

**LONGANIZAS ARTESANALES DE CABRA (*Capra hircus*) COMO FUENTE
NATURAL PARA AISLAR E IDENTIFICAR BACTERIAS ÁCIDO
LÁCTICAS NATIVAS COMO BIOCONSERVADORES**

***Artisan-made Sausages of Goat (*Capra hircus*) as a Natural Source
to Isolate and Identify Native Acid-Lactic Bacteria as Biopreservatives***

Albano J. Bravo^{*,1}, Matilde L. Coronado^{***}, Bernavé S. Meléndez^{***},
Alexis F. Marques^{***}, Belkys Vázquez^{***}, Oscar De La Rosa^{***}, Eduardo Rodríguez R.^{****},
Jeannette Tromp^{*****}, Ana T. Serrano^{*****}

^{*}Cátedra de Industria de la Leche y de la Carne, ^{**} Centro de Investigaciones Lácteas. Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV. ^{***}Laboratorio de Biotecnología Agrícola Animal, Escuela Socialista de Agricultura Tropical, INIA. ^{****}Laboratorio de Biotecnología y Virología Vegetal, Centro de Microbiología Celular IVIC, Caracas, Venezuela. ^{*****}Laboratorio de Higiene de los Alimentos, ^{*****}Laboratorio de Diagnóstico, Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV.

Correo-E:albanobravo@gmail.com

Recibido: 31/10/17 - Aprobado: 03/10/18

RESUMEN

Las longanizas son una fuente de bacterias ácido-lácticas beneficiosas, que se desarrollan en su ambiente natural y que poseen capacidad conservadora y de interés biológico, como cultivos iniciadores bacterianos. El propósito de esta investigación, fue el de identificar a dichas bacterias. Para ello, se procesaron muestras de longanizas artesanales, de las localidades de La Cruz de Taratara, Santa Cruz de Pecaya, El Paraíso y Pecaya, respectivamente, en la parroquia Sucre del municipio Sucre del estado Falcón. Se obtuvieron tres aislados bacterianos, a saber: *F1VEN*, *F2VEN* y *F3VEN*, los cuales fueron sometidos a determinaciones microbiológicas, para la identificación fenotípica y para pruebas de fermentación de azúcares. Las muestras se sometieron al método de identificación molecular, para determinar el género y la especie. Para ello, se utilizó la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas

ABSTRACT

Sausages are a source of beneficial lactic-acid bacteria, which develop in their natural environment and possess both a biopreservation capacity and biotechnological interest as bacterial starter cultures. The purpose of this investigation was to identify these bacteria. To carry out the experiment, samples of artisan sausages from the localities of *La Cruz de Taratara*, *Santa Cruz de Pecaya*, *El Paraíso*, and *Pecaya*, respectively, located in the Sucre parish of the Sucre municipality in the State of Falcón, Venezuela, were processed. Three bacterial isolates were obtained, namely: *F1VEN*, *F2VEN* and *F3VEN*, which were subjected to microbiological determinations, for the phenotypic identification and tests of fermentation of sugars. Samples were identified with the molecular identification method, to determine the genus and the species. To perform this identification, the molecular technique of the polymerase chain reaction (PCR), with the universal primers HDA1 and WLAB2, was used,

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

en inglés), con los cebadores universales HDA1 y WLAB2, para amplificar los fragmentos de las regiones variables del gen ADNr 16S. Los productos resultantes de la amplificación se purificaron y se obtuvo su secuencia, a través de Macrogen, Seúl, República de Korea. Las secuencias parciales de nucleótidos obtenidas, se alinearon con secuencias depositadas en la base de datos del *GenBank*, y se determinó el porcentaje de similitud para la identificación, a nivel de género y especie, de las cepas nativas, con el programa BLAST. Se logró la identificación de tres aislados nativos de esta fuente natural, con potencial biotecnológico para la conservación de longanizas.

to amplify the variable regions of the 16S rADN gene. The resulting products of amplification were purified and their sequence was obtained through the Genome Sequencing Service of Macrogen, Seoul, Republic of Korea. The partial sequences of nucleotides obtained were aligned with sequences deposited in the GenBank database, and the percentage of similarity for the identification of native strains, at a genus and species level, was determined for the identification, with the computer program BLAST. The identification of three native isolates from that natural source, with biotechnological potential for preservation of sausages was achieved.

(Palabras clave: Biotecnología; bioconservación; longaniza de cabra; iniciador bacteriano; gen ADNr 16s)

(Key words: Biotechnology; bioconservation; goat's sausage; bacterial starter; gen ADNr 16s)

INTRODUCCIÓN

Durante generaciones, en el municipio Sucre del estado Falcón, se ha elaborado artesanalmente la longaniza de cabra (*Capra hircus*), con carne y grasa de cabra, embutido en tripa natural de cabra y secado por oreo al sol. A estas longanizas, se le adicionan especias, lo que determina que el tiempo de vida útil sea corto, aproximadamente 25 d. A estos embutidos no se les añaden aditivos alimentarios que sean materias no nutritivas [1], los cuales generalmente se añaden en pequeñas cantidades para mejorar el aspecto, sabor, consistencia o propiedades de conservación (Comité Mixto FAO/OMS de expertos en Nutrición). La composición química de la carne fresca y sus características biológicas, permiten el desarrollo de microorganismos patógenos, que deterioran y disminuyen el tiempo de vida útil y en algunos casos producen intoxicaciones [2]; por lo que las bacterias lácticas aisladas de la carne o

sus derivados podrían ser más eficaces para asegurar su calidad microbiológica, ya que al estar mejor adaptadas a sus sustratos, serán más competitivas que las bacterias lácticas de otros orígenes [3]. Estas bacterias, pueden ser aisladas, purificadas y a su vez utilizadas como iniciadores bacterianos como cepas productoras de bacteriocinas. Estas bacterias son reconocidas como seguras GRAS (por sus siglas en inglés *Generally Recognized As Safe*) [4], ya que participan en la fermentación y conservación de alimentos, mejoran su calidad higiénica al inhibir la flora competitiva. Estas bacterias incluyen microorganismos patógenos que incluye a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Salmonella* spp. [5]. Las bacterias ácido lácticas (BALs) inhiben el crecimiento de microorganismos alterantes y patógenos, debido a la competencia por nutrientes, producción de metabolitos antimicrobianos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido

de carbono, diacetilo, etanol y bacteriocinas [6, 7]. Estas BALs pueden estar presentes en la carne [8-10], productos lácteos, vegetales, tracto digestivo de animales y humanos. Las bacteriocinas producidas por BALs actúan como inhibidores del crecimiento de algunas bacterias patógenas transmitidas por los alimentos [11]. La aplicación de bacteriocinas puede ayudar a reducir el uso de preservativos químicos, la intensidad de calor y otros tratamientos físicos [12]. Por otra parte, la identificación microbiológica está basada en criterios microbiológicos comunes y claves de flujos de identificación del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* [13] y fermentación de azúcares. La identificación molecular bacteriana está basada en técnicas moleculares tales como la amplificación mediante el uso de la PCR (por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*), la secuenciación de nucleótidos para determinar las secuencias específicas y el análisis y comparación de secuencias de los genes ADNr 16S (o ARNr 16S) [14]. El objetivo de este trabajo fue extraer e identificar cepas nativas de BALs de longanizas artesanales de cabra que actúan como bioconservadores y con potencial biotecnológico para elaborar cultivos iniciadores bacterianos, e incluirlos en el esquema tecnológico de elaboración artesanal de la longaniza para su conservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras artesanales de longanizas de carne de cabra (*Capra hircus*), fueron obtenidas de productores de caprinos del municipio Sucre. Dos muestras de la localidad de La Cruz de Taratara, parroquia Sucre, tres muestras de la localidad de Santa Cruz de Pecaya y tres muestras de la localidad de el Paraíso, ambas parroquias del municipio Sucre del estado Falcón. Para el aislamiento de BALs se prepararon las muestras de acuerdo con las Normas Venezolanas de Alimentos COVENIN, para alimentos, identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico [15], adaptadas para aislamiento de bacterias ácido lácticas. De cada una de las muestras, se pesaron 10 g y se colocaron en 90 mL de caldo *Lactobacillus* MRS (*Man Rogosa y Sharpe; Research Products International Corp.* EUA). Las muestras se incubaron en estufa a 37°C por 48 h, y se procedió a realizar la siembra por estrías sobre agar MRS (*HiMedia Laboratories*

Pvt. Ltd Mumbai, India). Luego, las muestras se colocaron en estufa en placas invertidas a 37°C por 24-48 h, en campanas de desecación sin sílica gel, en anaerobiosis con 5-10% de CO₂, hasta el crecimiento y desarrollo de colonias visibles. Se seleccionaron las colonias que se encontraban aisladas, con morfología similar en todas las placas y se sembraron en agar MRS para obtener colonias aisladas puras; las colonias de cada placa fueron observadas con objetivo 10X en un microscopio *Carl Zeiss*. Para observar la morfología de las colonias, se tomaron seis colonias de cada placa al azar, que presentaron colonias aisladas con características similares en todas las muestras, seleccionándose un total de 48 colonias. Posteriormente, se seleccionaron tres grupos de colonias. Se realizó la tinción de Gram, resultando todas Gram positivas, observándose 21 colonias opalescentes convexas y con bordes lisos, que resultaron ser bacilos cortos rectos, con extremos redondeados, formando cadenas cortas, largas y algunos individuales; 11 colonias blanco lechoso con centro deprimido y bordes lisos forma celular bacilos cortos en pares, cadenas cortas o largas, ligeramente curvados y extremos redondeados; 16 colonias blanco cremoso con bordes lisos, tenían forma de cocos individuales o tétradas. Luego, se realizó la prueba de la catalasa para lo cual se utilizó láminas porta objeto estériles y peróxido de hidrógeno al 50% (Laboratorio Farmaquímica C.A.). Se utilizó como control positivo una cepa de *Staphylococcus aureus* y como control negativo una cepa de *Staphylococcus epidermidis*; 32 de los aislados con forma de bacilos rectos y curvos cortos a la tinción de Gram, resultaron catalasa negativos y 16 aislados con forma de cocos presentaron actividad positiva a la catalasa. Para confirmar los resultados de esta prueba, se realizó la prueba de la oxidasa, se utilizó el reactivo de Kovac (solución acuosa de tetrametil p-fenilendiamina al 1%), papel de filtro Watman N° 2 (1x1 cm) estéril, palillos de madera y placas de petri estériles. Se utilizó un control positivo *Pseudomonas aeruginosa* y un control negativo *Escherichia coli*, los resultados de la prueba de oxidasa fueron negativos para todos los los aislados: F1VEN, bacilos cortos y rectos con extremos redondeados; F2VEN, bacilos cortos curvados con extremo terminal redondeados y F3VEN, cocos individuales o tétradas. Para las pruebas de fermentación, se utilizó una batería de azúcares para diferenciar los cultivos, de acuerdo a las claves

del *Bergey's Manual of Bacteriology Determinative* (1957) [13]. Los aislados *F1VEN*, 21 colonias con forma de bacilos que crecieron en agar MRS, catalasa y oxidasa negativos, fermentaron los azúcares glucosa, manitol, celobiosa y melezitosa, y resultaron negativo para maltosa, la cual representó el 43,75% de los aislados; *F2VEN*, 11 de las colonias con forma de bacilos cortos curvos, resultaron positivos para manosa y negativos a celobiosa, manitol y melezitosa, los cuales representaron el 22,92%, permitiendo colocar estos aislados en el género *Lactobacillus*, pero especies diferentes. Los aislados *F3VEN*, 16 colonias se correspondían a cocos Gram positivos, fermentaron arabinosa, galactosa, lactosa, maltosa y ribosa, resultaron negativos para manitol, sorbitol y melezitosa, estos aislados representan el 33,33%.

Extracción de ADNg de Bacterias Ácido Lácticas

Para los aislados *F1VEN*, *F2VEN* y *F3VEN* seleccionados, se utilizó el protocolo modificado de Wilson [16]. Las cepas que fueron aisladas y purificadas previamente, se inocularon en 5 mL de caldo MRS. Se incubaron 24-48 h a 37°C hasta que se observó turbidez en el medio; luego, se procedió a realizar las extracciones de ADN genómico bacteriano. Los *pellets* de ADN obtenidos se resuspendieron en 25 μ L de búfer TE 1X y se dejaron 24 h a temperatura ambiente y protegidos de la luz; luego, se guardó en congelación a -20°C, hasta realizar la electroforesis.

Electroforesis en Gel de Agarosa para Determinar Presencia y Cuantificar ADN Bacteriano

El ADN resultado de la extracción fue sometido a una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% con 2 μ L c.s.p. 100 mL agente intercalante SYBR™ Safe DNA gel Stain. El gel fue colocado en una cámara de electroforesis horizontal, luego fue cubierto con búfer de electroforesis TBE 0,5X. Cada muestra de ADN (1 μ L) por separado se preparó en un micro tubo *ependorf* y se mezcló con 2,5 μ L de búfer de carga, conteniendo azul de bromo fenol que facilita visualizar la sedimentación del ADN o el producto de PCR en el pozo y el frente de corrida en el gel. Se usó como marcador molecular 1 μ L del marcador Lambda (λ) de ADN, de peso 100 ng/ μ L (Promega), el cual también se mezcló con 2,5 μ L de búfer

de carga. Posteriormente, cada muestra fue colocada en un pozo y se identificó el orden en el que fueron colocadas. En el caso del marcador molecular, éste fue colocado en el primer carril; una vez identificada la posición y el orden de colocación de las muestras en el gel. Se colocó la tapa de la cámara de electroforesis y se conectó a la fuente de corriente, seleccionándose el voltaje 2 V/cm y ajustando el tiempo de corrida a 45 min. Se fotografiaron los geles en un digitalizador de imágenes Uvitec (modelo uvipro Chemi transiluminador con luz ultra violeta). En la Figura 1, se muestran las bandas de ADN obtenidas del marcador molecular y los aislados *F1VEN*, *F2VEN* y *F3VEN*, a los cuales se cuantificó la concentración de ADN con el programa *Quantiti one* de Bio-Rad Laboratories.

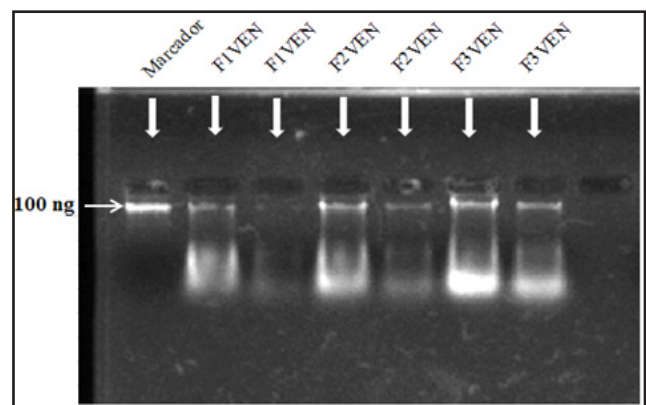


Figura 1. Bandas de ADN obtenidas de los aislados *F1VEN*, *F2VEN* y *F3VEN*, en gel de agarosa al 1%. En el carril 1 se observa el marcador molecular lambda, de peso molecular 100 ng/mL. En los carriles 2-3 ADN de aislado *F1VEN*, en los carriles 4-5 ADN de aislado *F2VEN* y en los carriles 6-7 aislado *F3VEN*

Amplificación de Fragmentos de ADN Bacterianos

Para la amplificación de los fragmentos de ADN se utilizaron dos oligonucleótidos o cebadores universales, empleados previamente por López *et al.* [17], HDA1 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3' (nucleótidos 349 a 369) y WLAB2 5'-TCGAATTAAACCACATGCTCCA-3' (nucleótidos 951 a 972), (*euofins mwg/operon*). Estos cebadores amplifican aproximadamente 623 pares de base de la región (V3-V4-V5), que codifica para la secuencia parcial del gen ADNr 16S de *L. plantarum* (número de acceso del *Gene Bank* AJ271852 (Figura 2). Estos cebadores fueron los usados para la amplificación de los segmentos del gen ADNr 16S de los aislados bacterianos, como paso previo a la purificación y secuenciación de los productos resultados de la amplificación por la PCR.

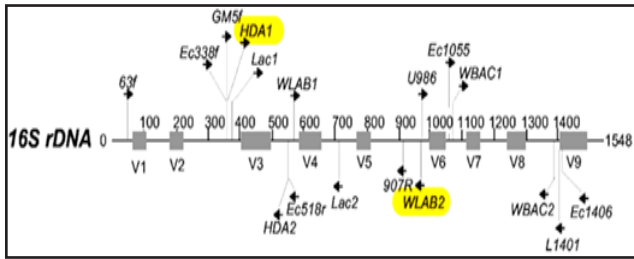


Figura 2. Posición relativa de los cebadores HDA1 y WLAB2 sobre la secuencia parcial del gen ADNr 16S de *Lactobacillus plantarum* número de acceso Gene Bank AJ271852. Tomado de López et al. [17]

Para establecer la temperatura de hibridación (Tm) de los cebadores, se llevó a cabo el cálculo de las temperaturas de hibridación con el programa *Oligocalc oligonucleotide properties calculator* (biotools.nubic.northwestern.edu/Oligocalc.html), para los cebadores (HDA1 y WLAB2). Se tomó la temperatura de referencia de 58,4 °C (*salt adjusted*) y se calcularon las temperaturas de hibridación con 5°C de amplitud en el programa BIOER del equipo de PCR, (Termociclador modelo *GenePro*, marca BIOER), donde se obtuvo 12 temperaturas (Cuadro 1) para amplificar el ADN bacteriano, con los cebadores HDA1 y WLAB2.

Se llevó a cabo una reacción de amplificación (PCR), para establecer la mejor temperatura de hibridación; para esta reacción se utilizó un marcador molecular *Bench Top* (Promega) de 1500 pb, con una banda intensa intermedia de 500 pb y ADN control de *L. plantarum*, cedido por el laboratorio de biotecnología animal de la ESAT; con los productos resultados de la amplificación se procedió a realizar una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Figura 3), visualizándose los producto resultado de la amplificación y se tomó la temperatura de 59,3°C, carril 8, donde se obtuvo una banda bien definida con mejor calidad de producto y menos reacciones inespecíficas.

RESULTADOS

Amplificación de Fragmentos de ADN de Aislados Bacterianos

Se estableció el perfil de amplificación en 95°C durante 5 min, 95°C x 30 seg, temperatura de hibridación 59,3°C durante 30 ciclos, 72°C durante 40 seg, 72°C durante 10 min, 10°C durante 59 seg. Se preparó la mezcla de PCR calculada en el programa

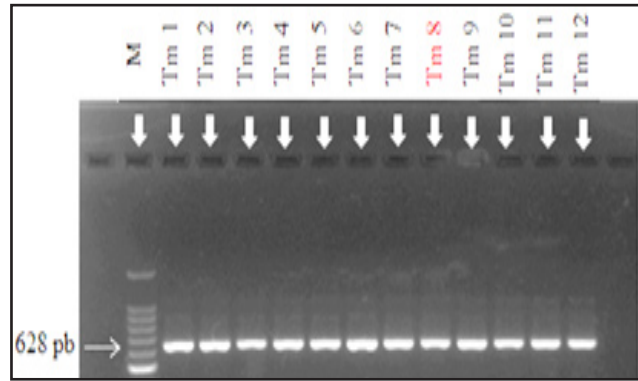


Figura 3. Gel de agarosa al 2%, se muestra los resultados de amplificación con cebadores HDA1 y WLAB2 para establecer la mejor temperatura de hibridación de los cebadores

BIOMETRA PCR mastermix), la cual parte de una solución madre de concentración de búfer de PCR 5X, solución de magnesio 25 mM, dNTPs 10 mM cada uno, cebadores HDA1 y WLAB2 10 μ M, Taq polimerasa 5,0 U/ μ L y ADN 20 ng/ μ L; por lo que la concentración final de cada reacción fue búfer de PCR 1,0X, solución de magnesio 1,5 mM, dNTPs 1,5 mM (cada uno) cebadores HDA1 0,2 μ M y WLAB2 0,2 μ M, Taq polimerasa 0,6 U/ μ L y ADN 20 ng/ μ L. Luego, se preparó los volúmenes finales para cada reacción con la concentración final de PCR, los cuales contenían 3,0 μ L de búfer de PCR, 0,90 μ L de solución de Mg, dNTPs 0,15 μ L, cebador HDA1 0,30 μ L, cebador WLAB2 0,30 μ L, 0,12 μ L de Taq polimerasa, 6,23 μ L de agua estéril ultra pura y 4 μ L de ADN del aislado, para un volumen total de 15 μ L. En la Figura 4, se presentan los resultados de la amplificación de los aislados bacterianos *F1VEN*, *F2VEN* y *F3VEN*.

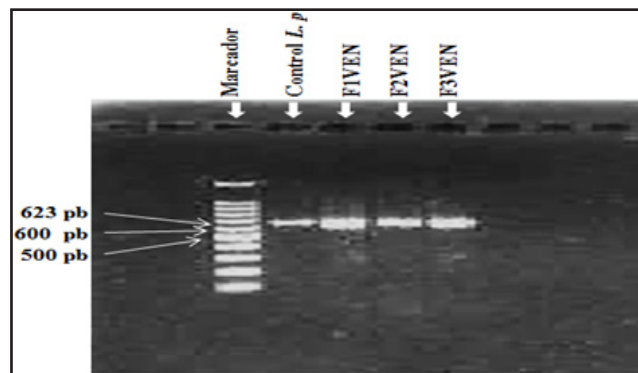


Figura 4. Productos resultado de la amplificación del ADN bacteriano obtenido de longanizas de cabra. Se observan en el carril 1 (izquierda) el marcador de peso molecular, con bandas de 100 pb y una banda de mayor intensidad de 500 pb. En el carril 2, se muestra una banda de 623 pb, producto amplificado de una cepa control de *L. plantarum*. En los carriles 3 (*F1VEN*), 4 (*F2VEN*) y 5 (*F3VEN*), los productos amplificados, con bandas de 623 pb

Cuadro 1. Temperaturas de hibridación calculadas para la amplificación del ADN de los aislados bacterianos

T _m 1	T _m 2	T _m 3	T _m 4	T _m 5	T _m 6	T_m 7	T _m 8	T _m 9	T _m 10	T _m 11	T _m 12
55,0	55,1	55,4	55,9	56,6	57,4	58,4	59,3	60,0	60,5	60,8	661,0

T_m= temperatura de hibridación

La purificación del ADN de los productos de amplificación de PCR se llevó a cabo con un *kit* comercial (marca *Accuprep PCR purification kit Bioneer Global Genomic*), como paso previo a la secuenciación de los productos resultados de la PCR y la secuenciación de los fragmentos de ADNr 16S, producto de amplificación, se llevó a cabo por servicio de secuenciado en Macro Gene (Korea del Sur), Figura 5.

Las secuencias parciales obtenidas se alinearon y se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos del *GenBank*. Esta alineación se llevó a cabo mediante el uso del programa *BLAST* (por sus siglas en inglés *Basic Local Alignment Search Tool*), herramienta de búsqueda de alineamientos locales básicos del NCBI (por sus siglas en inglés *National Center for Biotechnology Information*), para la búsqueda de secuencias de nucleótidos y la alineación correspondiente y así obtener la similitud con dichas secuencias, con el fin de establecer la identificación de las cepas motivo de investigación. Los productos de la secuenciación se alinearon con secuencias parciales del gen ADNr 16S depositadas en la base de datos del

GenBank, para establecer el porcentaje de similitud de la secuencia de los aislados con las secuencias de la base de datos. Se estableció el porcentaje de similitud para cada una de las secuencias. Para el aislado *F1VEN* el resultado fue de un 100% de similitud con cepas de *Lactobacillus plantarum*. Para *F2VEN*, se observó un 99% de similitud con cepas del género y especie *Lactobacillus brevis*, y para el aislado *F3VEN*, un 99% de similitud con cepas del género y especie *Pediococcus pentosaceus*; esta identificación origina las cepas nativas L.p *F1VEN*, L.b *F2VEN* y P.p *F3VEN*. Al ser aisladas de productos naturales artesanales poseen una alta capacidad para desarrollarlos como cultivos iniciadores bacterianos, con la finalidad de aumentar el tiempo de vida útil de estos embutidos artesanales.

DISCUSIÓN

La longaniza de cabra artesanal al ser elaborada naturalmente, sin aditivos químicos ni cultivos iniciadores bacterianos añadidos, mantiene bacterias ácido lácticas nativas propias de este ambiente, que se

> *F1VEN*< Secuencia parcial resultada (603 nt)
 ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGC GGCCGTA CTCCCAGGCGGAATGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCATTATCATCGTTTACGGTATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTACCCATCTTTGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCTCCATATATCTACGCATTTCCACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTTCTGCACTCAAGTTCCAGTTTCCGATGCACCTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAACCGCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTAAATACCGTCAATACCTGAACAGTTACTCTCAGATATGTTCTTCTTTAAACAACAGAGTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCAGCGCGGCTTGTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGC

> *F2VEN*< Secuencia parcial resultada (602 nt)
 ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGC GGTCGTA CTCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCATTATCATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTACCCATGCTTTGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGACTAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCTCCATATATCTACGCATTTCCACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCGATGCACCTTCTTCGGTTAAGCCGAAGGCTTTCACATCAGACTTAAAAACCGCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTAAATACCGTCAACCCTGAACAGTTACTCTCAAAGGTGTTCTTCTTTAAACAACAGAGTTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCAGCGGCATTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGC

> *F3VEN*< Secuencia parcial resultada (614 nt)
 ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGC GGTCGTA CTCCCAGGCGGATTACTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGTAATCATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTACCCATGCTTTGAGCCTCAGCGTCAGTTGCAGACCAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCTCCATATATCTACGCATTTCCACCGCTACACATGGAGTTCCACTGTCCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGCACCTTCTTCGGTTGAGCCGAAGGCTTTCACATTAGACTTAAAGACCGCTGCGCTCGCTTTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTAAATACCGTCACTGGGTAACAGTTACTCTTACCCAGTCTTCTTCTTTAAACAACAGAGCTTACGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCAGCGCGGCTTGTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCGGTAGGAGT

Figura 5. Secuencias parciales resultadas de los aislados *F1VEN* (603 nt), *F2VEN* (602 nt) y *F3VEN* (614 nt) secuencias parciales del gen ADNr 16S

desarrollan y permanecen en la carne de cabra; estas bacterias bajo estas condiciones presentan un potencial biotecnológico como cultivos iniciadores para la conservación de las longanizas, esto permitió extraer e identificar a través de métodos microbiológicos convencionales y métodos moleculares como la PCR y la secuenciación, tres aislados nativos de esta fuente natural: *Lactobacillus plantarum* L.p.F1VEN, *Lactobacillus brevis* L.b.F2VEN y *Pediococcus pentosaceus* P.p.F3VEN; Asimismo, se plantea que la materia prima (carne) por su composición química y características biológicas, permiten el desarrollo de microorganismos patógenos, como consecuencia hay disminución del tiempo de vida útil [2]; algunos autores [8, 18-20], plantean que las BALs, constituyen o forman parte de la microflora inicial que se desarrolla en la carne; también se plantea [21], que la carne cruda es altamente sensible al deterioro por la acción microbiana por sus propiedades naturales como la actividad de agua (aw), el pH y nutrientes; por esto se hacen esfuerzos para desarrollar cepas bacteriocinogénicas y bacteriocinas en función de la materia prima, condición de procesamiento, distribución y el consumo [12]; esto sugiere que al menos estos aislados identificados, se encuentran presentes en estos embutidos artesanales formando parte de la microbiota habitual de la carne de cabra; que al ser extraídas de su hábitat natural pueden servir como cepas desarrolladas o cultivos iniciadores efectivos en el proceso de conservación de estos embutidos. Algunos autores [22] sugieren que estas bacterias ácido lácticas, pueden llegar a sustituir el uso de nitritos, pero es necesario para esto determinar la bacteriocina y el número de BALs para la conservación de los embutidos.

CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

El uso de cebadores universales HDA1 y WLAB2 que amplifican parcialmente el gen ADN_r 16S (o ARN_r 16S), las regiones variables (V3,V4,V5) a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación, permitió la obtención de secuencias nucleotídicas que fueron alineadas con secuencias depositadas en la base de datos del *GenBank*, comparándose y estableciéndose la similitud para la identificación de las BALs [13]. La longaniza artesanal de cabra es una fuente natural de bacterias ácido lácticas para desarrollar cultivos

iniciadores mediante pruebas previas de confirmación del potencial biotecnológico para la conservación de estos embutidos, ya que al ser aislados de esta fuente y desarrollados como cultivos iniciadores, pueden ser añadidos en cantidad suficiente para obtener un embutido con mejores cualidades alimenticias, de conservación y probióticas. Se logró la identificación de tres aislados nativos de esta fuente natural con potencial biotecnológico para la conservación de longanizas, al ser incorporadas como cultivos iniciadores en la elaboración de longanizas artesanales de cabra (*Capra hircus*).

AGRADECIMIENTOS

A los productores de caprinos del municipio Sucre, parroquias Sucre y Pecaya del estado Falcón que elaboran las longanizas artesanales de cabra objeto de esta investigación. Al Centro de Investigaciones Lácteas de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), de la UCV; al Laboratorio de Análisis Proximal de la Carne y Productos Cárnicos de la FCV-UCV; al Laboratorio de Biotecnología Agrícola Animal de la Escuela Socialista de Agricultura Tropical del INIA; al Laboratorio de Biotecnología y Virología Vegetal, Centro de Microbiología Celular del IVIC, Caracas-Venezuela. A la Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Central de Venezuela, a la Prof. Ana Zuley Ruíz, Editora y T.S.U Yraiceles Jiménez, diagramadora, por el apoyo recibido para la publicación de este artículo.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran expresamente que no hubo conflicto de intereses durante el desarrollo de este trabajo.

APORTE DE LOS AUTORES AL TRABAJO

AJB: Autoría, diseño y desarrollo de investigación, análisis de muestras, resultados, metodologías y Revisión bibliográfica. MLC: Asesoría técnica profesional, manejo de muestras, ensayos, análisis de resultados. revisión bibliográfica. BSM: Tutor de investigación, Revisión bibliográfica, revisión de manuscrito y análisis de resultados. AFM; BV; ODLR ERR: Asesoramiento y soporte técnico, revisión metodológica, revisión bibliográfica y análisis de resultados. JT,

ATS: Asesoramiento profesional, apoyo técnicos y aspectos logísticos y revisión bibliográfica.

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Conferencia Mixta FAO/OMS sobre Aditivos Alimentarios. 1956. Serie de Informes Técnicos N°107. Ginebra 19-22 de Septiembre de 1955; p. 16.
2. García T, Martín R, Sanz B, Hernández PE. Extensión de la vida útil de la carne fresca. Envasado en atmósfera modificada y utilización de bacterias ácido lácticas y bacteriocinas, *Rev Esp Cienc Tecnol Alim.* 1995; 35 (1): 1-18.
3. Moreira Dos Santos W. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producidas por *Pediococcus* sp 347 de origen cárnico. Tesis Doctorado. Departamento de Nutrición y Bromatología III. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Madrid –España; 1993.
4. Cintas LM, Casaus MP, Herranz C, Nes IF, Hernández PE. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Sci Technol Inter.* 2001; 7(4): 281-305.
5. Vázquez SM, Suarez H, Zapata S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Rev Chilena Nutri.* 2009; 36(1): 64-71.
6. Hugas M, Garriga M, Aymerich MT, Monfort JM. Bacterial cultures and metabolites for the enhancement of safety and quality in meat products. En: Toldrá F, (Ed.), *Research Advances in the Quality of Meat and Meat Products.* Trivandrum, India Research Signpost: 2002; p. 225-47.
7. Deegan LH, Cooter PH, Hill C, Roos P. Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and self-life extension. *Int. Dairy J.* 2006; 16: 1058-1071.
8. Hugas M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Sci.* 1998; 49(1): 139-150.
9. Todorov SD, Vaz-Velho M, Gibbs P. Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocina produced by *Lactobacillus plantarum* ST31. *Brazilian J Microb.* 2004; 35: 157-160.
10. Jami G, Kneifel W, Domig K. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocinas produced by *Lactobacilli* isolated from Sturgeon fish. *Food Control.* 2013; 32: 375-389.
11. Dolz MC. Bacteriocinas de probióticos. Nuevos enfoques bioterapéuticos: PINHE *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria.* 2008; 28 (3): 20-37.
12. Todorov SD. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* production, genetic organization and mode of action. *Brazilian J Microb.* 2009; 40: 209-221.
13. Breed Robert S, Murray EGD, Smith Nathan R. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.* The Williams & Wilkins Company. Seventh Edition. 1957; p.1130.
14. Rodicio MR, Mendoza MC. Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2004; 22(4): 238-45.
15. Norma Venezolana COVENIN Alimentos Identificación y Preparación de Muestras para el Análisis Microbiológico. 1126-1989. (1^{ra} Revisión). p. 11.
16. Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology.* 1997; suppl. 27. 2.4.1-2.4.5.
17. Lopez I, Ruiz-Larrea F, Cocolin L, Orr E, Phister T, Marshall M, *et al.* Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(11):6801-6807.
18. Schillinger U, Lucke FK. Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiol.* 1987; 4:199-208.
19. Schillinger U, Lucke FK. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989; 55:1901-1906.
20. Lewus C, Kaiser A, Montville T. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl Environ Microbiol.* 1991; 57(6): 1683-1688.
21. Sant'Anna V, Deoni AF, Motta AS, Brandelli A. research paper; Antibacterial activity of bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* in chicken sausage. *Braz J Microbiol.* 2013; 44(4):1163-1167.
22. Rojas C, Vargas P. Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria *Tecnología en Marcha.* 2008; 21(2):9-16.