. Por lo que es importante conocer los metabolitos sintetizados por las BAL.

Actividad antimicrobiana

El efecto antimicrobiano de BAL contra otras bacterias se conoce desde hace muchos años. En el ser humano la microbiota nativa intestinal regula e inhibe el crecimiento de bacterias patógenas debido a los productos de la fermentación, competencia por sustratos y sitios de colonización (Fernández-Escartin, 2000).

Durante la fermentación y maduración de productos, los nutrientes disponibles son consumidos y se producen diversas moléculas de origen proteínico y orgánico las cuales pueden presentar actividad antimicrobiana y antagonista. Esta interacción entre microorganismos alterantes y BAL es importante ya que determinará que bacterias son predominantes al final de la maduración. Un ejemplo es el chorizo tipo español ya que la microbiota inicial de BAL es baja y se presentan microorganismos alterantes (*Leuconostoc*, *Weissella* y *Pseudomonas*) y patógenos (*S. aureus*, *L. monocytogenes* y *E. coli*). Una vez concluida la maduración las BAL son las predominantes (Hui *et al.*, 2013).

Otro ejemplo, es la actividad antimicrobiana descrita en *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 contra microorganismos patógenos como *S. aureus*, *E. coli* y *L. monocytogenes*. Este microorganismo (*P. acidilactici*) fue aislado de un producto madurado tipo salami y se ha reportado que la actividad antimicrobiana observada se debe principalmente a la producción de PGH (García-Cano *et al.*, 2011).

El género *Lactobacillus* es uno de los más estudiados y empleados como cultivos iniciadores por sus propiedades metabólicas y probióticas (Gutiérrez-Ramírez *et al.*, 2005). En condiciones óptimas genera metabolitos con actividad antimicrobiana como; ácidos orgánicos, peróxido y péptidos. Presenta efecto antagonista contra microorganismos patógenos como *Salmonella*, *L. monocytogenes* y *E. coli* (Scolari y Vescovo, 2004).

Enterococcus es un género bacteriano el cual ha tenido mucho interés con respecto a su actividad antimicrobiana, básicamente por la producción de bacteriocinas (enterocinas), teniendo efecto

inhibitorio considerable contra microorganismos indicadores como; *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. y *Clostridium* spp. Aunque en la actualidad el uso de *Enterococcus* como cultivo iniciador es cuestionado por tratarse de una bacteria entérica (Hwanhlem *et al.*, 2017).

Actividad lipolítica

La presencia de lipasas favorece la hidrólisis selectiva de TAG y por ende la liberación de ácidos grasos y compuestos volátiles, repercutiendo notablemente en el aroma del producto, esta actividad se atribuye principalmente a bacterias del género *Staphylococcus* y *Lactobacillus*, las cuales pueden crecer en medios con concentraciones altas de NaCl. Lo más importante es que pueden seguir produciendo lipasas en condiciones anaerobias (Torres *et al.*, 2014). Las lipasas son importantes en etapas de fermentación de alimentos como en la maduración del chorizo tipo español, ya que en el interior la disminución de oxígeno es considerable y la cantidad de sales favorecen a que los microorganismos produzcan lipasas. Se ha demostrado que dichas enzimas tienen actividad aún en condiciones salinas (Schreck y Grunden, 2004) y los géneros *Staphylococcus* y *Kocuria* producen mayor cantidad de lipasas y proteasas en dichas condiciones (Comi *et al.*, 1992).

La lipólisis es iniciada durante la fermentación y continúa en la maduración. Además, los ácidos grasos libres que son producto de la hidrólisis de TAG sufren reacciones oxidativas que conducen a la aparición de compuestos volátiles y no volátiles, repercutiendo principalmente en el aroma y sabor del producto (Demeyer *et al.*, 1986).

Actividad proteolítica

Las enzimas proteolíticas hidrolizan los enlaces peptídicos de las proteínas de la carne con distinto grado de intensidad y selectividad, se ha reportado que existen microorganismos que proliferan a bajas temperaturas, en especial las bacterias Gram-negativas, ya que pueden actuar sobre proteínas miofibrilares, presentando actividad proteolítica. En el caso del género de *Clostridium* se ha reportado que son los productores más eficientes de colagenasas, por lo que presentan actividad proteolítica hacia el colágeno (Hui *et al.*, 2013).

La proteólisis inicia con la acción de exopeptidasas tanto endógenas como de origen microbiano, liberando péptidos y aminoácidos (Demeyer *et al.*, 1986). La fracción de nitrógeno no proteínico se enriquece con el amoníaco proveniente del metabolismo microbiano de aminoácidos, provocando un ligero aumento del pH. Este incremento de nitrógeno no proteínico y de aminoácidos libres contribuyen al sabor, aroma y textura, así como la pérdida de agua (Demeyer *et al.*, 1992).

Las BAL productoras de exopeptidasas son: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidilactici*. Se ha reportado el uso de cepas de *Pediococcus pentosaceus* como cultivo iniciador en la producción de quesos debido a que contribuye en la maduración, así como en la producción de aromas y sabores ya que presenta actividad de aminopeptidasa, proteasa intracelular, dipeptidasa, dipeptidil aminopeptidasa y amino peptidasa (Contreras-Cruz, 2013).

Actividad descarboxilasa

Durante la maduración, los productos de hidrólisis proteínica (péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos), participan en reacciones de descarboxilación y desaminación, generando aminas y ácidos orgánicos, respectivamente, que pueden reaccionar y generar otros compuestos volátiles, que participan en atributos sensoriales como sabor y aroma característico del producto fermentado (Hui *et al.*, 2013).

Se ha reportado que estos compuestos nitrogenados producidos por la actividad aminoácido descarboxilasa de los microorganismos ocasionan trastornos como la intoxicación histamínica, crisis hipertensivas y migrañas en individuos sensibles (Brink *et al.*, 1990). En los embutidos fermentados la acidificación favorece la síntesis y actividad descarboxilasa, tanto de la microbiota responsable de la fermentación y de los microorganismos alterantes (Triki *et al.*, 2012).

En general, la actividad aminoácido descarboxilasa en productos cárnicos se atribuye principalmente a los géneros: *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Photobacterium*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella* y *Shigella* (Marino *et al.*, 2000). Además, las BAL pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*,

Enterococcus, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Lactococcus* también son capaces de descarboxilar uno o más aminoácidos libres (Galgano *et al.*, 2009).

En productos frescos no madurados y carnes, las enterobacterias han sido identificadas como las principales productoras de cadaverina e histamina (Bover-Cid *et al.*, 2009). Los mesófilos aerobios y el género *Pseudomonas* son los principales microorganismos productores de putrescina. Con respecto a la tiramina, se ha reportado que los principales productores son *Carnobacterium divergens*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bronchothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* y *E. coli*. Cabe destacar al género *Lactobacillus*, ya que son las BAL presentes en productos fermentados que presentan mayor contenido de aminas biógenas, principalmente la tiramina (De las Rivas *et al.*, 2008).

Actividad multicobre-oxidasa (MCO) y amino-oxidasa (AOX)

Debido a la problemática existente de la formación de aminas biógenas en distintos alimentos fermentados como vinos, quesos, lácteos, cárnicos, etc., la industria alimentaria junto con la biotecnología han buscado alternativas de emplear microorganismos que presenten actividad MCO y AOX para el diseño de cultivos iniciadores que favorezcan la reducción de estos compuestos nitrogenados, de los cuales depende la calidad e inocuidad de un producto alimenticio.

En la industria vinícola se han investigado consorcios de *L. plantarum* y *P. acidilactici*, las cuales han sido identificadas como MCO positivo, estas cupro-proteínas son eficientes al reducir aminas biógenas en vinos ya que degradan el 41% de putrescina durante una semana de fermentación (Callejón *et al.*, 2013).

En la producción y maduración de salchichas fermentadas se ha estudiado el efecto de adicionar cultivos iniciadores que contienen bacterias como *S. xylosus* y *L. plantarum*. Una vez concluida la etapa de maduración se detectó una reducción de tiramina (21%), histamina (25%) y cadaverina (22%) en comparación con el control (Chong *et al.*, 2015). Especies bacterianas como; *Staphylococcus carnosus*, *Brevibacterium linens* y *Micrococcus varians* han sido estudiadas por su actividad AOX para degradación de histamina y tiramina (Leuschner *et al.*, 1998).

En el grupo de trabajo del laboratorio S-132 de la Universidad Autónoma Metropolitana, Campus Iztapalapa se han aislado distintas BAL procedentes de diversos productos cárnicos (chorizo tipo

español, peperoni, jamón y salchicha) y que hasta el momento no han sido identificadas. De igual manera no se ha evaluado el potencial biotecnológico que pueden llegar a presentar estas cepas aisladas. Por lo tanto, este proyecto pretende identificar molecularmente cada una de las BAL aisladas y detectar la posible actividad enzimática en diferentes niveles celulares; extracelular, intracelular y restos de membrana. En estudios recientes, se ha demostrado que los sistemas proteolíticos por parte de las BAL difieren en los distintos niveles celulares, esto se debe a la presencia de enzimas que se caracterizan por tener distinto peso molecular y condiciones de catálisis ante ciertos macrocomponentes (proteínas, grasas, etc.) que existen en los productos cárnicos madurados y/o fermentados (Tabla 3), por ello es de suma importancia evaluar las actividades antes mencionadas con la finalidad de localizar actividad enzimática con interés biotecnológico.

Tabla 3. Uso y aplicación de BAL en alimentos

Microorganismo	Extracto	Uso en alimentos	Condiciones	Actividad enzimática
<i>L. curvatus</i>, <i>L. sakei</i> (Fadda et al., 1999; Scolari y Vescovo, 2004)	Células enteras y sobrenadantes	Salchichas fermentadas	40 días de maduración y secado a T(25°C)	Inhibición de bacterias patógenas al final de la maduración
<i>S. xylosus</i> y <i>L. plantarum</i> (Casaburi et al., 2007)	Células enteras	Salchichas fermentadas	38 días de maduración y secado a T(25°C)	Formación de ácidos grasos libres por hidrólisis de TAG al inicio de maduración
<i>L. curvatus</i> y <i>L. sakei</i> (Sanz et al., 1999)	Sobrenadantes	Extractos miofibrilares	96 h de incubación a T(37°C)	Hidrólisis inicial de proteínas miofibrilares que generan péptidos
<i>Enterococcus</i>, <i>Lactococcus</i> y <i>Pediococcus</i> (Galgano et al., 2009)	Células enteras	Embutidos contaminados por AB	24 h de incubación a 25°C	Descarboxilación de lisina e histidina
<i>L. plantarum</i> y <i>P. acidilactici</i> (Callejón et al., 2013)	Sobrenadante	Vinos	24 h de incubación a T(28°C)	Multicobre oxidasa y Amino oxidasa

3. HIPÓTESIS

Si las BAL existentes de distintos productos cárnicos poseen efecto antimicrobiano y actividad enzimática (lipolítica, proteolítica, descarboxilasa y oxidasa), entonces podremos emplear sustratos específicos para detección y localización de las actividades enzimáticas de los distintos géneros de BAL previamente identificados.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las diferentes actividades enzimáticas a nivel intracelular (citosol), extracelular (extracto crudo libre de células) y de los restos de membrana de 18 cepas que fueron aisladas de distintos productos cárnicos.

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las dieciocho BAL aisladas de distintos productos cárnicos mediante la amplificación del gen 16S del ADNr.
- Detectar la actividad antimicrobiana y la posible actividad lipolítica, proteolítica, descarboxilasa y oxidasa de las cepas.
- Localizar actividades enzimáticas en las fracciones extracelular, intracelular y en restos de membrana.

5. ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO

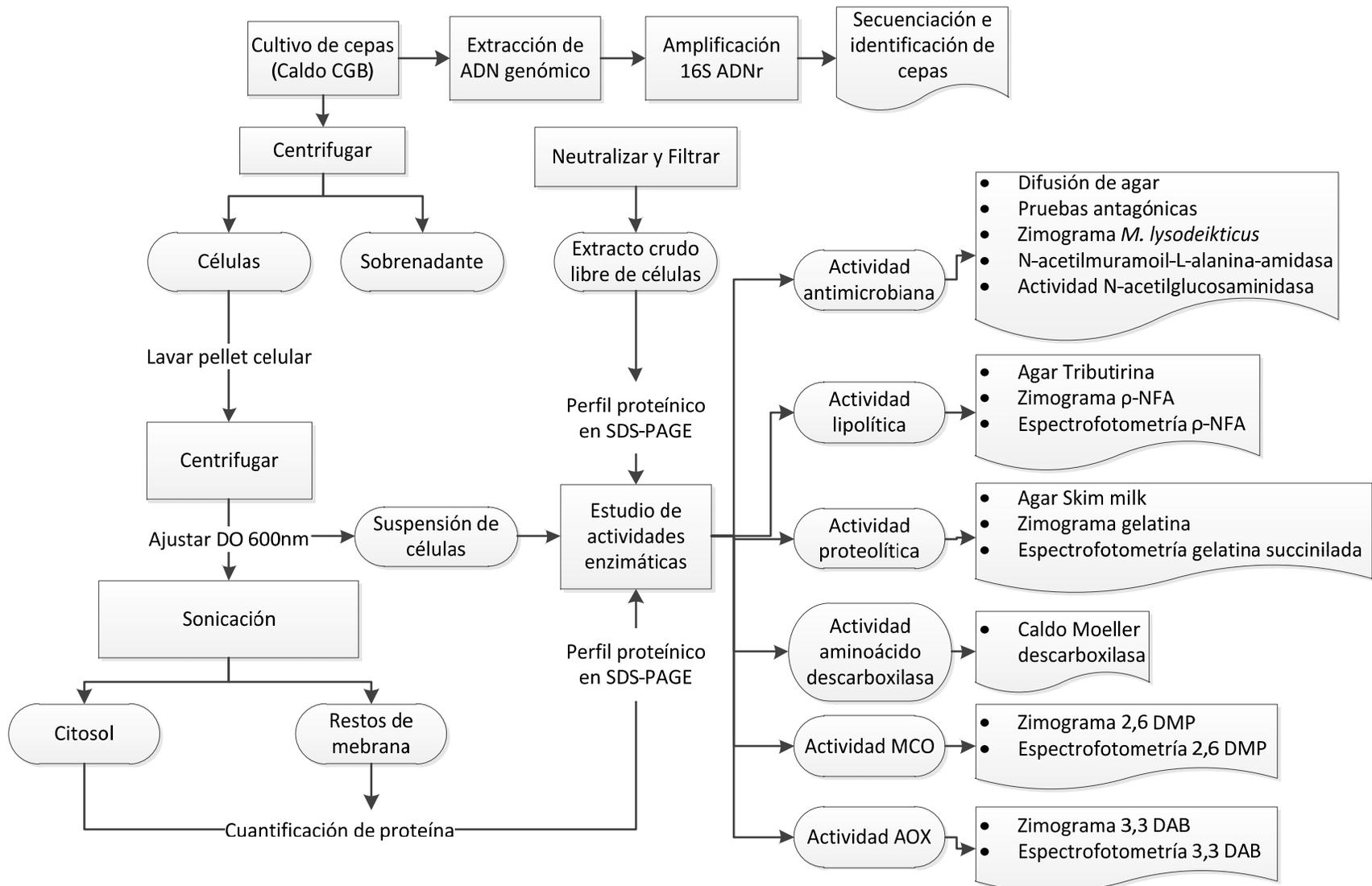


Figura 6. Diagrama de trabajo experimental

6. METODOLOGÍA

Cultivo de cepas aisladas. Las BAL utilizadas en esta investigación fueron aisladas por el grupo de trabajo a partir de diferentes productos cárnicos. La reactivación de las cepas se realizó en medio CGB (Caldo Caseína-Glucosa) al 1.0 %, incubando 12 h a 37°C en condiciones estáticas (Craft, IFA-1400 ID, Ciudad de México, México).

Identificación de microorganismos aislados. De los cultivos se tomaron alícuotas y se realizó la extracción de ADN genómico utilizando el kit Wizard® Genomic DNA purification (Promega, Wisconsin, Estados Unidos). El ADN extraído se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1.0% para verificar la integridad del mismo. Este ADN se utilizó como templado para llevar a cabo la reacción de PCR para la amplificación del gen 16S del ADNr (García-Cano *et al.*, 2014). Finalmente, el producto obtenido de la reacción fue enviado a los laboratorios de Macrogen Inc. en Corea, para su secuenciación y posterior identificación por medio de un alineamiento en una base de datos específica (NCBI-BLAST).

Obtención de las fracciones de estudio. Con la intención de conocer la localización celular de las actividades enzimáticas, se trabajó con: (a) extracto crudo libre de células (proteínas extracelulares), (b) citosol (proteínas intracelulares) y (c) restos de membrana (proteínas de membrana). Para obtener dichas fracciones, los cultivos se centrifugaron a 7,500 rpm durante 15 min a 4°C (Eppendorf 5804R, Hamburgo, Alemania) para separar las células del sobrenadante.

El extracto crudo libre de células se obtuvo neutralizando el sobrenadante con NaOH al 0.1% y fue esterilizado por filtración a través de membranas con un diámetro de poro de 0.45 µm (Merck-Millipore, Missouri, Estados Unidos), acorde con García-Cano *et al.*, (2011). Para la determinación de actividad antimicrobiana por parte de peptidoglucano hidrolasas el extracto crudo libre de células fue liofilizado (Labconco Freezone 2.5, Montreal, Canadá).

Por otra parte, las células se lavaron dos veces con 2 ml de agua destilada estéril, una vez lavado el pellet celular, se preparó una suspensión con una densidad óptica a 600nm (DO_{600nm}) 3.0-3.5, la cual fue sometida a sonicación por 20 ciclos de 5 s de sonicación y 5 s de descanso (Fischer-Scientific 550, Pittsburg, Pennsylvania, USA). Posteriormente, la suspensión celular se centrifugó

a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C (Eppendorf 5415R, Hamburgo, Alemania) para separar el citosol de los restos de membrana (García-Cano *et al.*, 2011).

Cuantificación de proteína. Una vez obtenidas las fracciones correspondientes, se cuantificó proteína por el método de Bradford (1976) empleando un kit comercial (Bio-Rad, California, Estados Unidos) y utilizando como referencia albúmina bovina sérica (BSA, Bio-Rad). Se utilizó un lector de placas para medir la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm (BioTek Synergy HT, Winooski, Vermont, Estados Unidos).

Determinación de perfil proteínico en SDS-PAGE. Para determinar el perfil proteínico de las fracciones de estudio se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en el gel separador y 5% en el gel concentrador en condiciones desnaturalizantes empleando dodecyl-sulfato de sodio (SDS, Bio-Rad) al 10% (Manual Bio-Rad).

Se ajustó la concentración de proteína de las tres fracciones (extracto crudo libre de células, citosol y restos de membrana) para obtener 35 µg de proteína final en el gel. Se tomó una alícuota de 30 µl de extracto enzimático y 10 µl de buffer de carga (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol y 0.1% de azul de bromofenol). Posteriormente, se tomó una alícuota de 35 µl de la mezcla anterior para cargar el gel, el cual se corrió durante 1 h y 30 min a 120V. Una vez concluida la electroforesis, el gel se lavó dos veces con agua destilada con agitación suave durante 30 min., se tiñó con azul de Coomassie (0.1% Coomassie R-250, 45% metanol, 10% de ácido acético glacial y 45% agua destilada v/v) durante 12 h en agitación suave y finalmente el gel se sumergió en solución desteñidora (10% metanol, 10% ácido acético glacial y 80% agua destilada v/v) (Contreras-Cruz, 2013). El peso molecular de las bandas de proteína fue determinado por la comparación con marcadores de alto peso molecular (Bio-Rad).

Estudio de las actividades enzimáticas

Actividad antimicrobiana

Difusión de agar. Para determinar el efecto antibacteriano *in vitro* se realizaron ensayos de difusión de agar contra microorganismos deteriorantes (*Weissella viridescens*, *Leuconostoc mesenteroides*), patógenos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua* y *Salmonella typhimurium*) y exudados de productos (salchicha y salami). Los microorganismos deteriorantes y patógenos

fueron crecidos en CGB al 0.1% de inóculo en condiciones estáticas por 12 h a 37°C. Los exudados se obtuvieron tomando una alícuota a partir de productos que presentaran signos de deterioro como; viscosidad, abombamiento y acidificación.

Se empleó la técnica descrita por García-Cano en 2013 con algunas modificaciones. En la caja Petri se colocaron 15 ml de agar TSB al 1.5%, se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 1 h, posteriormente a la caja se le adicionaron 10 ml de agar MRS al 0.8% con 0.02% de inóculo de microorganismos deteriorantes y patógenos. Para el caso de los exudados se efectuó una dilución de 10^{-1} . Con una pipeta Pasteur se hicieron pozos sobre la doble capa de agar, a los cuales se les adicionó 50 μ l de extracto crudo libre de células, finalmente las cajas se incubaron 24 h a 37°C. Se tomó como positiva la prueba cuando se formó un halo de inhibición alrededor de los pozos, el cual se correlacionó con la concentración de proteína cargada en cada pozo.

Pruebas antagónicas. Se determinó la actividad antagónica mediante la técnica descrita por Guzmán-Trampe en 2012, con algunas modificaciones. Se prepararon cajas Petri de agar TSB al 1.5%, y se hicieron estrías verticales de las cepas en estudio con ayuda de un hisopo estéril, posteriormente se incubaron 12 h a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación se hicieron estrías perpendiculares de los exudados y microorganismos a inhibir (patógenos y deteriorantes) con respecto a la estría vertical, teniendo cuidado de no tocarla con el hisopo, pero quedando muy cerca. Finalmente se incubaron nuevamente durante 12 h. La actividad antagónica es positiva si en las estrías de los microorganismos se observa inhibición en el crecimiento.

Detección de actividad lítica por zimografía. Para determinar la actividad lítica se hicieron geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% con 0.2 % (m/v) de células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) (García-Cano *et al.*, 2014). Una vez efectuada la electroforesis, el gel se lavó tres veces con agua destilada con agitación suave durante 30 min, posteriormente el gel se colocó en una solución amortiguadora renaturalizante de Tris-HCl 100 mM con Tritón X-100 al 1.0 % pH 8.0; se incubó 12 h a 37°C. Finalmente, el gel se lavó nuevamente con agua destilada y se tiñó con una solución de azul de metileno (0.01% azul de metileno, 0.001% KOH) por un lapso de 15 min. La actividad lítica contra *M. lysodeikticus* es positiva si las bandas son translúcidas.

Actividad N-acetilmuramoil-L-alanina-amidasa. Se determinó utilizando como sustrato L-alanina- ρ -nitroanilina hidroclicorada (Sigma-Aldrich), el cual, al ser hidrolizado por la enzima se obtienen como productos L-alanina y ρ -nitroanilina, la cual es un cromofóro de color amarillo que es cuantificable a 390 nm (Yoke-Ming *et al.*, 2015).

En una microplaca se colocaron 50 μ l de muestra (suspensión de células y extracto crudo libre de células), 10 μ l de una solución 1.5 mg/ml de L-alanina- ρ -nitroalanida hidroclicorada y 50 μ l de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.6. Posteriormente se incubó la reacción durante 30 min a 37°C, finalmente se midió la absorbancia a 390 nm en el lector de microplacas. Una unidad se define como: la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1.0 μ mol de L-alanina- ρ -nitroalanina para obtener 1.0 μ mol de ρ -nitroalanina en 1 min a pH 7.6 a una temperatura de 37°C. Adicionalmente se emplearon dos controles negativos; lisozima y lisostafina a una concentración de 1.0 mg/ml.

Actividad N-acetilglucosaminidasa. Se determinó la actividad de PGH utilizando como sustrato 4-Nitrofenil N-acetil- β -D-glucosamina (Sigma-Aldrich), el cual, al ser hidrolizado por la enzima libera ρ -Nitrofenol y N-acetil- β -D-glucosaminida. El ρ -Nitrofenol en medio básico forma el ion ρ -nitrofenolato, el cual es de color amarillo y este puede ser medido espectrofotométricamente a 405 nm (García-Cano *et al.*, 2015).

En una microplaca se colocaron 10 μ l de una solución de 1.5 mg/ml de 4-Nitrofenil N-acetil- β -D-glucosamina, 50 μ l de muestra (suspensión de células y extracto crudo libre de células) y 40 μ l de solución amortiguadora de citrato de sodio 100 mM pH 4.8. Posteriormente se incubó la reacción a durante 40 min a 37°C, finalmente se detuvo la reacción agregando 100 μ l de una solución de carbonato de sodio 140 mM y se midió la absorbancia a 405 nm en el lector de microplacas. Una unidad se define como: la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol de 4-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminida a ρ -nitrofenol y N-acetil- β -D-glucosaminida en 1 min a pH 4.8 a una temperatura de 37°C. Adicionalmente se empleó como control positivo β -N-acetilglucoamidasa (*Canavalia ensiformis*, Sigma-Aldrich) en una concentración de 10 μ g/ml y como control negativo a la lisozima 10 μ g/ml.

Actividad lipolítica

Actividad lipolítica utilizando tributirina al 1.0%. En una caja Petri se colocaron 20 ml de agar cuenta estándar (Bioxon, Nueva Jersey, Estados Unidos) adicionado con tributirina (Sigma-Aldrich) al 1.0%. Una vez solidificado se hicieron pozos con una pipeta Pasteur estéril y se colocaron 40 μ l de muestra (cultivo, suspensión de células y extracto crudo libre de células), finalmente las placas se incubaron 48 h para su revelado. Una zona clara alrededor del pozo indicó actividad positiva (Bermúdez-García, 2010). Se empleó como control positivo *Bacillus pumilus* GMA1 (cepa proporcionada por la Dra. Peña, Facultad de Química, UNAM).

Detección de actividad lipolítica por zimografía empleando α -NA (acetato de α -naftilo). Se determinó en geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes. Una vez terminada la electroforesis, el gel se lavó con un amortiguador de fosfato de sodio 0.05 M pH 7.2 y se incubó en un amortiguador de fosfato 0.05 M renaturalizante con 0.5% de Tritón X-100 durante 12 h, posteriormente se lavaron los geles con agua destilada 3 veces durante 10 min. Finalmente se agregó una solución de α -NA durante 30 min a 37°C. Transcurrido este tiempo, se agregó una solución de FR (Fast-Red, Sigma-Aldrich) con la cual se reveló la actividad enzimática como una banda de color marrón. El gel se guardó en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.05 M pH 7.2 durante 12 h a 4°C para seguir desarrollando la coloración marrón (Bermúdez-García, 2010).

Detección de actividad lipolítica por espectrofotometría empleando p -NFA (acetato de p -nitrofenilo). Se determinó empleando p -NFA como sustrato, ya que al presentar hidrólisis por medio de lipasas el p -NFA genera p -nitrofenol, el cual en condiciones alcalinas produce el ión p -nitrofenolato el cual puede cuantificarse a una absorbancia de 410 nm presentando un color amarillo. En esta técnica se empleó una curva patrón de p -Nitrofenol, partiendo de una solución stock de 40 μ g/ml en un intervalo de 0-32 μ g/ml.

En una microplaca se colocaron 50 μ l de solución A, 10 μ l de muestra (suspensión de células y extracto crudo libre de células), 115 μ l de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.2. Se midió la absorbancia inicial ($t_{0 \text{ min}}$) a 410 nm, posteriormente se incubó la reacción durante 1 h a 37°C, transcurrido el tiempo se agregó 50 μ l de una solución 0.4 N de Na_2CO_3 pH 8.5, la reacción se agitó durante 1 min, finalmente se midió la absorbancia final ($t_{60 \text{ min}}$) a 410 nm (Zuñiga-

Rodríguez, 2004). Una unidad se define como la cantidad necesaria de enzima para hidrolizar 1 μ mol de p-NFA en 1 min a pH 7.2 a una temperatura de 37°C. Adicionalmente se empleó como control positivo una solución de lipasa porcina pancreática (Sigma-Aldrich) a una concentración de 15 mg/ml.

Con la finalidad de descartar el color del extracto crudo libre de células, se empleó un blanco el cual consistió en 190 μ l de amortiguador y 10 μ l de extracto.

Solución A: 18 mg de p-NFA/ml en metanol, tomar una alícuota de solución anterior y llegar a marca de aforo de 10 ml en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.2 (protocolo tomado de Sigma-Aldrich N8130).

Actividad proteolítica

Actividad proteolítica empleando caseína. En una caja Petri se agregaron 20 ml de agar skim milk (Difco, Nueva Jersey, Estados Unidos) al 1.0%. Una vez que solidificó el medio se hicieron pozos con una pipeta Pasteur estéril y se colocaron 40 μ l de muestra (cultivo, suspensión de células y el extracto crudo libre de células), finalmente las placas se incubaron 48 h para su revelado. Una zona clara alrededor del pozo indicó actividad positiva. Se empleó como control positivo a *Bacillus pumilus* GMA1.

Detección de actividad proteolítica por zimografía empleando gelatina. Se realizaron geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes adicionado con gelatina al 0.1%. Una vez efectuada la electroforesis, el gel se lavó dos veces con agua destilada por 30 min en una solución de Tritón X-100 2.5%. Posteriormente se incubó 12 h a 37°C en una solución amortiguadora renaturalizante que contenía 50 mM Tris-HCl pH 7.6 en agitación suave. Finalmente, el gel se tiñó con azul de Coomassie R-250 y se destiñó con una solución (10% metanol, 10% ácido acético glacial y 80% agua destilada). La actividad proteolítica es positiva cuando se forma una zona clara en contra de un fondo azul (Casales-Cabrera, 2012).

Detección de actividad proteolítica por espectrofotometría empleando gelatina succinilada. Se determinó empleando gelatina, la cual fue succinilada (con anhídrido succínico) en una concentración de 200 μ g/ml. La gelatina succinilada se preparó disolviendo 200 mg de gelatina (Merck) en 10 ml de una solución amortiguadora de borato de sodio 50 mM a pH 8.5,

posteriormente se adicionó lentamente la misma cantidad de anhídrido succínico manteniendo el pH entre 8.0-8.5 con una solución al 0.1% de NaOH (Casales-Cabrera, 2012).

La solución anterior se colocó en una membrana de diálisis Spectra/Por7 (Spectrumlabs, California, USA) de 1 kDa, una vez cerrada la membrana, se colocó en una solución amortiguadora de boratos la cual se mantuvo en agitación constante 12 h a temperatura ambiente. Concluida la diálisis, la gelatina succinilada se almacenó en un tubo de plástico a 4°C (Baragi *et al.*, 2000). Finalmente se realizó la cuantificación de proteína por el método de Bradford.

En una microplaca se añadieron 175 µl de gelatina succinilada y 50 µl de muestra (extracto crudo libre de células, citosol y restos de membrana), se incubó la reacción durante 30 min a 37°C, posteriormente se agregaron 75 µl de 2, 4, 6-TNBS (ácido 2,4,6-Trinitrobenzelsulfónico, Sigma-Aldrich) al 0.03%. Finalmente se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm en el lector de placas (Casales-Cabrera, 2012). Adicionalmente se empleó como control positivo 10 µl de una solución de tripsina con una concentración de 10 µg/ml, 40 µl de solución amortiguadora de boratos y 175 µl de gelatina succinilada. Finalmente se midió la absorbancia en las mismas condiciones.

Actividad aminoácido descarboxilasa

Detección de actividad aminoácido descarboxilasa en caldo diferencial. En tubos de plástico de 1.5 ml se adicionaron 900 µl de medio Moeller descarboxilasa base (Merck) y 100 µl de inóculo. Los tubos se incubaron 12 h a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo, en otros tubos se adicionaron 100 µl del cultivo fresco base y 900 µl de medio base adicionado con los siguientes L-aminoácidos; arginina, ornitina, tirosina, histidina y lisina en una concentración del 1.0% cada uno. Finalmente, los tubos se incubaron 12 h a 37°C. Se considera la actividad aminoácido descarboxilasa positiva cuando el medio presenta un vire de color púrpura o violeta, el resultado es negativo cuando el vire es de color amarillo. Se empleó como microorganismo control a *Morganella morganii* (Universidad Autónoma Metropolitana, Campus Iztapalapa).

Actividad oxidasa

Obtención de las fracciones de estudio. Se preparó un medio MRS-modificado como se describe a continuación: se adicionó L-cisteína 0.5 g/L, histamina, tiramina y putrescina en una concentración de 10 mg/L respectivamente (Callejón *et al.*, 2014). Se inocularon las cepas de estudio en dicho medio y se incubaron a 28°C durante 12 h en condiciones estáticas, posteriormente el extracto crudo libre de células se obtuvo por centrifugación a 8,500 rpm por 15 min a 4°C y se ajustó el pH a 7.0, se esterilizó por filtración con membrana de 0.45µm. La fracción celular se obtuvo lavando dos veces el pellet celular con 2.0 ml de agua estéril, finalmente se ajustó la DO_{600nm} 3.0-3.5.

Detección de actividad MCO por zimografía empleando 2,6 DMP (2,6 Dimetoxifenol). Se realizaron geles de poliacrilamida al 10% en condiciones nativas. Una vez efectuada la electroforesis el gel se colocó en una solución amortiguadora de acetato de sodio 100 mM pH 4.0 con 10 mM de 2,6 DMP (Sigma-Aldrich) durante 5 min a temperatura ambiente en agitación suave, posteriormente la solución fue descartada y se agregó una nueva solución amortiguadora acondicionada con 1 mM de sulfato de cobre. Se considera la actividad MCO positiva cuando se forma una banda de color amarillo-naranja (Callejón *et al.*, 2014).

Detección de actividad MCO por espectrofotometría. En una microplaca se agregaron 167 µl de muestra (suspensión de células y extracto crudo libre de células), 333 µl de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.2 y una solución amortiguadora de fosfatos adicionada con 75 mM de 2,6 DMP (Callejón *et al.*, 2013). Posteriormente se incubó la reacción durante 1 h a 37°C. Finalmente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 470 nm en el lector de placas. Para la detección de actividad en suspensión de células la reacción se centrifugó durante 1 min a 14,000 rpm con la finalidad de descartar la densidad óptica de las células, por último se midió la absorbancia. Una unidad se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 µmol de 2,6 DMP en 2 h a una temperatura de 37°C. Adicionalmente se empleó como control positivo una lacasa de *Myceliophthora thermophila* (López-Cruz *et al.*, 2006) (Enzima proporcionada por el Dr. López Cruz, Universidad Autónoma Metropolitana, Campus Iztapalapa).

Detección de actividad AOX por zimografía empleando 3,3 DAB (3,3 Diaminobenzidina). Se realizaron geles de poliacrilamida al 10% en condiciones nativas. Una vez efectuada la electroforesis el gel se colocó en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.4 acondicionada con 1 mM de histamina, tiramina y putrescina durante 15 min a temperatura ambiente, posteriormente la solución amortiguadora fue descartada y se adicionó una nueva solución amortiguadora acondicionada con 1000 U/L de horseradish peroxidasa tipo IV y 0.25 mM de 3,3 DAB (Sigma-Aldrich). Se considera la actividad AOX positiva cuando se forma una banda de color café (Callejón *et al.*, 2014).

Detección de actividad AOX por espectrofotometría. En una microplaca se agregaron 450 µl de muestra (extracto crudo libre de células y células) por separado, 100 µl de solución amortiguadora de fosfato 50 mM pH 7.2 con histamina, tiramina y putrescina 10 mM, posteriormente se incubó la mezcla durante 30 min a 37 °C, una vez transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron 50 µl de una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM que contiene 1000 U/L de horseradish peroxidasa tipo IV y 0.50 mM 3,3 DAB (Callejón *et al.*, 2014) la mezcla se incubó durante 2 h a 37°C. Finalmente se midió la absorbancia a 460 nm. Para la detección de actividad en suspensión de células, previamente la reacción se centrifugó durante 1 min a 14,000 rpm con la finalidad de descartar la densidad óptica de las células, por último se midió la absorbancia. Una unidad se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 µmol de 3,3 DAB en 2 h a 37°C. Adicionalmente se empleó una amino oxidasa de cerdo (Sigma-Aldrich) como control positivo.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de microorganismos aislados. En la Tabla 4 se muestran las 18 cepas aisladas de productos cárnicos por parte del grupo de trabajo, las cuales fueron identificadas con un porcentaje mayor al 98%. Se identificaron géneros como; *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Weissella*. Las cepas *E. faecium* MXVK 29, *E. faecium* UAMI-3 y *P. acidilactici* MXVK 133 se identificaron previamente en el laboratorio S-132 de la UAM-Iztapalapa y fueron consideradas en este estudio para la evaluación de las actividades enzimáticas.

Tabla 4. Identificación de microorganismos de diversos productos cárnicos

Número de cepa aislada	Fuente *	Nombre del microorganismo	Morfología	Producción de gas**	% de identidad***	Nomenclatura asignada
1	JP	<i>Lactobacillus sakei</i>	Bacilos	+	100	UAM-MGJP1
2	S	<i>Lactobacillus curvatus</i>	Bacilos	-	98	UAM-MGS1
3	S	<i>Enterococcus faecium</i>	Cocos	-	100	UAM-MGS1
4	S	<i>Weissella viridescens</i>	Cocos en racimos	+	100	UAM-MGS1
5	CE	<i>Lactobacillus sakei</i>	Bacilos	+	99	UAM-MGCE1
6	S	<i>Weissella viridescens</i>	Cocos en racimos	+	100	UAM-MGS2
7	JP	<i>Weissella viridescens</i>	Cocos en racimos	+	100	UAM-MGJP1
8	S	<i>Weissella viridescens</i>	Cocos en racimos	+	100	UAM-MGS3
9	JP	<i>Weissella viridescens</i>	Cocos en racimos	+	100	UAM-MGJP2
10	UAM-I	<i>Enterococcus faecium</i> MXVK 29	Cocos	-	PI	UAM-MXVK29
11	CE	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Cocos	-	100	UAM-MGCE1
12	CE	<i>Pediococcus lolii</i>	Cocos	-	100	UAM-MGCE1
13	UAM-I	<i>Enterococcus faecium</i> UAMI-3	Cocos	-	PI	UAM-I3
14	P	<i>Pediococcus lolii</i>	Cocos	-	100	UAM-MGP1

15	CE	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Cocos	-	99	UAM-MGCE1
16	P	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Cocos	-	100	UAM-MGP1
17	P	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Cocos	-	100	UAM-MGP2
18	UAM-I	<i>Pediococcus acidilactici</i> MXVK 133	Cocos	-	PI	UAM-MXVK133

*Fuente de aislamiento: Jamón picado (JP), Salchicha (S), Chorizo tipo español (CE), Peperoni (P), Colección UAM-I lab. S-132(UAM-I). **Producción de gas: positivo (+), negativo (-).***% de identidad. Previamente identificado (PI).

De los microorganismos aislados de distintos productos cárnicos, se identificaron 18 cepas, de las cuales; dos corresponden a *L. sakei*, una *L. curvatus*, tres a *E. faecium*, cinco a *W. viridescens*, cinco a *P. acidilactici* y dos a *P. lolii* (Tabla 4). Cabe mencionar que los resultados de identificación presentaron un %de identidad mayor al 98%, lo cual nos indica que el valor de expectancia para cada identificación es cercano a cero, por tanto los resultados son confiables. Una vez identificadas las cepas de estudio fueron evaluadas para su detección y localización de actividad enzimática.

Perfil proteínico en SDS-PAGE. Una vez obtenidas las fracciones de estudio y determinada la concentración de proteína se realizaron geles al 10% de acrilamida con SDS, para obtener el perfil proteínico. La cantidad de proteína en cada carril se homologó a 35 µg de proteína total por pozo. En la Figura 7 se muestra el perfil de proteínas de cada fracción, el cual es distinto para cada microorganismo, lo que indica la diversidad de proteínas en los diferentes niveles celulares (Tabla 5).

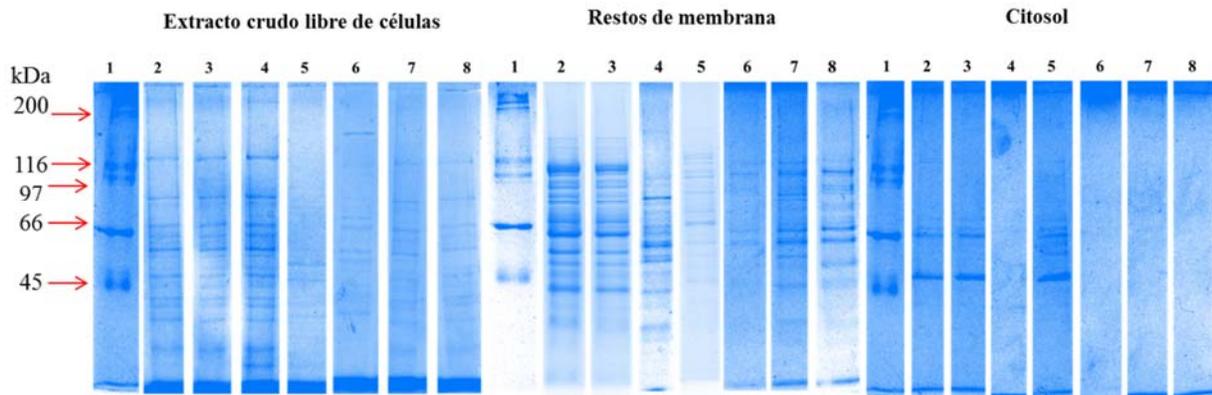


Figura. 7. Perfil proteínico de las fracciones de estudio. Carril 1, marcador de peso molecular alto; carril 2, *L. sakei*; carril 3, *P. lolii*; carril 4, *E. faecium* UAMI-3; carril 5, *W. viridescens*; carril 6, *E. faecium* MXVK 29; carril 7, *P. acidilactici*; carril 8, *P. acidilactici* MXVK 133.

Detección y localización de actividad enzimática

Lactobacillus

Actividad antimicrobiana

Se identificaron las siguientes BAL pertenecientes al género *Lactobacillus*: *Lactobacillus sakei* (1. UAM-MGJP1 y 5. UAM-MGCE1) y *Lactobacillus curvatus* (2. UAM-MGS1). *L. sakei* presentó actividad antimicrobiana contra todos los microorganismos patógenos; con respecto a los microorganismos deteriorantes solo presentó actividad contra *L. mesenteroides* y bacterias presentes en exudados de salami. Para el caso de *L. curvatus*, se reportó actividad antimicrobiana contra todos los microorganismos indicadores (patógenos y deteriorantes) (Tabla 5), Scolari y Vescovo (2004) reportaron actividad antimicrobiana de células enteras de *L. sakei* contra; *S.*

aureus, *E. coli*, *S. typhimurium* y *L. innocua*. Con respecto a extractos liofilizados de *Lactobacillus*, se ha reportado actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* en salchichas (Ünlü *et al.*, 2016).

Comparando los resultados de actividad antimicrobiana específica y actividad antagónica (Tabla 5 y Figura 8) observamos que hubo mayor efecto antimicrobiano por parte de *L. sakei* contra las siguientes cepas: *L. innocua*, *S. typhimurium*, *L. mesenteroides*, *E. coli*, *S. aureus* y exudados de salchicha y salami. Por otra parte, *L. curvatus* presentó menor efecto antimicrobiano ya que no tuvo actividad contra *L. mesenteroides* y *W. viridescens*.

Con respecto a la actividad de PGH, se detectó actividad N-acetilmuramoil-L-alanina-amidasa en mayor cantidad en suspensión de células de *L. sakei*. En la fracción extracelular se detecta la misma actividad para las 3 cepas de *Lactobacillus* (Figura 8b). También se detectó actividad N-acetilglucosaminidasa en ambas fracciones celulares. Para el caso de suspensión de células se detectó mayor actividad fue de *L. sakei*. En extracto crudo libre de células la mayor actividad por parte de *L. sakei* 1. UAM-MGJP1. En ambas fracciones la actividad N-acetilglucosaminidasa de *L. curvatus* fue mínima y casi la misma. (Figura 8b y 8c).

Tabla 5. Detección de Actividad antagónica de *Lactobacillus* contra microorganismos patógenos y deteriorantes en caja Petri de agar TSB.

		<i>L. sakei</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. sakei</i>
		1. UAM-MGJP1	2. UAM-MGS1	5. UAM-MGCE1
Patógenos	<i>S. aureus</i>	-	+	+
	<i>E. coli</i>	-	+	+
	<i>S. typhimurium</i>	+	+	+
	<i>L. innocua</i>	+	+	+
Deteriorantes	<i>W. viridescens</i>	-	+	-
	<i>L. mesenteroides</i>	+	+	-
	<i>Exudado salami</i>	+	+	-
	<i>Exudado salchicha</i>	-	+	-

*Positivo (+), Negativo (-)

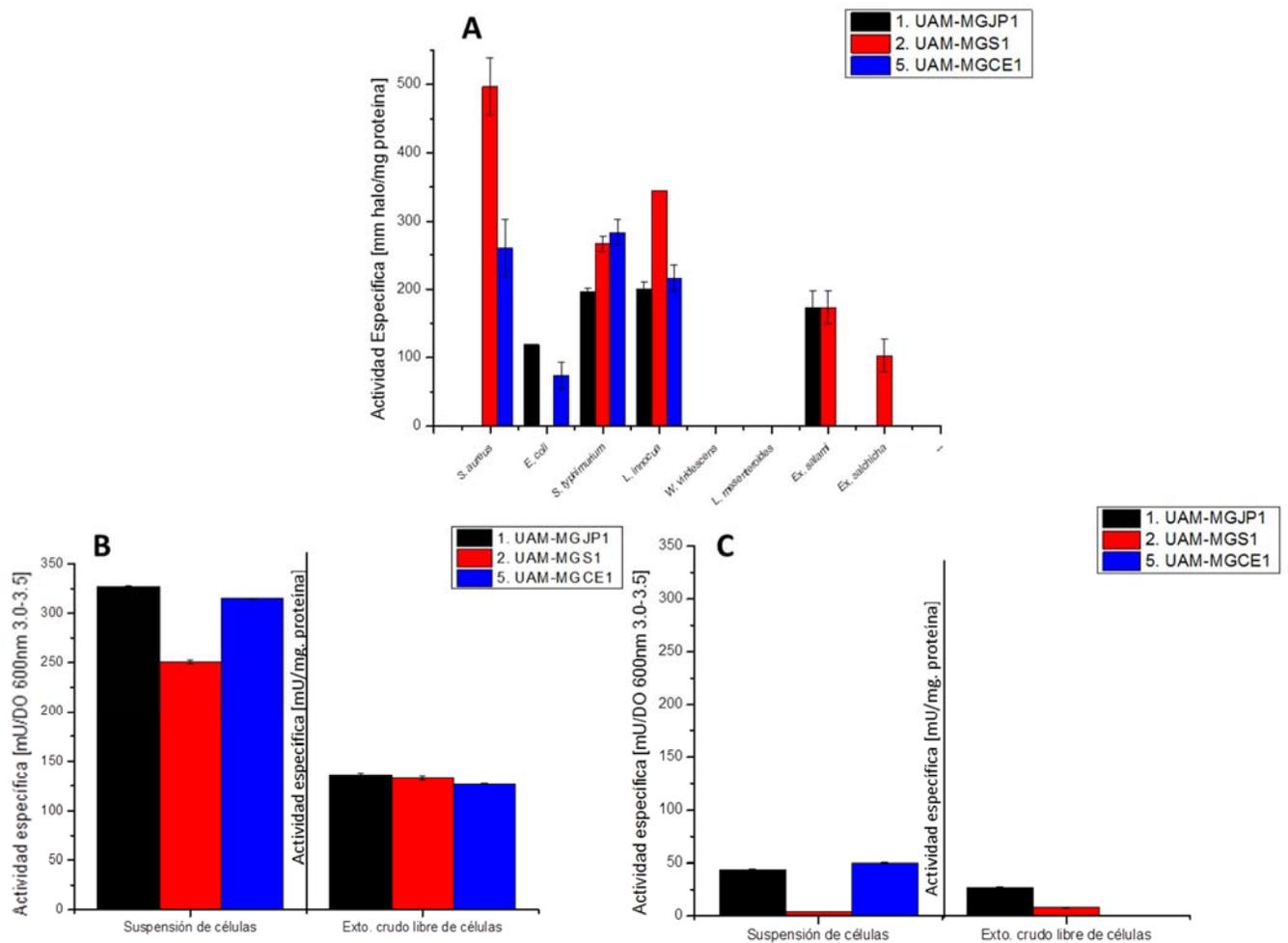


Figura 8. Actividad antimicrobiana del género *Lactobacillus*. 8a, actividad antimicrobiana específica en extracto crudo libre de células; 8b, actividad N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa específica en suspensión de células y extracto crudo libre de células; 8c, actividad N-acetilglucosaminidasa específica en suspensión de células y extracto crudo libre de células.

L. sakei presentó actividad lítica contra *M. lysodeikticus* en 110 y 85 kDa en la fracción de restos de membrana (Figura 9). Se han reportado proteínas con actividad lítica del género *Lactobacillus* en 80 y 70 kDa, principalmente por la acción de N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (Najjari *et al.*, 2016). Con base en reportado anteriormente, la banda de actividad lítica que observamos en la Figura 9 (85 kDa aprox.) probablemente pertenezca a una N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa, la cual está adherida en la membrana celular de *L. sakei*.

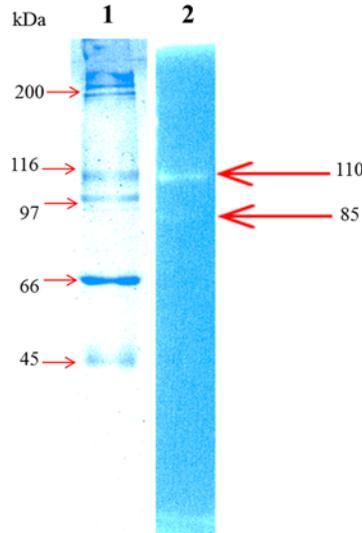


Figura 9. Actividad lítica en gel de poliacrilamida con 0.2% de *M. lysodeikticus*. Carril 1, marcador de peso molecular alto; carril 2, fracción de restos de membrana de *L. sakei*.

Con base a los resultados anteriores la actividad antimicrobiana del género *Lactobacillus* contra microorganismos indeseables es considerable, por ello, la presencia de *Lactobacillus* en distintos productos madurados y/o fermentados es fundamental para la bioconservación de los mismos, por lo que es favorable adicionar cepas del género *Lactobacillus* como cultivos iniciadores para inhibir cepas deteriorantes y/o patógenas en productos como; salchichas y/o salamis. El efecto antimicrobiano se atribuye a las enzimas y/o ácidos orgánicos producidos por dicho género, los cuales han sido estudiados en salchichas fermentadas y en embutidos madurados como salamis y/o chorizos, donde la adición de *L. curvatus* repercute en la inhibición de bacterias patógenas y deteriorantes, como *Listeria* y *Leuconostoc*, respectivamente (Flores y Toldrá, 2011).

Actividad lipolítica

Lactobacillus además de tener actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas y deteriorantes también posee actividad lipolítica, ya que presentó halos de hidrólisis en cajas Petri con agar tributirina al 1.0%. En la tabla 6 se enlistan los resultados de actividad en tres fracciones distintas; cultivo, es decir, el medio de cultivo crecido y fresco; suspensión de células y extracto crudo libre de células. Únicamente se detectó actividad en cultivo y en extracto crudo libre de células, por lo que las enzimas lipolíticas para hidrolizar la tributirina del medio se encuentran en el medio extracelular de *Lactobacillus* (Figura 10).

Tabla 6. Detección de Actividad lipolítica de *Lactobacillus* en caja Petri con agar tributirina al 1.0%.

<i>Lactobacillus</i>	Cultivo	Suspensión de células DO _{600nm} 3.0-3.5	Extracto crudo libre de células
1. UAM-MGJP1	+	-	+
2. UAM-MGS1	+	-	+
5. UAM-MGCE1	+	-	+

*Positivo (+), Negativo (-).

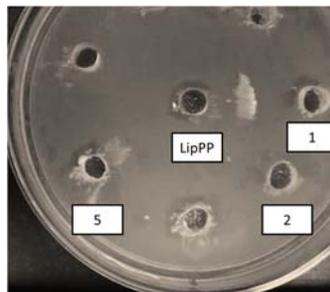


Figura 10. Halos de actividad lipolítica en caja Petri de agar tributirina al 1.0% de la fracción extracto crudo libre de células. Lipasa pancreática porcina (LipPP) empleada como control positivo, *L. sakei* (1. UAM-MGJP1 y 5. UAM-MGCE1) y *L. curvatus* (2. UAM-MGS1).

Por otra parte, se evaluó la actividad lipolítica empleando ρ -NFA por espectrofotometría. Se detectó actividad lipolítica contra ρ -NFA en la suspensión de células por parte de las 3 cepas de *Lactobacillus*; con respecto a la fracción extracelular se detectó actividad por parte de la cepa 5. UAM-MGCE1. Las cepas 2. UAM-MGS1 no presentó actividad en dicha fracción y 1. UAM-MGJP1 presentó 50% menos actividad con respecto a la fracción anterior (Figura 11). Con base a lo anterior, se infiere que la actividad lipolítica contra ρ -NFA de *L. sakei* (5. UAM-MGCE1) se encuentra en el medio extracelular. *L. curvatus* (2. UAM-MGS1) no posee actividad en el medio extracelular. Posteriormente se evaluó la actividad mediante zimografía contra α -NA como sustrato, donde se detectó una banda de actividad lipolítica en 200 kDa aprox., en la fracción extracelular de *L. sakei* (Figura 12).

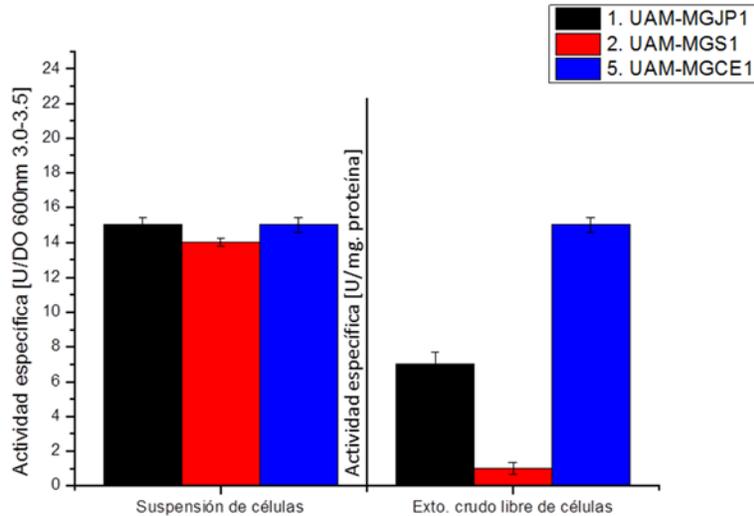


Figura 11. Actividad lipolítica específica del género *Lactobacillus* en células y extracto crudo libre de células.

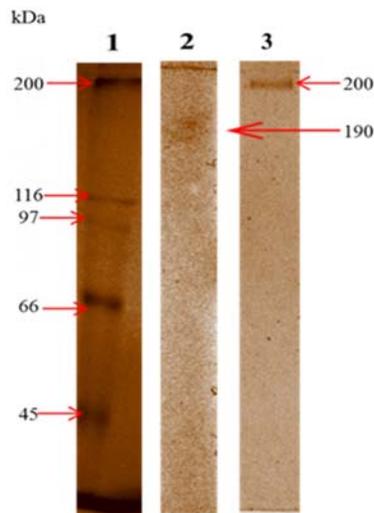


Figura 12. Actividad lipolítica en gel de acrilamida al 10% en condiciones desnaturizantes; carril 1, marcador de peso molecular alto; carril 2, lipasa porcina pancreática; carril 3, extracto crudo libre de células de *L. sakei* 5. UAM-MGCE1.

Lactobacillus es un género de BAL con característica de cultivos iniciadores y con actividad lipolítica, el cual, se ha aislado de alimentos fermentados ricos en grasa como lácteos y embutidos. Se ha reportado que la expresión de enzimas lipolíticas está en función del tipo y concentración de ácidos grasos presentes en el medio (Hui-Qing *et al.*, 2016). Un aspecto importante de *L. sakei* con respecto a los lípidos, es la producción de catalasa, ya que propicia un efecto antioxidante que

previene la oxidación lipídica en productos cárnicos fermentados, por lo tanto, *Lactobacillus* es importante en la actividad lipolítica para la producción de ácidos grasos libres como la protección de la oxidación de los mismos (Flores y Toldrá, 2011). Torres *et al.*, (2014) reporta actividad de lipasas halotolerantes de *L. plantarum*, por lo que la producción y acción catalítica de lipasas está en función de ingredientes como NaCl y de las condiciones de maduración. Enver-Baris *et al.*, (2014) reportaron el efecto de la actividad lipolítica en salchichas fermentadas al adicionar cultivos iniciadores de *L. sakei*, esto se atribuye a la cantidad de lipasa producida ya que repercute en las propiedades sensoriales durante el madurado y secado, por lo tanto, tener un cultivo iniciador con uno o más microorganismos lipolíticos aceleran la maduración mejorando considerablemente la calidad de salchichas, salami y chorizos madurados.

Actividad proteolítica

Todas las cepas del género *Lactobacillus* poseen actividad proteolítica en los tres niveles celulares (cultivo, suspensión de células y extracto crudo libre de células) ya que presentaron halos de hidrólisis en cajas Petri de agar skim milk al 0.1% (Figura 13).

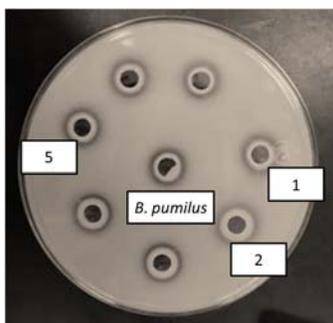


Figura 13. Halos de actividad proteolítica del medio de cultivo en caja de agar al 0.1% de skim milk. *B. pumilus* empleado como control positivo, *L. sakei* (1. UAM-MGJP1 y 5. UAM-MGCE1) y *L. curvatus* (2. UAM-MGS1).

Empleando gelatina succinilada, se detectó únicamente actividad gelanolítica en la fracción extracelular de las distintas cepas de *Lactobacillus*, siendo mayor en *L. curvatus* 2. UAM-MGJP1 y *L. sakei* 5. UAM-MGCE1 respectivamente; en la fracción de restos de membrana se detectó menor actividad y no se detectó actividad por parte de la cepa 5. UAM-MGCE1. En la fracción

citoplasmática no se detectó actividad proteolítica (Figura 14). Por tanto las enzimas proteolíticas de *Lactobacillus* son predominantes en la fracción extracelular.

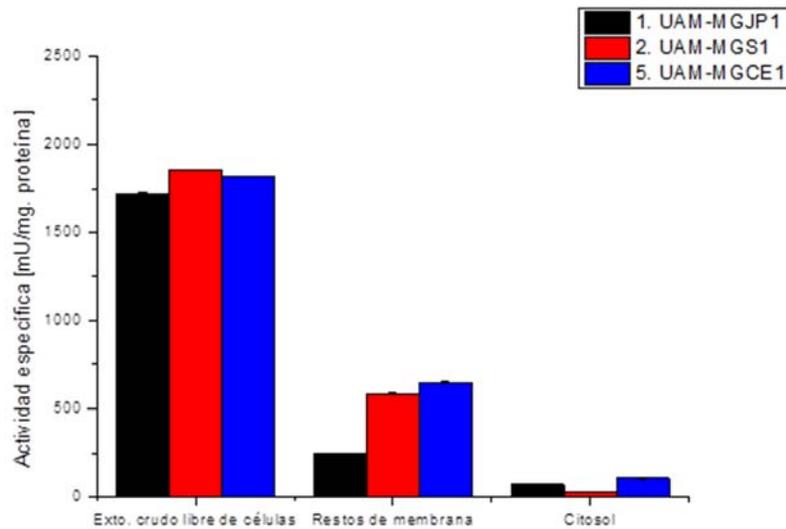


Figura 14. Actividad gelatinolítica específica del género *Lactobacillus* en: Exto. Crudo libre de células, restos de membrana y citosol.

Mediante zimografía empleando gelatina al 0.1% se detectó actividad gelatinolítica en ambas cepas en un peso molecular aproximado de 100 y 81 kDa (Figura 15). Con base a los resultados previos, las proteínas detectadas de *Lactobacillus* corresponden a exopeptidasas reportadas por Hechelmann *et al.*, (1988), las cuales poseen un peso de 100-120 kDa aprox. Dichas exopeptidasas hidrolizan enlaces peptídicos en Pro-Gly en el extremo amino terminal de las proteínas miofibrilares y sarcoplásmicas provenientes de la carne, generando péptidos y aminoácidos libres lo cual repercute en atributos sensoriales como, en la textura, desarrollo de aromas y sabores característicos del madurado (Flores y Toldrá, 2011).

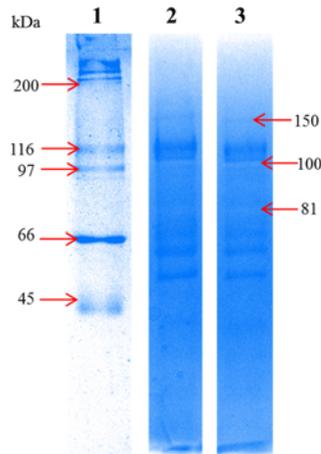


Figura 15. Detección de actividad proteolítica en zimograma de gelatina al 0.1%. Fracción de restos de membrana; carril 1, marcador de peso molecular alto; carril 2, *L. sakei* (5. UAM-MGCE1); carril 3, *L. curvatus* (2. UAM-MGS1).

Actividad aminoácido descarboxilasa

Una vez que las proteasas hidrolizan enlaces peptídicos de las proteínas existentes en los productos cárnicos (proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares), se generan ciertos aminoácidos que son susceptibles a la descarboxilación por parte de BAL. En general, *Lactobacillus* presentó actividad arginina y tirosina descarboxilasa, por lo que son productores de putrescina y tiramina principalmente. *L. sakei* (5. UAM-MGCE1) únicamente puede descarboxilar arginina (Tabla 7). Ambas aminas biógenas son indeseables por su toxicidad y aroma característico, ya que al ser un compuesto de bajo peso molecular heterocíclico y nitrogenado son volátiles y por tanto detectable en concentraciones mínimas con un olor característico a putrefacto (Macrobal *et al.*, 2006). El género *Lactobacillus* es capaz de descarboxilar uno o más aminoácidos libres produciendo tiramina y putrescina principalmente (Galgano *et al.*, 2009). Si se desea emplear *Lactobacillus* como cultivo iniciador se debe considerar la actividad aminoácido descarboxilasa, debido a la formación de AB en los productos cárnicos durante el madurado.

Tabla 7. Detección de actividad aminoácido descarboxilasa por parte de *Lactobacillus*

	<i>L. sakei</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. sakei</i>
Aminoácido	1. UAM-MGJP1	2. UAM-MGS1	5. UAM-MGCE1
Arginina	+	+	+
Ornitina	-	-	-
Tirosina	+	+	-
Histidina	-	-	-
Lisina	-	-	-

*Positivo (+), Negativo (-).

Actividad MCO y AOX

Se detectó MCO en suspensión de células enteras de *L. sakei* (5. UAM-MGCE1) (Figura 17a) mediante espectrofotometría al oxidar el 2,6 DMP. Callejón *et al.*, (2013) reportaron a *L. plantarum* como MCO positivo, por lo que, a pesar de la similitud filogenética existente entre ambas cepas, no fue posible detectar actividad MCO en zimografía de otros *Lactobacillus*.

Se detectó AOX en suspensión de células de *L. sakei* (1. UAM-MGJP1) mediante espectrofotometría al oxidar el 3,3 DAB (Figura 17b). El resto de las cepas presentó poca actividad AOX. No fue posible detectar actividad AOX en zimografía por parte de todos los géneros de *Lactobacillus*.

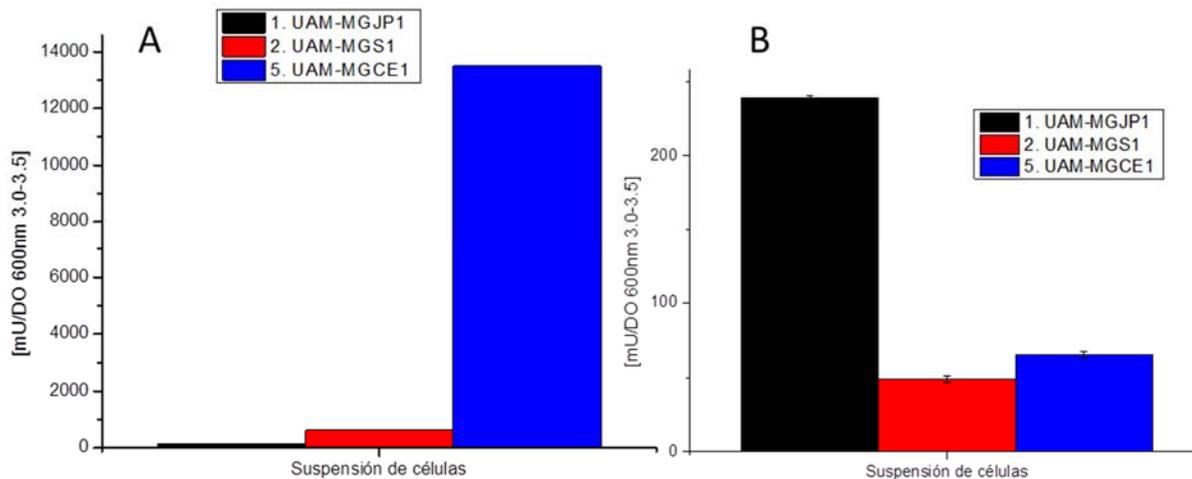


Figura 17. Actividad oxidasa del género *Lactobacillus* en suspensión de células. 17a, actividad MCO específica contra 2,6 DMP; 17b, actividad AOX específica contra 3,3 DAB.

Con base a lo reportado anteriormente, se recomienda emplear *Lactobacillus* como cultivo iniciador para degradar AB que puedan producirse durante el secado y/o madurado de productos cárnicos fermentados.

Pediococcus

Actividad antimicrobiana

Se identificaron las siguientes BAL pertenecientes al género *Pediococcus*: *P. lolii* (12. UAM-MGCE1 y 14. UAM-MGP1) y *P. acidilactici* (11. UAM-MGCE1, 15. UAM-MGCE1, 16. UAM-MGP1, 17. UAM-MGP2 y 18. UAM-MXVK133), las cuales inhibieron a los microorganismos patógenos. Las bacterias deteriorantes, fueron inhibidas de manera considerable con excepción de *L. mesenteroides*, ya que ninguna cepa de *Pediococcus* logró inhibir su crecimiento (Tabla 8); las cepas: 15. UAM-MGCE1, 11. UAM-MGCE1 y 12. UAM-MGCE1 son las que mayor actividad específica antimicrobiana presentaron (Figura 18a). Con respecto a la actividad antagónica, si hubo diferencia en el efecto antimicrobiano, ya que se presentó mayor actividad antimicrobiana por parte de *Pediococcus* frente a los microorganismos patógenos y deteriorantes (Tabla 8 y Figura 18a).

Se detectó actividad de PGH; para el caso de N-acetilmuramoil-L-alanina-amidasa las cepas, 12. UAM-MGCE1, 11. UAM-MGCE1 y 15. UAM-MGCE1 en suspensión de células, y únicamente la

cepa 12. UAM-MGCE1 en exto. Crudo libre de células, por lo que esta PGH de *P. lolii* (12. UAM-MGCE1) se encuentra localizada dentro de la célula y es capaz de salir al medio extracelular. De igual forma se detectó actividad N-acetilglucosaminidasa en las cepas anteriores, solo que en este caso en menor magnitud, de igual forma se detectó actividad en el medio extracelular por parte de *P. lolii* (12. UAM-MGCE1) (Figura 18b y 18c).

Tabla 8. Detección de actividad antagónica de *Pediococcus* contra microorganismos patógenos y deteriorantes en caja Petri de agar TSB.

		<i>P. lolii</i> 12. UAM- MGCE1	<i>P. lolii</i> 14. UAM- MGP1	<i>P.</i> <i>acidilactici</i> 11. UAM- MGCE1	<i>P.</i> <i>acidila</i> <i>ctici</i> 15. UAM- MGC E1	<i>P.</i> <i>acidila</i> <i>ctici</i> 16. UAM- MGP1	<i>P.</i> <i>acidilact</i> <i>ici</i> 17. UAM- MGP2	<i>P.</i> <i>acidila</i> <i>ctici</i> 18. UAM- MXV K133
Patógenos	<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+
	<i>E. coli</i>	+	-	+	+	+	+	+
	<i>S. typhimurium</i>	+	-	+	+	-	-	+
	<i>L. innocua</i>	-	-	-	+	-	+	+
Deteriorantes	<i>W. viridescens</i>	+	-	-	+	-	-	-
	<i>L. mesenteroides</i>	-	-	+	-	-	-	-
	<i>Exudado salami</i>	-	-	-	-	+	-	+
	<i>Exudado salchicha</i>	+	-	+	+	+	-	+

*Positivo (+), Negativo (-)

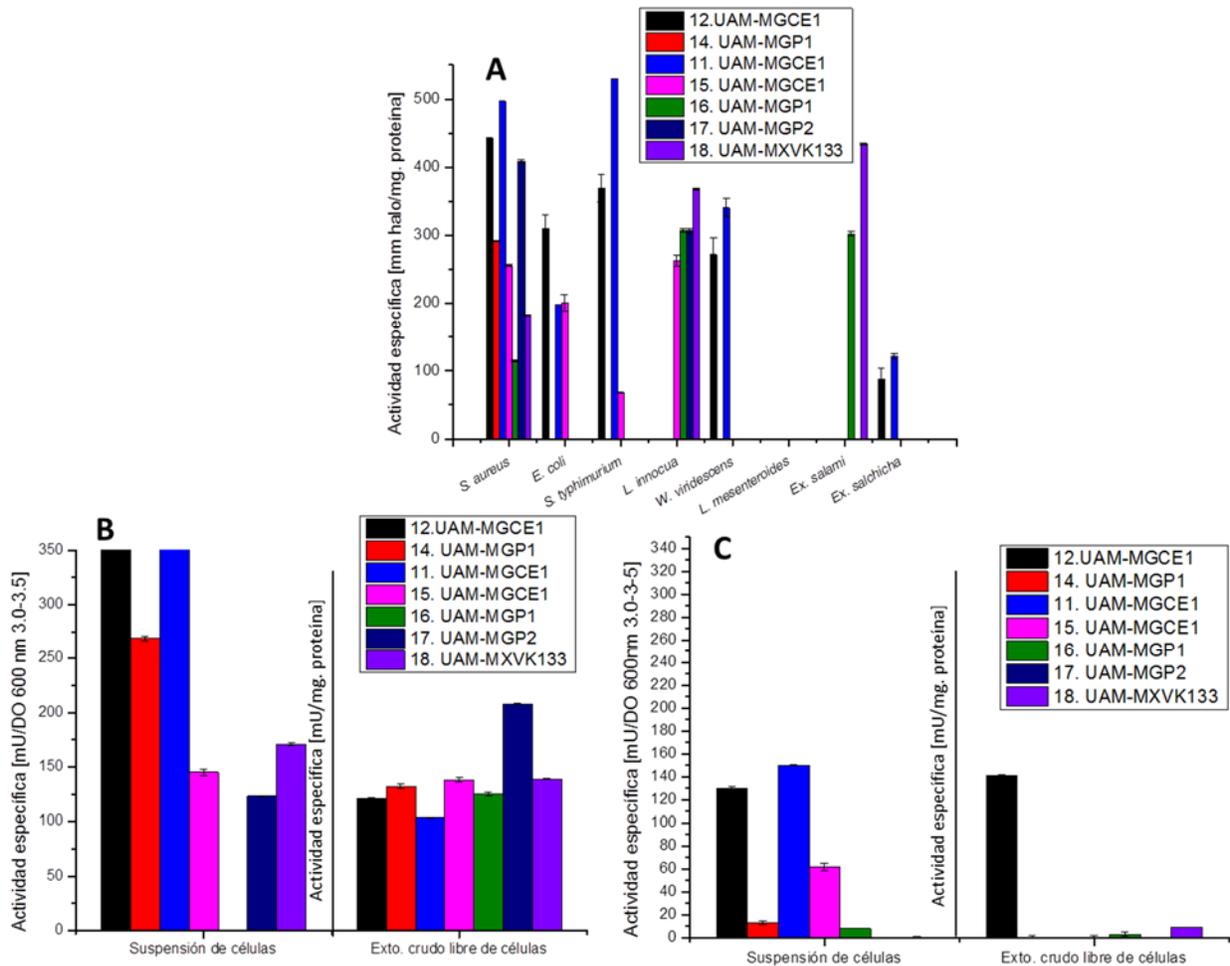


Figura 18. Actividad antimicrobiana del género *Pediococcus*. 18a, actividad antimicrobiana específica en extracto crudo libre de células; 18b, actividad N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa específica en suspensión de células y extracto crudo libre de células; 18c, actividad N-acetylglucosaminidasa específica en suspensión de células y extracto crudo libre de células.

P. acidilactici 11. UAM MGCE1 presentó actividad lítica en 110 kDa aprox. García-Cano (2013) reportó actividad lítica mediante zimogramas contra *M. lysodeikticus* en 99 y 110 kDa en la fracción de proteínas adheridas a membrana, con actividad de N-acetylglucosaminidasa de *P. acidilactici* ATCC 8042, por lo que las bandas detectadas (Figura 19) podrían corresponder a dichas PGH las cuales presentan actividad lítica contra microorganismos como: *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *S. typhimurium*.

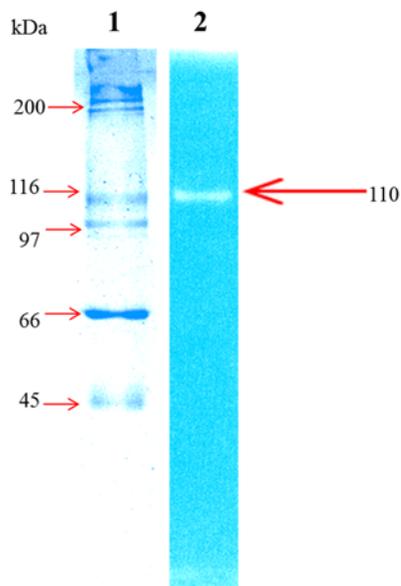


Figura 19. Actividad lítica en gel de acrilamida al 10% con 0.2% de *M. lysodeikticus*. Carril 1, marcador de alto peso molecular; carril 2, fracción de restos de membrana de *P. acidilactici* 11. UAM MGCE1.

El género *Pediococcus* se caracteriza por ser productor de bacteriocinas (pediocinas), las cuales han demostrado actividad antimicrobiana contra distintas bacterias principalmente de los géneros: *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactococcus*, *Propionobacterium* y *Listeria*, algunas de estas cepas están presentes en exudados y por ello se obtiene un efecto inhibitorio por parte de *P. acidilactici* contra el consorcio de BAL presentes en el exudado de salami. En la actualidad *Pediococcus* se emplea como cultivo iniciador para distintos productos cárnicos debido a este efecto antimicrobiano ante bacterias patógenas (Barbosa-González, 2015). Por lo que es recomendable emplearlo como cultivo iniciador en productos cárnicos madurados.

Actividad lipolítica

Se detectó actividad lipolítica hacia tributirina por parte de las siguientes cepas: *P. acidilactici* 11. UAM-MGCE1, en células y 15. UAM-MGCE1 en extracto crudo libre de células (Tabla 10).

Tabla 9. Detección de actividad lipolítica de *Pediococcus* en caja Petri con agar tributirina al 1.0%

<i>Pediococcus</i>	Cultivo	Suspensión de células DO _{600nm} 3.0-3.5	Extracto crudo libre de células
12.UAM-MGCE1	-	-	-
14. UAM-MGP1	-	-	-
11. UAM-MGCE1	+	+	-
15. UAM-MGCE1	+	-	+
16. UAM-MGP1	-	-	-
17. UAM-MGP2	-	-	-
18. UAM-MXVK133	-	-	-

*Positivo (+), Negativo (-)

Generalmente todas las cepas presentaron mayor actividad lipolítica en suspensión de células con respecto al extracto crudo libre de células, a excepción de la cepa 18. UAM-MXVK133, la cual solo presentó actividad. Para el caso de la cepa 15. UAM-MGCE1 la actividad es predominante en la célula y una tercera parte menos en la fracción extracelular, por lo que las enzimas proteolíticas están en la célula y en medio extracelular. En el caso de la cepa 11. UAM-MGCE1 en actividad es mayor en el medio extracelular por lo que las enzimas lipolíticas se encuentran fuera de la célula. (Figura 19). *Pediococcus* no es característico por presentar actividad lipolítica en productos fermentados, pero considerando la composición de nutrientes, es evidente que dichos microorganismos repercutan en la hidrólisis de triacilgliceridos (TAG) como la tributirina e inclusive en la hidrólisis de enlaces éster de ácidos carboxílicos como el ρ -NFA y en la oxidación de ácidos grasos (Flores y Toldrá, 2011).

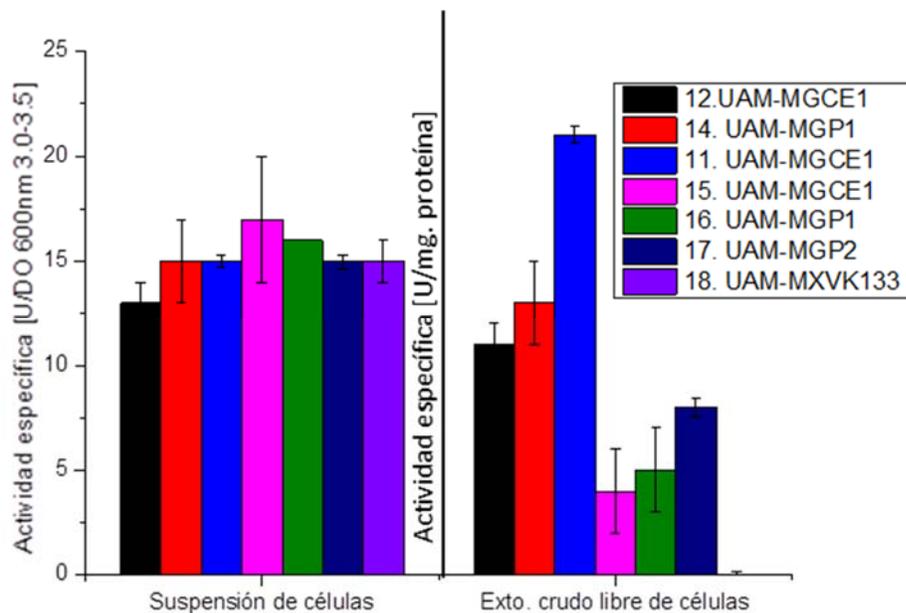


Figura 19. Actividad lipolítica específica del género *Pediococcus* en células y extracto crudo libre de células contra ρ -NFA.

Actividad proteolítica

Todas las BAL del género *Pediococcus* presentaron actividad proteolítica contra la caseína, tanto en la fracción de células y en el extracto crudo libre de células, con respecto a la actividad gelanolítica específica se detectó en todas las cepas en la fracción de extracto crudo libre de células. No se detectó actividad en la fracción citosólica para todas las cepas de *Pediococcus* (Figura 20). Por lo tanto, las enzimas proteolíticas de *Pediococcus* en su mayoría se encuentran en el medio extracelular e inclusive en las proteínas adheridas a la membrana celular.

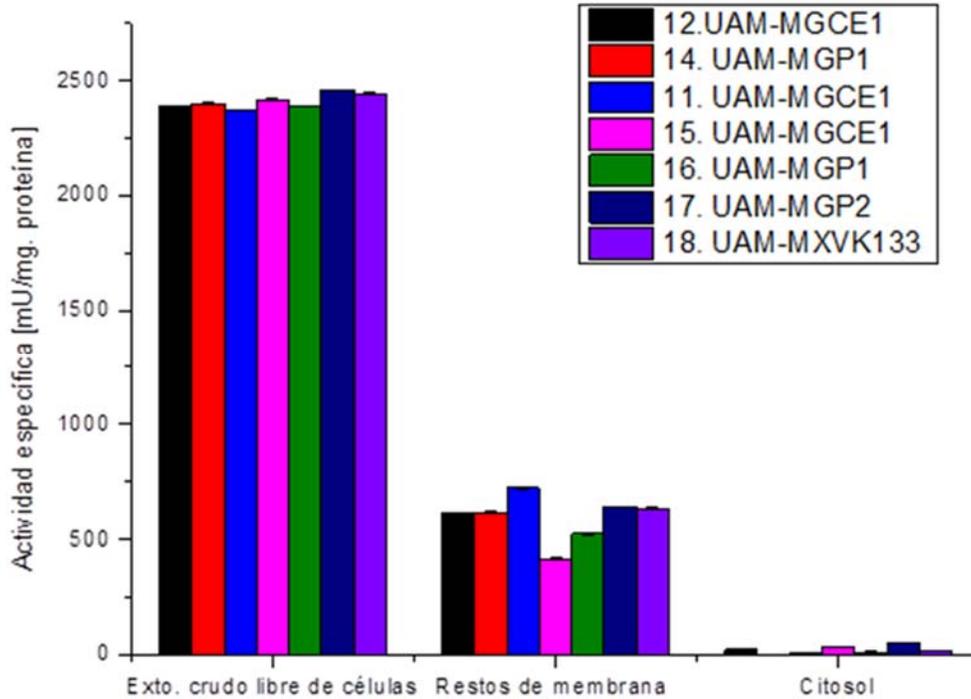


Figura 20. Actividad gelanólítica específica del género *Pediococcus* en citosol, restos de membrana y extracto crudo libre de células.

Se detectó actividad gelanólítica mediante zimografía contra *M. lysodeikticus* por parte de *P. acidilactici* y *P. lolii* en la fracción extracelular en bandas de actividad a los 81 y 150 kDa (Figura 21). Lo cual coincide con lo reportado por Casales-Cabrera, (2012) detectando actividad proteolítica de *P. acidilactici* en la fracción extracelular en 200 kDa. Con base en anterior, sí se recomienda emplear *Pediococcus* como cultivo iniciador en productos madurados como salami, chorizo y salchicha, ya que en el madurado la actividad proteolítica es un factor importante para lograr los atributos característicos del producto final como lo es el aroma y la textura (Kröckel, 2013).

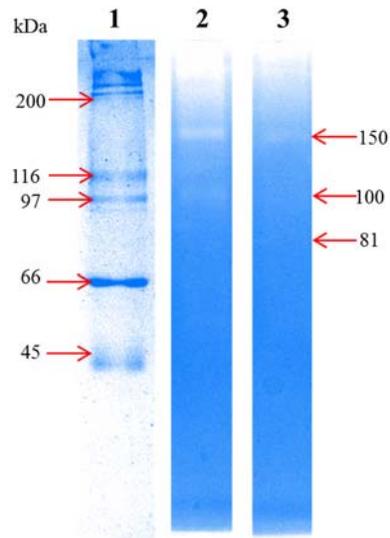


Figura 21. Detección de actividad proteolítica en zimograma de gelatina al 0.1%. Fracción extracelular; carril 1, marcador de peso molecular alto; carril 2, *P. acidilactici*; y carril 3, *P. lolii*.

Actividad aminoácido descarboxilasa

Todas las BAL del género *Pediococcus* presentaron actividad arginina descarboxilasa, excepto *P. acidilactici* (18. UAM-MXVK133), la cual a su vez solo presentó actividad tirosina descarboxilasa. Con base en lo anterior, se puede indicar que *Pediococcus* es productor de putrescina y tiramina, aunque cabe señalar que *Pediococcus* no se caracteriza por generar dichas AB en productos cárnicos (Kröckel, 2013), pero en un medio donde existen cofactores y etapas de inducción sí se detecta actividad descarboxilasa para producir putrescina y tiramina. Dentro de los requisitos para emplear un cultivo iniciador se considera a aquellos microorganismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS) (Hui *et al.*, 2013), por lo que *P. acidilactici* (18. UAM-MXVK133) al descarboxilar únicamente a la tirosina no representa un riesgo considerable para producir AB como tiramina y putrescina.

Actividad MCO y AOX

Debido a la problemática existente de AB que se producen en las etapas de madurado en productos cárnicos por parte de la descarboxilación microbiana, se evaluó la actividad MCO y AOX con la finalidad de detectar microorganismos con actividad oxidasa para degradar AB. Se detectó mediante espectrofotometría. Todas las cepas presentaron actividad MCO en suspensión de células. La cepa *P. loli* 14. UAM-MGP1 presentó mayor actividad MCO (Figura 23a). De igual forma, dicha cepa presentó actividad MCO contra hacia el 2,6 DMP por parte del extracto crudo libre de células la cual se detectó mediante zimografía (Figura 24). Con respecto a la actividad AOX se detectó en cantidades inferiores con respecto a MCO (Figura 23b), cabe mencionar que la actividad AOX no fue posible detectarla en zimografía.

Considerando los resultados anteriores es recomendable adicionar *P. loli* como cultivo iniciador para reducir el contenido de AB por parte de los demás microorganismos predominantes en la maduración. Qinxiu *et al.*, (2016) reportaron un efecto antagónico en la reducción de AB al hacer cultivos iniciadores con dos microorganismos (*S. xylo* y *L. plantarum*) con actividad oxidasa contra AB, por lo que una alternativa viable para tener mayor actividad es emplear a *P. loli* 14. UAM-MGP1 en cultivos iniciadores con uno o más microorganismos que presenten actividad oxidasa.

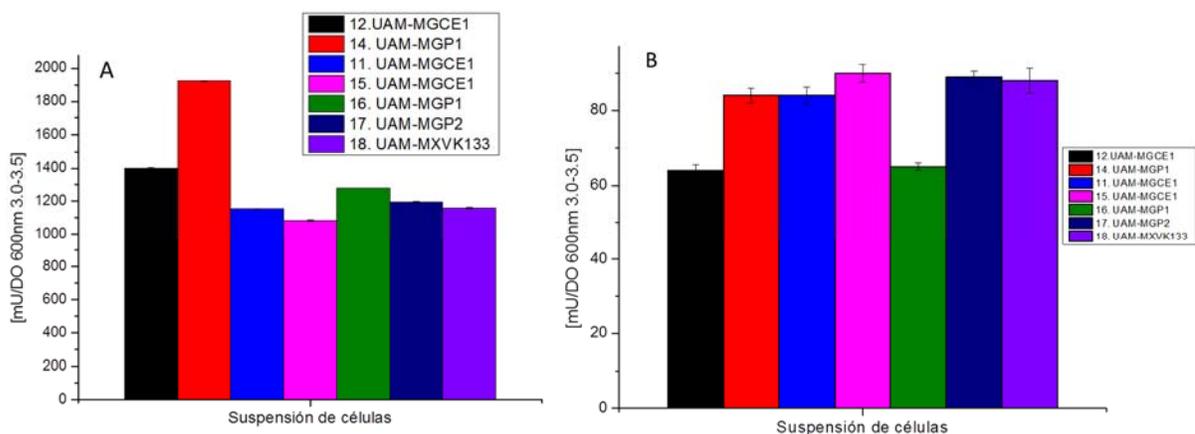


Figura 23. Actividad oxidasa del género *Pediococcus* en suspensión de células; 23a, actividad MCO específica contra 2,6 DMP; 23b, actividad AOX específica contra 3,3 DAB.

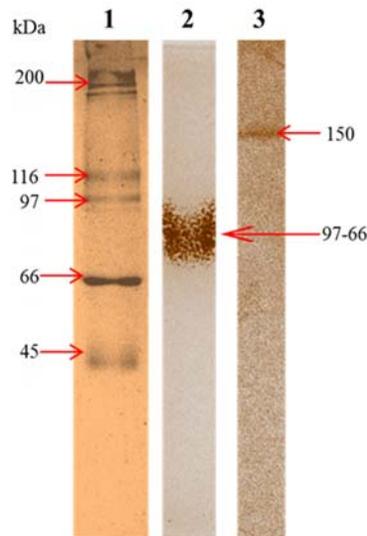


Figura 24. Detección de actividad MCO en zimograma. Carril 1, marcador de peso molecular alto; carril 2, lacasa *Myceliophthora thermophila*; y carril 3, extracto crudo libre de células de *P. lolii* 14. UAM-MGP1.

Enterococcus

Actividad antimicrobiana

Se identificaron las siguientes BAL pertenecientes al género *Enterococcus*: *Enterococcus faecium* 3. UAM-MGS1, *E. faecium* UAM-MXVK29 y *E. faecium* UAM-I3.

Las cepas de *E. faecium* inhibieron la mayoría de los microorganismos, sin embargo, no presentaron actividad contra exudados, *E. coli* y *S. typhimurium* (Figura 25a). Se ha reportado que el género *Enterococcus* produce bacteriocinas que son efectivas contra diversas BAL e inclusive algunos microorganismos deteriorantes y patógenos (Hwanhlem *et al.*, 2017).

Cabe mencionar que los exudados provienen de productos con signos de deterioro (abombamiento, exudado y acidificación), en el cual se desarrollan microorganismos homofermentativos y heterofermentativos como *L. curvatus*, *L. plantarum*, *W. viridescens* y *L. mesenteroides* (León *et al.*, 2006), son las BAL predominantes, por lo que el efecto antimicrobiano de *E. faecium* disminuye contra este consorcio de bacterias debido al efecto antagónico y a la diversidad de metabolitos que dichas bacterias producen.

Con respecto al efecto antagonico, únicamente no se presentó actividad contra exudado de salami, cabe señalar que el efecto antimicrobiano por parte *E. faecium* es mayor en las cepas 10. UAM-MXVK29 y 3. UAM-MGS1. La actividad antimicrobiana por el efecto antagónico es mayor, esto se debe a que los microorganismos a inhibir se encuentran en la misma placa, por lo que son sensibles entre si, dando ventaja a que los metabolitos de *E. faecium* sean mas efectivos al inhibir a los microorganismos patógenos y deteriorantes.

Tabla 11. Detección de actividad antagónica de *E. faecium* en caja Petri de agar TSB.

		3. UAM-MGS1	10. UAM-MXVK29	13. UAM-I3
Patógenos	<i>S. aureus</i>	+	+	+
	<i>E. coli</i>	+	+	+
	<i>L. innocua</i>	+	+	+
	<i>S. typhimurium</i>	-	-	-
Deteriorantes	<i>W. viridescens</i>	+	+	+
	<i>L. mesenteroides</i>	-	+	-
	<i>Exudado salami</i>	-	+	+
	<i>Exudado salchicha</i>	-	+	-

La cepa 10. UAM-MXVK29 presentó actividad de N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa en células y extracto crudo libre de células y menor actividad de N-acetilglucosaminidasa (Figura 25b y 25c). Se detectó actividad lítica en zimograma a los 90 kDa en restos de membrana (Figura 26). Con base en lo anterior esta PGH se encuentra embebida en la membrana celular. Por otra parte, *Enterococcus* es un género que se caracteriza por producir bacteriocinas, las cuales en su mayoría son enterocinas pertenecientes al grupo II, las cuales son de bajo peso molecular (5.0-3.5 kDa) por lo que con las técnicas empleadas en este estudio no se detectaron ninguna, aunque el efecto inhibitorio en la actividad específica antimicrobiana y antagónica se puede atribuir a dichos metabolitos, en especial para inhibir a *L. innocua* y *S. aureus* (Hwanhlem *et al.*, 2017). El potencial antimicrobiano por parte de *Enterococcus* es considerable, pero una limitante para emplearlo como cultivo iniciador es que el género *Enterococcus* es un microorganismo que está presente en la microbiota intestinal de diferentes mamíferos, en los cuales destacan los seres humanos, se ha

reportado a *E. faecalis* como microorganismo patógeno causante de diversas infecciones gastrointestinales (Mascini *et al.*, 2006).

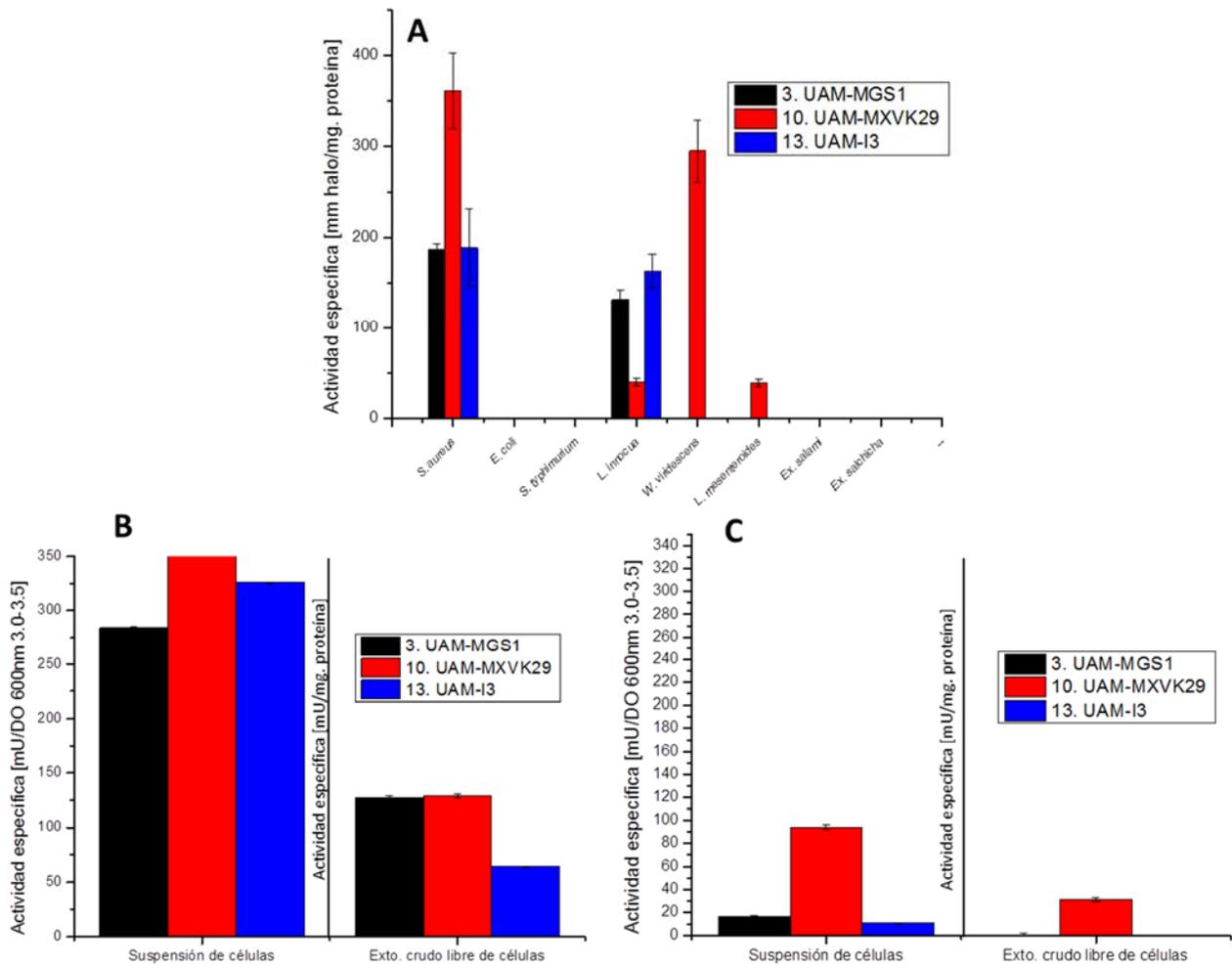


Figura 25. Actividad antimicrobiana específica del género *Enterococcus*. 25a, actividad antimicrobiana específica en extracto crudo libre de células; 25b, actividad N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa específica en suspensión de células y extracto crudo libre de células; 25c, actividad N-acetilglucosaminidasa específica en suspensión de células y extracto crudo libre de células.

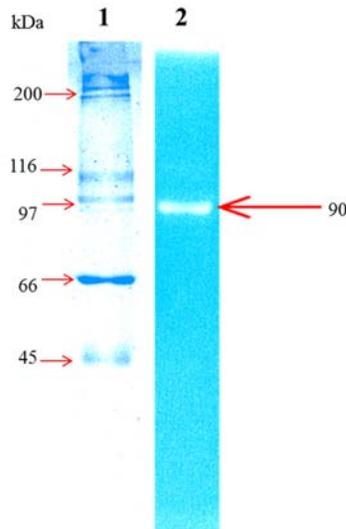


Figura 26. Actividad lítica en gel de acrilamida al 10% con 0.2% de *M. lysodeikticus*. Carril 1, marcador de peso molecular alto; carril 2, fracción de restos de membrana de *E. faecium*.

Actividad lipolítica

Se detectó actividad lipolítica baja en tributirina por parte de las cepas *E. faecium*: 3. UAM-MGS1 y 10. UAM-MXVK29 en extracto crudo libre de células. Presentó actividad contra el ρ -NFA siendo mayor en la suspensión de células de 3. UAM-MGS1 (Figura 27), lo cual coincide con lo reportado, ya que *Enterococcus* no es característico de ser un microorganismo lipolítico, pero considerando la composición de nutrientes de los productos cárnicos es evidente que dichos microorganismos repercutan en la hidrólisis de triacilgliceridos, como la tributirina e inclusive en la oxidación de ácidos grasos (Flores y Toldrá, 2011).

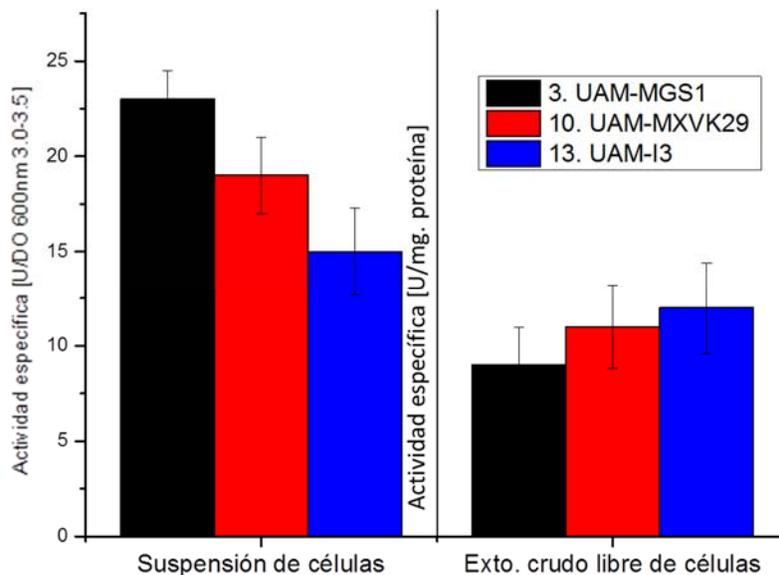


Figura 27. Actividad lipolítica específica del género *Enterococcus* en suspensión de células y extracto crudo libre de células contra ρ -NFA.

Actividad proteolítica

Las cepas 10. UAM-MXVK29 y 3. UAM-MGS1 presentaron actividad proteolítica hacia la caseína en ambas fracciones, tanto en extracto crudo como en células. La cepa 13. UAM-I3 solo presentó actividad en la fracción extracelular. Con respecto a la actividad gelanolítica la cepa 13. UAM-I3 presentó actividad en las tres fracciones de estudio, teniendo mayor actividad en la fracción correspondiente al extracto crudo libre de células y en la fracción citosólica (Figura 28). *Enterococcus* no se caracteriza por ser un microorganismo proteolítico y/o lipolítico, se ha reportado que el uso de dicha cepa es más considerado por las propiedades probióticas que presenta (Foulquie *et al.*, 2006).

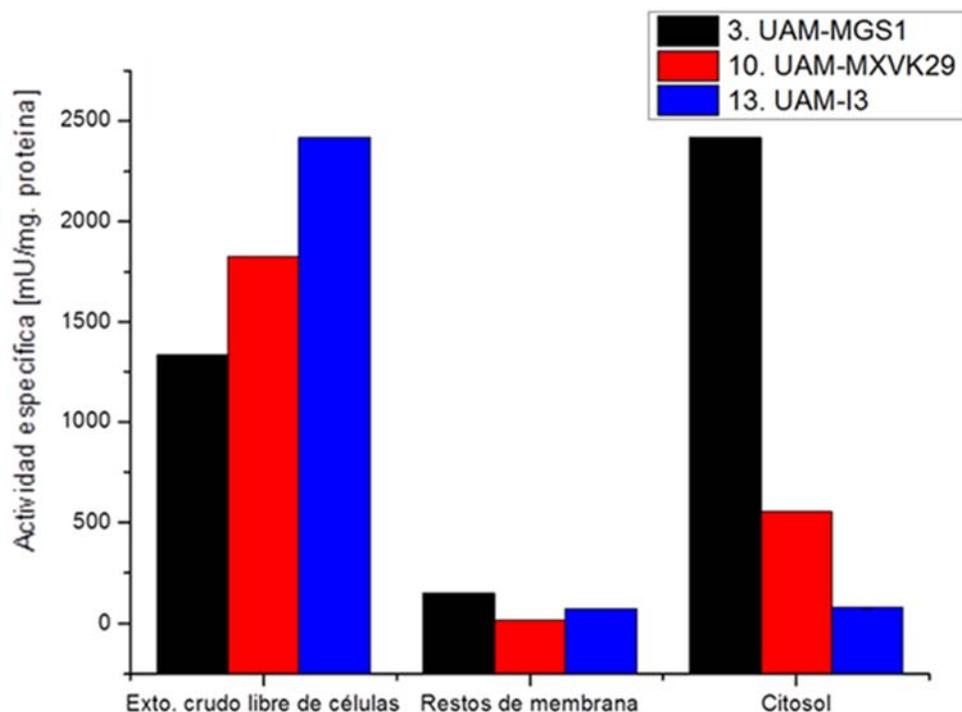


Figura 28. Actividad gelatinolítica específica del género *Enterococcus* en; Extracto crudo libre de células, restos de membrana y citosol

Actividad aminoácido descarboxilasa

Todas las cepas de *E. faecium* presentaron actividad arginina y tirosina descarboxilasa, por lo tanto, son productores de putrescina y cadaverina, respectivamente. Galgano *et al.*, (2009) detectó que BAL pertenecientes a *Enterococcus* son capaces de descarboxilar uno o más aminoácidos libres, produciendo principalmente tiramina y putrescina. Por lo tanto, se deberá considerar la actividad aminoácido descarboxilasa en caso de emplear algún microorganismo del género *Enterococcus* como cultivo iniciador para evitar la formación de AB.

Actividad MCO y AOX

No se detectó actividad MCO y AOX considerable con respecto a los demás géneros estudiados (Figura 29), cabe mencionar que *Enterococcus* no es un género con promotores de las enzimas monoamino-oxidasa y diamina-oxidasa (De las Rivas *et al.*, 2008).

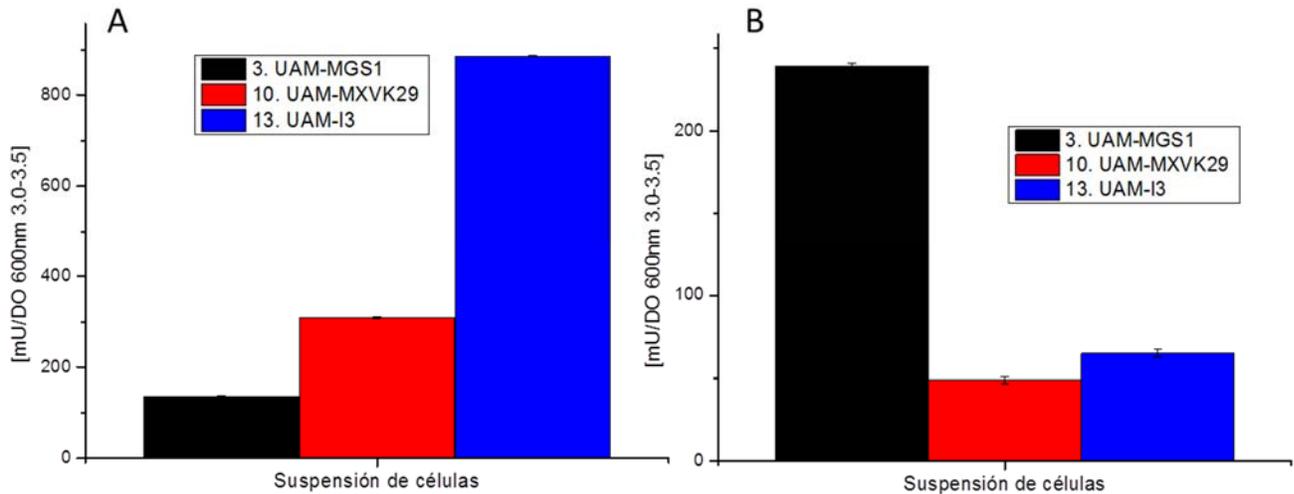


Figura 29. Actividad oxidasa del género *Enterococcus*. 29a, actividad MCO en suspensión de células; 29b, actividad AOX en suspensión de células.

Weissella

Se identificaron las siguientes BAL pertenecientes al género *Weissella*: *W. viridescens* (4. UAM-MGS1, 6. UAM-MGS2, 7. UAM-MGJP1, 8. UAM-MGS3, 9. UAM-MGJP2).

Actividad antimicrobiana

W. viridescens no presentó actividad antimicrobiana específica considerable hacia microorganismos indicadores y/o patógenos, únicamente las cepas 7. UAM-MGJP1 y 8. UAM-MGS3 (Figura 30a), por lo que no es una BAL la cual pueda ser empleada como cultivo iniciador por efecto de bioconservación ya que su inhibición es bacteriostática y no bactericida debido a que dicho microorganismo es heterofermentativo por lo que sus metabolitos no inhiben el crecimiento

de microorganismos indicadores (Kröckel, 2013). De igual modo no presentó actividad lítica considerable de PGH (Figura 30b y 30c).

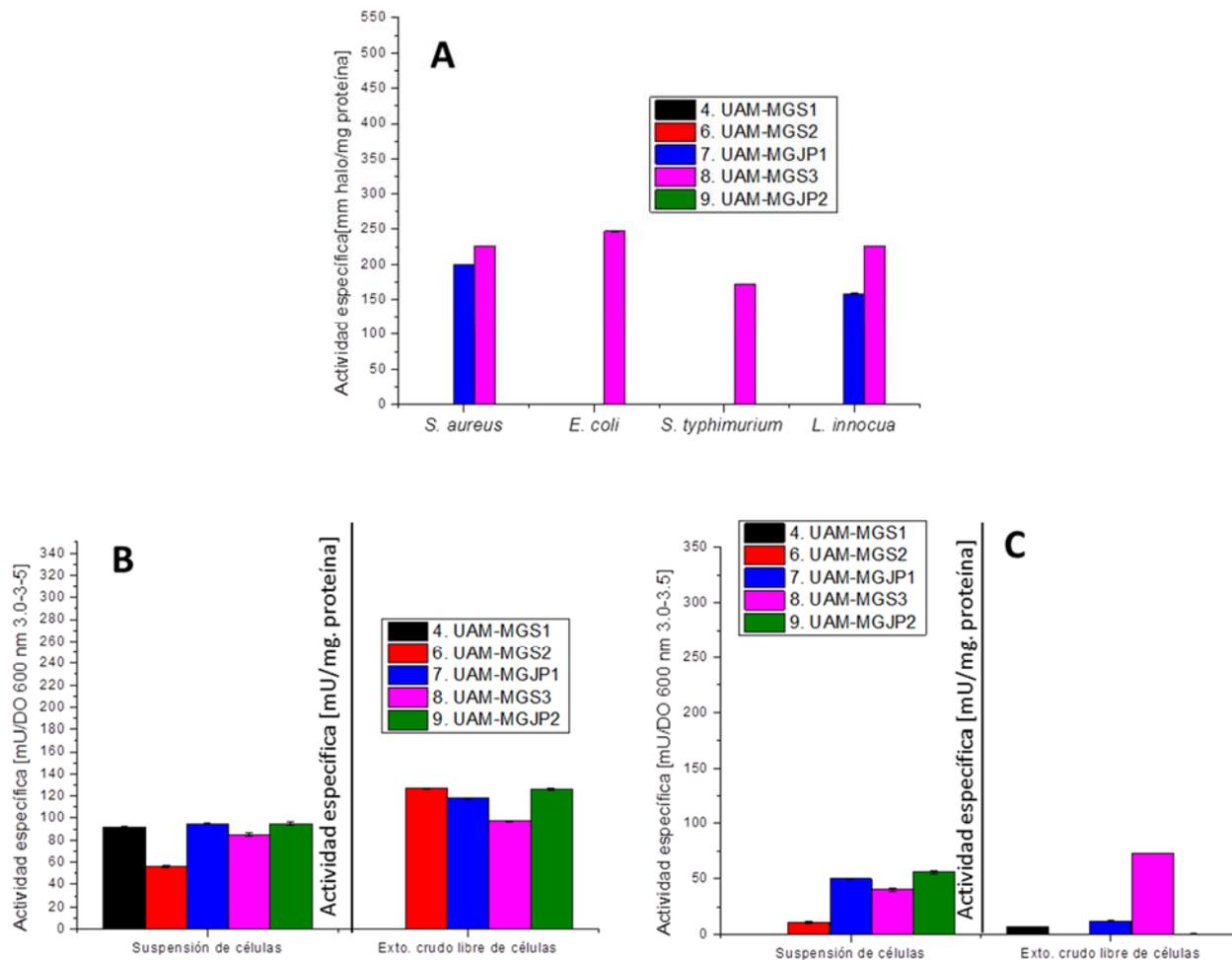


Figura 30. Actividad antimicrobiana del género *Weissella*. 30a, actividad antimicrobiana específica en extracto crudo libre de células; 30b, actividad N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa específica en suspensión de células y extracto crudo libre de células; 30c actividad N-acetilglucosaminidasa en suspensión de células y extracto crudo libre de células.

Actividad lipolítica

Ninguna cepa del género *Weissella* presentó actividad lipolítica contra ninguno de los sustratos empleados en este estudio, lo cual coincide con lo reportado ya que dicho género bacteriano sólo se caracteriza por ser alterante en salchichas fermentadas debido a la alta actividad proteolítica y producción de ácidos orgánicos (Kröckel, 2013).

Actividad proteolítica

Todas las cepas del género *Weissella* presentaron actividad proteolítica hacia la caseína ya que presentó halos de hidrólisis en cajas Petri de agar skim milk. Se detectó actividad gelanolítica en la fracción de restos de membrana mediante zimografía en 150, 100 y 81 kDa. Aunque no se ven las bandas definidas, se observó un barrido en 200-150 kDa de actividad proteolítica hacia la gelatina (Figura 31). Se observa mayor actividad gelanolítica en la fracción extracelular (Figura 32), por lo que su mecanismo proteolítico de dicho microorganismo deteriorante se encuentra con mayor actividad en el medio extracelular, y que es indispensable para la degradación de proteínas de gran peso molecular (200-150 kDa), lo cual es evidente en la degradación de productos cárnicos al producir exudados los cuales aumentan en a_w por la hidrólisis de enlaces peptídicos (Kröckel, 2013). Esto se atribuye al metabolismo heterofermentativo, ya que produce distintos metabolitos orgánicos como: CO_2 , etanol y acetato a partir de glucosa, dichos compuestos favorecen el deterioro causado por la acidificación e hidrólisis de enlaces peptídicos de proteínas. *W. viridescens* es considerada como una BAL termoresistente por lo que su presencia se asocia a la decoloración en productos cárnicos curados y/o fermentados, en jamones cocidos es comúnmente identificada por producir cavidades en músculo después de la cocción (Kröckel, 2013), por lo que no es recomendable su presencia y/o adición en cultivos iniciadores ya que evidentemente es una BAL deteriorante.

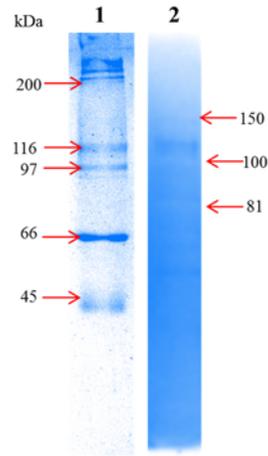


Figura 31. Detección de actividad proteolítica en zimograma de gelatina al 0.1%. Carril 1, marcador de peso molecular alto; carril 2, fracción de restos de membrana de *W. viridescens* 8. UAM-MGS3.

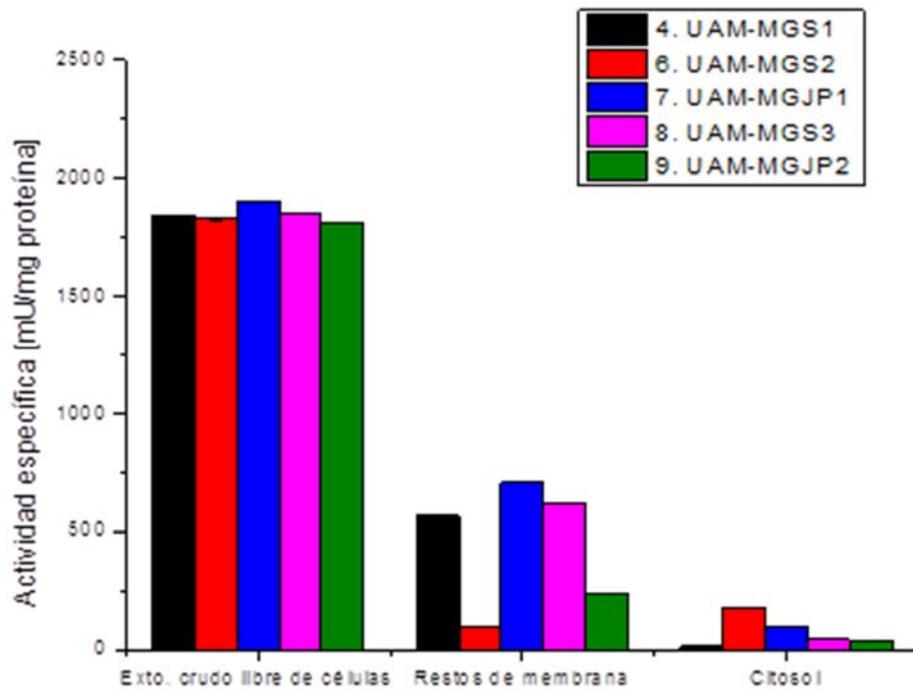


Figura 32. Actividad gelanolítica específica en extracto crudo libre de células, restos de membrana y citosol.

8. CONCLUSIONES

Se identificaron todos los microorganismos previamente aislados de distintos productos cárnicos en un porcentaje de similitud mayor al 98%. Se detectó actividad antimicrobiana en extracto crudo libre de células y en restos de membrana de los siguientes géneros: *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Enterococcus* contra microorganismos patógenos y deteriorantes. En ensayos antagónicos se obtuvo un mayor efecto antimicrobiano. También se detectó actividad antimicrobiana de PGH. Se detectó actividad lipolítica hacia la tributirina en extracto crudo libre de células de *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Enterococcus*, de igual modo dichos microorganismos presentaron actividad lítica contra la caseína en todas las fracciones celulares de los siguientes BAL; *Pediococcus* y *Lactobacillus* de los cuales en su mayoría *Pediococcus* presentó mayor actividad lítica contra la gelatina en la fracción de proteínas adheridas a membrana. Los microorganismos. *L. sakei*, *L. curvatus*, *E. faecium* y *P. acidilactici* son productores de AB; tirosina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa, finalmente se detectó actividad MCO y AOX en células y únicamente MCO en fracción extracelular de *P. loli*.

9. PERSPECTIVAS

- Caracterizar e identificar los metabolitos proteínicos detectados en las diferentes actividades enzimáticas evaluadas.
- Determinar los parámetros cinéticos óptimos de actividad catalítica de las distintas enzimas detectadas en los distintos ensayos.
- Evaluar el efecto de los metabolitos proteínicos detectados durante las transformaciones bioquímicas que ocurren durante el madurado de diferentes productos cárnicos y alimentos fermentados.
- Diseño, desarrollo y mejoramiento de cultivos iniciadores para obtener efectos benéficos y minimizar los atributos indeseables y el deterioro por parte de BAL.

10. REFERENCIAS

- Andrighetto, C., Zampese, L., Lombardi, A. (2001). **RAPD-PCR Characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy).** *Applied Microbiology*. 33, 26–30.
- Barbosa-González, P. (2015). **Diseño y validación de un método zimográfico para la caracterización de una enzima con actividad de N-ACETILGUCOSAMINIDASA DE *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.** México D.F. Tesis de Licenciatura. UNAM, Facultad de Química.
- Baragi, V. M., Shaw, B. J., Renkiewicz, R. R., Kuipers, P. J., Welgus, H.G., Mathrubutham, M., Cohen J. R., Rao, S.K. (2000). **A versatile assay for gelatinases using succinylated gelatin.** *Matrix Biology*. 19, 267-273.
- Bermúdez-García, E. (2010). **Modificación enzimática de flavonoides con las carboxilesterasas de *Bacillus pumilus* GMA1.** México D.F. pp. 35-37. Tesis de Licenciatura UNAM. Facultad de Química.
- Bradford, M. M. (1976). **A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Brink, B.T., Damink, C., Joosten, H., Huis in't Veld, J. (1990). **Ocurrence and formation of biologically active amines in foods.** *International Journal Food Microbiology*. 11(1), 73-84.
- Block, S.S. (1991). **Peroxigen compounds in disinfection, sterilization and preservation.** Editorial. Lea y Feabiger. Philadelphia. pp. 169-180.
- Bover-Cid, S., Torriani, S., Gatto, V., Tofalo, R., Suzzi, G., Belletti, N. (2009). **Relationships between microbial population dynamics and putrescine and cadaverine accumulation during dry fermented sausage ripening.** *Journal of Applied Microbiology*. 106, 1397-1407.
- Callejón, S., Sendra, R., Ferrer, S., Pardo, I. (2013). **Identification of a novel enzymatic activity from lactic bacteria able to degrade biogenic amines in wine.** *Applied Microbiology Biotechnology*. 98, 185-198.
- Carr, F. J., Chill, D. y Maida, N. (2002). **The acid lactic bacteria: A literature survey.** *Critical Reviews in Microbiology*. 28, 4, 281-370.

- Casaburi, A., Aristoy, M. C., Cavella, S., di Monaco, R., Ercolini, D., Toldrá, F., *et al.* (2007). **Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by the use of starter cultures.** *Meat Science*, 76, 295-307.
- Casales-Cabrera, X. (2012). **Localización y caracterización de la actividad proteolítica de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.** México D.F. pp. 33-36. Tesis de licenciatura UNAM. Facultad de química.
- Chong, Xie., Hu-Hu, W., Xiao-Kai, N., Lin, Chen., Shao-Lin, D., Xing-Lian, Xu. (2015). **Reduction of biogenic amine concentration in fermented sausage by selected starter cultures.** *Journal of Food*. 13:4, 491-497.
- Comi, G., Citterio, B., Manzano, M. y Cantoni, C. (1992). **Evaluation and characterization of *Micrococaceae* strains in Italian dry fermented sausages.** *Journal of Food Industry*. 72, 1679-1685.
- Contreras-Cruz, M. (2013). **Efecto del medio de cultivo en la producción de enzimas de interés biotecnológico por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.** México D.F. pp. 15-21. Tesis de licenciatura UNAM. Facultad de química.
- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. (2005). **Bacteriocins: developing innate immunity for food.** *Nature Review of Microbiology*. 3, 777-788.
- De las Rivas, B., Ruiz-Capillas, C., Carrascosa, A.V., Curiel, J.A., Jiménez-Colmenero, F., Muñoz, R. (2008). **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*. 80, 272–277.
- Demeyer, D. I., Snulders, F. J. M., Toldrá, F., Flores, J., y Prieto, M. (1992). **Meat fermentation as an integrated process.** Editorial. Utrecht: ECCEAMST, Nijmegen: Audet Tijdschriften, Holanda, pp. 21-36.
- Demeyer, D. I., Verplaetse, A. y Gistelinck, M. (1986). **Fermentation of meat: and integrated approach.** *Proceedings European Meeting of Meat Reseach Workers*. pp. 241-247.
- Enver-Baris, B., Gurhan-Ciftcioglu., Funda-Yilmaz E., Hasret-Yardibi., Osman-Yesil., Gulay-Merve B., Gulcan-Demirel. (2014). **Effect of starter cultures combinations on lipolytic activity and ripening of dry fermented sausages.** *Italian Journal of Animal Science*. 13, 3422.

- Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M. C., Oliver, G., y Toldrá, F. (1999). **Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake***. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 578-584.
- Fernández-Escartin, E. (2000). **Microbiología e inocuidad de los alimentos**. México, Universidad Autónoma de Querétaro. Qro.
- Flores, M., y Toldrá, F. (2011). **Microbial enzymatic activities for improved fermented meats**. *Trends in Food Science & Technology*. 22, 81-90.
- Foulquie, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. y De Vuyst, L. (2006). **The role and application of enterococci in food and health**. *International Journal of Food Microbiology*, 106:1-24.
- Frey, W. (1983). **Fabricación fiable de embutidos**. Editorial Acribia, S.A. de C.V. Zaragoza. México D.F. pp. 14-27.
- Galgano, F., Favati, F., Bonadio, M., Lorusso, V., Romano, P. (2009). **Role of biogenic amines as index of freshness in beef meat packed with different biopolymeric materials**. *Food Research International*. 42, 1147-1152.
- García-Cano, I. (2013). **Peptidoglucano hidrolasa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042: Detección, Localización celular y evaluación de su potencial como antibacteriano**. México D.F. Tesis de Doctorado. UNAM, Facultad de Química.
- García-Cano, I., Campos-Gómez M., Contreras-Cruz, M. (2014). **Expression, purification, and characterization of a bifunctional 99-kDa peptidoglycan hydrolase from *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042**. *Applied Microbiology Biotechnology*. 99, 8563-8573.
- García-Cano, I., Serrano-Maldonado, E., Olvera-García, M., Delgado-Arciniega, E., Peña-Montes, C., Mendoza-Hernández, G., Quirasco-Baruch, M. (2014). **Antibacterial activity produced by *Enterococcus* spp. Isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese**. *Food Science Technology*. 59, 26-34.
- García-Cano, I., Velasco-Pérez, L., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S., Mendoza-Hernández G., Llorente-Bousquets, A., Farrés A. (2011). **Detection cellular localization and antibacterial activity of two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042**. *Journal of Applied Microbiology*. 111, 607-615.
- García-Fontán, J., Lorenzo, M., Martínez, S., Franco, I., Carballo, J. (2007). **Microbiological characteristics of Botillo a Spanish traditional pork sausage**. *Science Direct*. 40, 1610-1622.

- Gould, G. (1991). **Antimicrobial compounds in biotechnology and foods ingredients.** Editorial Goldberg. Nostrand Reinhold. New York. pp. 464-467.
- Gonzáles, T., Robert-Baudouy, J. (1996). **Bacterial Aminopeptidases: properties and functions.** *Microbiology Reviews.* 18, 3, 19-344.
- Grosu-Tudor, S.S., Stancu, M.M., Pelinescu, D. (2014). **Characterization of some bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from fermented foods.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 9, 2459-2469.
- Gutiérrez-Ramírez, L.A., Montoya-Campuzano, O.I., Ruíz-Villadiego, O.S. (2005). **Evaluación del potencial bactericida de los extractos de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento in vitro de *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*.** *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 36 pp. 7-10.
- Guzmán-Trampe, S. (2012). **Evaluación de la capacidad de microorganismos asociados a *Magnolia dealbata* Zucc. para producir compuestos con actividad biológica.** México D.F. Tesis de Maestría, UNAM, Instituto de Investigaciones Biomédicas. pp. 25-27.
- Haywood, G.W., Large, P.J. (1981). **Microbial oxidation of amines. Distribution, purification and properties of two primary-amine oxidases from the yeast *Candida boidinii* grown on amines as sole nitrogen source.** *Biochemistry Journal.* 199, 1, 187-201.
- Hechelmann, H., Lücke, F., K., and Shillinger U. (1988). **Causes and prevention of *Staphylococcus aureus* intoxication due to fermented sausages and raw hams.** *Mitteilungsblatt Bundesanst. Fleischforsch. Kulmbach* no. 100, 7956-7964.
- Hoegger, P. J., Kilaru, S., James, T. Y., Thacker, J. R., Kües, U. (2006). **Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences.** *The Federation of European Biochemical Societies Journal.* 273, 2308-2326.
- Hui, Y.H., Guerrero, I y Rosmini, M. (2013). **Ciencia y Tecnología de la carne.** Editorial Limusa, S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores. Balderas 95, México D.F.
- Hui-Qing Xu, Lu Gao, Yun-shen Jiang, Ying Tian, Jin Peng, Yu Chen. (2016). **Transcriptome response of *Lactobacillus sakei* to olive oil and tributyrin environments.** *Ann Microbiol.* 66:867–873.
- Hwanhlem, N., Ivanova, T., Biscola, V., Choiset, Y., Haertlé, T. (2017). **Bacteriocin producing *Enterococcus faecalis* isolated from chicken gastrointestinal tract originating from**

Phitsanulok, Thailand: Isolation, screening, safety evaluation and probiotic properties. *Food Control.* 78 (2017) 187-195.

- Jiménez-Lopéz, M. E. (2004). **La aplicación de las lipasas en el desarrollo de productos alimenticios.** México D.F. Tesis de licenciatura. UNAM, Facultad de Química p.p. 7-15.
- Kinsman, D. M. (1980). **Principal characteristics of sausages of the world listed by country of origin.** Editorial Storrs. Connecticut University of Connecticut.
- Kunamneni, A., Ballesteros A., Plou, F., Alcalde, M. (2007). **Fungal laccase a versatile enzyme for biotechnological applications.** *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology.* 233-245.
- Leuschner, R.G., Heidel, M., Hammes, W.P. (1998). **Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms.** *Journal Food of Microbiology.* 39:2, 1-10.
- León, T., Totosaus, A., Guerrero, I., Pérez-Chabela, M. (2006). **Efecto de BAL termoresistentes en salchichas cocidas.** *Ciencia Tecnología Alimentaria.* 5(2), 135-141.
- López-Cruz, J. I., Viniegra-González, G., Hernández-Arana, A. (2006). **Thermostability of native and Pegylated *Myceliophthora thermophila* Laccase in Aqueous and Mixed Solvents.** *American Chemical Society.* 17, 1093-1098.
- Kröckel, L. (2013). **The role of Lactic Acid Bacteria in Safety and Flavour Development of Meat and Meat Products.** En; *Lactic Acid Bacteria-R&D for Food, Health and Livestock Purposes.* Capítulo 5. Editorial Intech. pp. 130-138.
- Lyte, M. (2004). **The biogenic amine tyramine modulates the adherence of *Escherichia coli* O157:H7 to intestinal mucosa.** *Journal of Food Protection.* 6, 878-883.
- Macrobal A., De las Rivas, B., Muñoz, R. (2006). **Methods for the Detection of Bacteria Producing Biogenic Amines on Foods: A Survey.** *Journal of Consumer Protection and Food Safety.* (1)187-196.
- Marino, M., Maifreni, M., Moret, S., Rondinini, G. (2000). **The capacity of *Enterobacteriaceae* species to produce biogenic amines in cheese.** *Letters in Applied Microbiology.* 31, 169-173.
- Mascini, E.M., Troelstra, A., Beitsma, M., (2006). **Genotyping and preemptive isolation to control an outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*.** *Clin. Infect. Dis.* 42 (6): 739-46.

- Montel, M. C., Talon, R., Fournaud, J. y Champomier, C. (1991). **A simplified key for identifying homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium* spp. From meat.** *Journal of Applied Bacteriology*. 70, 469-472.
- Montville, T.J., Chen, Y. (1998). **Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions.** *Applied Microbiology Biotechnology*. 50, 511-519.
- Najjari, A., Amairi, H., Chaillou, S., Mora, D., Boudabous, A., Zagorec, M., Ouzari, H. (2016). **Phenotypic and genotypic characterization of peptidoglycan hydrolases of *Lactobacillus sakei*.** *Journal of Advanced Research*. 7, 155-163.
- Norma Oficial Mexicana **NOM-145-SSA1-1995**. Productos cárnicos troceados y curados. Productos cárnicos curados y madurados. Diario Oficial de la Federación. 17 de Noviembre de 1999.
- Parra-Huertas, R. A. (2010). **Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos.** *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 8, 93-105.
- Piscitelli, Alessandra. (2005). **Recombinant expression of fungal oxidases for industrial application.** Nápoles, Italia. Tesis de doctorado. Universidad de Nápoles Federico II.
- Qinxiu, Sun., Qian, Chen., Fangfei, Li., Dogmei, Zheng., Baohua, Kong. (2016). **Biogenic amine inhibition and quality protection of harbin dry sausages by inoculation with *Staphylococcus xylosus* and *Lactobacillus plantarum*.** *Food Control*. 68, 358-366.
- Ramírez-Cuenca, Ma. Del Socorro. (2005). **Actividad inhibitoria de cepas de BAL frente a bacterias patógenas y deteriorantes en alimentos.** Pachuca de soto, Hidalgo. Tesis de licenciatura. UAEH, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. pp. 5-30.
- Rodríguez, S., Toca, J. L. (2006). **Laccases in the textile industry.** *Biotechnology Molecular Biology Review*. 1, 115-120.
- Sanz, Y., Fadda, S., Vignolo, G., Aristoy, M. C., Oliver, G., y Toldrá, F. (1999). **Hydrolytic action of *Lactobacillus casei* CRL 705 on pork muscle sarcoplasmic and myofibrillar proteins.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3441-3448.
- Schreck, S. D., y Grunden, A. M. (2014). **Biotechnological applications of halophilic lipases and thioesterases.** *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98, 1011-1021.
- Scolari, G. y M. Vescovo. (2004). **Microbial antagonism of *Lactobacillus casei* added to fresh vegetables.** *Journal of Food Scientist*. 16, 4, 465-475.

- Soomro, A.H., Masud, T., Anwaar, K. (2002). **Role of Lactic Acid Bacteria LAB in Food Preservation and human health.** *Pakistan Journal of Nutrition.* 1, 20-24.
- Solomon, E. I., Augustine, A. J., and Yoon, J. (2008). **O₂ reduction to H₂O by the multicopper oxidases.** *Dalton Transactions.* 9226, 3921-3932.
- Somboon, T., Mukkharin, P., Suwimon, K. (2015). **Characterization and lipolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat.** *Journal of applied Pharmaceutical Science.* 5, 6-10.
- Tarté, R. (2009). **Ingredients in meat products: properties, functionality and applications.** Editorial. Springer Science & Business Media. Maddison, Wisconsin, USA.
- Torres, E., Mancheño, B., R, Muñoz, R. (2014). **Characterization of a halotolerant lipase from the lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* useful in food fermentations.** *Journal of Food Science and Technology.* Vol. 60(14): 246-252.
- Triki, M., Jiménez-Colmenero, F., Herrero, M., Ruiz-Capillas, M. (2012). **Optimization of chromatographic procedure for determining biogenic amine concentrations in meat and meat products employing a cation-exchange column with a post-column system.** *Food Chemistry.* 130, 4, 1066-1073.
- Ünlu, G., Nielsen, B., Ionita C. (2016). **Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Hot Dogs by Surface Application of Freeze-Dried Bacteriocin-Containing Powders from Lactic Acid Bacteria.** *Probiotics & Antimicrobial Proteins.* 8:102–110.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De vos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996). **Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics.** *Microbiology Review.* 60, 407-438.
- Vendramin-Alegre, S. (2013). **Actividad proteolítica intracelular de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042.** México D.F. Tesis de licenciatura. UNAM, Facultad de química. pp. 12-22.
- Witold., K., Horst, N., Knut, J., Heller y Finn, K. (2014). **Bacteriophages of *Leuconostoc*, *Oenococcus*, and *Weissella*.** *Frontiers of Microbiology.* 5(186).
- Yang, Z. (2000). **Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: Structures and properties.** Tesis de Maestría, Faculty of Agriculture and Forestry, Department of Food Technology University, University of Helsinki, pp. 60-65.
- Yoke-Ming, W., Yu, H., Kumar, S., Yoshiko, M., Keiji, N. (2015). **Optimization of poli (N-isopropylacrilamide) as an artificial amidase.** *Biomacromolecules.* 16:411-421.

- Zuñiga-Rodriguez, V. H. (2004). **Inmovilización de lipasa de *Bacillus pumilus* GMA1.** México D.F. Tesis de licenciatura. UNAM, Facultad de Química.