



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS DE PRODUCTOS CÁRNICOS PARA EL
CULTIVO DE BACTERIAS LÁCTICAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

INGRID CONCEPCIÓN HERNÁNDEZ GONZÁLEZ



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 Meléndez

VOCAL: **Profesor:** Israel García Cano

SECRETARIO: **Profesor:** Diana Ivonne Rocha Mendoza

1er. SUPLENTE: **Profesor:** Carmina Montiel Pacheco

2° SUPLENTE: **Profesor:** Eva Patricia Bermúdez García

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO S-132, DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA, DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA.

COMO PARTE DEL PROYECTO DENOMINADO “CONTINUACIÓN DEL PROYECTO DE INCORPORACIÓN DE LISADOS CELULARES DE BACTERIAS LÁCTICAS COMO INGREDIENTES NATURALES Y EVALUACIÓN DE NUEVOS INGREDIENTES PARA LA ELABORACIÓN DE PRODUCTOS CÁRNICOS” CONVENIO UAM-EMPACADORA MURGATI S.A DE C.V. PROYECTO NO. 232144 DEL PROGRAMA DE ESTÍMULOS A LA INNOVACIÓN 2016, MODALIDAD INNOVAPYME 2016.

ASESOR DEL TEMA

Dr. Israel García Cano

SUPERVISOR TÉCNICO

Dra. Edith Ponce Alquicira

SUSTENTANTE

Ingrid Concepción Hernández González

APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS DE PRODUCTOS CÁRNICOS PARA EL CULTIVO DE BACTERIAS LÁCTICAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Productos cárnicos	2
Salchicha	3
Jamón	3
Queso de puerco	4
Chorizo	4
Tocino ahumado	5
Crecimiento microbiano	5
Efecto del medio de cultivo en el crecimiento y metabolismo microbiano	7
Bacterias ácido lácticas (BAL)	8
Compuestos con efecto antimicrobiano	9
Enzimas de interés producidas por BAL	10
Proteasas	10
Lipasas	10
Péptidos de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana	10
Peptidoglucano hidrolasas (PGH)	11
ANTECEDENTES	13
<i>Lactobacillus sakei</i>	14
<i>Enterococcus faecium</i>	14
<i>Pediococcus acidilactici</i>	16
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18

METODOLOGÍA	19
Procedencia y recepción de las muestras	19
Análisis químico proximal	19
Formulación de medios de cultivo	20
Cinéticas de crecimiento	21
Determinación de la curva de crecimiento	21
pH	22
Determinación de la velocidad específica de crecimiento (μ)	22
Obtención de sobrenadante	22
Cuantificación de proteína	22
Detección de la actividad antimicrobiana	23
Detección de actividad lipolítica	23
Detección de actividad proteolítica	24
Precipitación de proteínas con TCA.....	24
Electroforesis.....	24
Determinación del perfil proteínico	24
Determinación de actividad lítica por zimograma	25
Determinación de actividad proteolítica por zimograma.....	25
Determinación de actividad lipolítica por zimograma	26
Análisis estadístico	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
Análisis químico proximal	27
Estandarización medios de cultivo.....	30
Cinéticas de crecimiento	33
<i>Lactobacillus sakei</i> UAM-MGJP1	35
<i>Enterococcus faecium</i> MXVK29	38
<i>Pediococcus acidilactici</i>	41
Pruebas presuntivas en difusión en agar	48
Determinación del perfil proteínico, de la actividad lítica, proteolítica y lipolítica mediante zimogramas en SDS-PAGE.....	53
CONCLUSIONES.....	57
PERSPECTIVAS.....	58
REFERENCIAS.....	59

RESUMEN

La generación de desechos orgánicos de la industria cárnica es un problema ambiental; es por eso que se busca crear nuevas alternativas para el uso de estos residuos. Una estrategia es emplear los desechos cárnicos como medios de cultivo para el crecimiento de diferentes bacterias ácido lácticas (BAL) utilizadas en la industria cárnica como cultivos iniciadores.

Se realizó el análisis químico proximal de cinco diferentes residuos cárnicos: salchicha, jamón, queso de puerco, tocino y chorizo. Se compararon y estandarizaron con medios de cultivo comerciales (CGB y MRS). Se determinó la cinética de crecimiento por conteo en placa de 4 cepas: *Lactobacillus sakei* UAM-MGJP1, *Enterococcus faecium* MXVK29, *Pediococcus acidilactici* MXVK133 y *Pediococcus acidilactici* UAM-MGP1. Se evaluó la actividad antimicrobiana por zimografía contra *Micrococcus lysodeikticus* y por difusión en agar contra microorganismos patógenos y BAL.

Enterococcus faecium MXVK29 en el medio de cultivo de salchicha tuvo la mayor velocidad de crecimiento, medio que en composición se caracterizó por su bajo contenido de nitrógeno y grasa, 0.15 y 1.35% respectivamente. Por otro lado, *Pediococcus acidilactici* MXVK133 en medio de queso de puerco tuvo la menor velocidad de crecimiento, medio que tiene 3.47% de grasa y 0.54% de nitrógeno, sin embargo no en todos los casos se observó que el contenido de proteínas o grasa estuvieran directamente relacionados con la velocidad de crecimiento.

Dado el efecto de los constituyentes del medio de cultivo y de las condiciones de crecimiento sobre la producción de metabolitos y de enzimas como proteasas, lipasas y enzimas con actividad antibacteriana. Se determinaron las actividades antimicrobianas por difusión en agar, actividad lipolítica en agar tributirina y actividad proteolítica en agar Skim Milk. *L. sakei* UAM-MGJP1, *E. faecium* MXVK29, *P. acidilactici* MXVK133 y *P. acidilactici* UAM-MGP1 son capaces de crecer en medios de cultivo realizados a partir de residuos de productos cárnicos, con la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana, proteolítica y lipolítica.

INTRODUCCIÓN

Productos cárnicos

Los productos cárnicos son los elaborados con carne procedente de una o varias especies animales de abasto, con o sin la adición de grasa, con o sin condimentos, especias y aditivos, y sometidos a tratamientos de desecación, cocción, salazón, embutido o cualquier otro proceso de transformación. La FAO los clasifica de la siguiente forma:

Productos cárnicos procesados crudos: estos productos consisten en carne cruda y tejido adiposo a los que se añaden especias, sal común y en algunos casos, aglutinantes. Si las mezclas de carne fresca se embuten en tripas, el producto se conoce como “salchicha”.

Productos cárnicos curados: en estos productos se usan las partes del músculo. Pueden subdividirse en carnes curadas crudas y carnes curadas cocidas. El proceso de curado es similar para ambos tipos. La carne se trata aplicando pequeñas cantidades de sal, bien por vía seca, inyectando la carne y/o sumergiéndola en una solución salina. Las carnes curadas crudas son productos sometidos a curación, secado, fermentación y maduración sin tratamiento térmico posterior. Generalmente se consumen crudos. Productos típicos de este grupo son el jamón serrano o el jamón de Parma. Las carnes curadas cocidas se someten siempre a tratamiento térmico después de un breve proceso de curación a fin de obtener la palatabilidad deseada. Productos típicos de este grupo es el jamón de York o el jamón tipo Virginia

Productos cárnicos precocinados-cocinados: Estos productos pueden contener mezclas de recortes de músculo de calidad inferior, tejidos adiposos, carne de la cabeza y piel del animal, hígado y otras partes comestibles. En general, el proceso de fabricación comprende dos fases de tratamiento térmico. La primera fase consiste en el precocinado de los materiales cárnicos crudos y la segunda en la cocción de la mezcla resultante final. Ejemplo de estos productos es el paté.

Embutidos crudos-fermentados: consisten en una masa de carnes magras y tejidos adiposos mezclada con sal de curado, azúcares, especias y otros ingredientes no cárnicos, que suele embutirse en tripas. Su sabor, textura y color característicos se deben a la fermentación unida a la reducción de la humedad. Los productos finales no se someten a tratamiento térmico y se distribuyen y consumen crudos. Productos típicos de este grupo son el chorizo y las salchichas tipo salami.

Entre 2007 y 2014 la producción de embutidos en México aumentó 30.4%, de acuerdo a la Asociación Nacional de Establecimientos TIF (ANETIF).

De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), durante 2014 la producción de embutidos en México fue de 863 mil toneladas; de la cual la producción de salchicha y jamón representó el 90%, mientras que el restante correspondió a productos como queso de puerco, chorizo, longaniza, tocino y mortadela.

Salchicha

De acuerdo a la NMX-F-065-1984, se entiende como salchicha al producto alimenticio embutido de pasta semifirme de color característico, elaborado con la mezcla de carne (60% mínimo) de ternera de res, cerdo y grasas de las especies antes mencionadas, adicionando de condimentos, especias y aditivos para alimentos.

Jamón

De acuerdo a la NOM-158-SCFI-2003, se denomina jamón al producto alimenticio, elaborado exclusivamente con la carne de las piernas traseras del cerdo *Suis scrofa domesticus*, declarados aptos para el consumo humano por la autoridad responsable, de acuerdo con los criterios y especificaciones de dicha norma.

En otras palabras, es la pierna trasera del cerdo, en forma especial con o sin hueso, fraccionada, curada en seco o con salmuera, cocida o cruda,

condimentada o no, ahumada o no, forjada o no en molde rígido o flexible de forma tradicional.

Queso de puerco

La NMX-F-141-1969, define como queso de puerco al producto alimenticio preparado con las partes carnosas adiposas y cutáneas del cerdo, principalmente de la cabeza, que han sido curadas, picadas en trozos pequeños y adicionadas con sal y especias, cocidas y prensadas.

El curado de queso de puerco se efectúa sometiendo las partes de la cabeza y demás carne y cueros en salmuera preparada con una mezcla de cloruro de sodio, nitritos y nitratos de sodio, fosfatos y azúcares, condimentos, saboreadores y conservadores, en cantidades permitidas por la Secretaría de Salubridad y Asistencia, enfriando la carne antes curada, de 0 a 7 °C por tiempo variable a criterio del productor.

Chorizo

La NOM-145-SSA1-1995 clasifica al chorizo como un producto cárnico cuya carne curada, fue troceada o picada hasta lograr trozos no menores de 2 mm, pudiendo ser crudo, madurado -por medio de cultivos microbianos y/o de la adición de azúcares- cocidos o no y ahumados o no.

Se elabora con carne de res, cerdo y otras especias en combinación con grasa de cerdo y condimentos, adicionado con aditivos que mejoran las características organolépticas y permiten ampliar su periodo de conservación.

Por ser un producto cárnico crudo la materia prima es determinante de la calidad del producto final, (60-70%) carne magra y (40-30%) de grasa finamente picados e incorporados en una mezcla con las especias que se somete a maduración por fermentación (lactobacilos) y maduración (desección).

Tocino ahumado

Se entiende por tocino al producto obtenido del tejido adiposo de la pared abdominal del cerdo con o sin piel y sometido a procesos de curado y ahumado (NMX-F-126-1969).

El curado del tocino se efectúa con salmuera preparada con una mezcla de cloruro de sodio, nitrito, nitrato de sodio, fosfatos, condimentos, azúcares, conservadores, en las cantidades permitidas por la Secretaría de Salud.

Para el ahumado del tocino, se emplean maderas cuya clase quedarán a juicio del productor, así también las condiciones de tiempo y temperatura.

Debido a que muchos de estos productos cárnicos no tienen ningún tratamiento térmico que permita reducir la carga microbiana presente en la materia prima son susceptibles al ataque microbiano, por tal motivo es indispensable conocer la microbiota, la velocidad y tipo de crecimiento de los microorganismos presentes.

Crecimiento microbiano

El crecimiento se define como un aumento en el número de células microbianas de una población. En un cultivo en lote, el número de células graficado contra el tiempo, presenta una curva de crecimiento que, como se observa en la Figura 1, se divide en fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (Madigan, *et al.*, 2009).

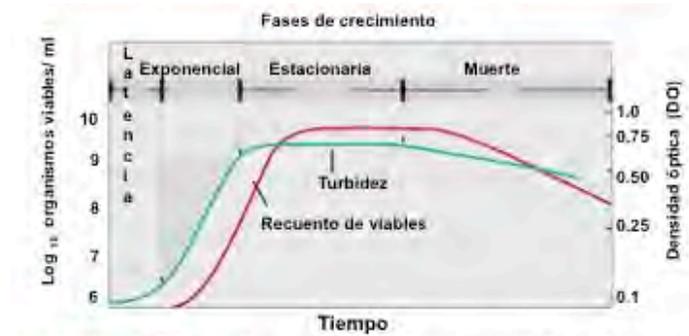


Figura 1. Curva de crecimiento (Madigan *et al.*, 2009).

Cuando se inocula una población microbiana en un medio fresco, por lo general, el crecimiento no comienza inmediatamente, sino tras un periodo que constituye la

fase de adecuación o latencia, la cual puede ser breve o larga dependiendo de la procedencia del cultivo y de las condiciones de crecimiento. Si un cultivo proveniente de una fase exponencial se inocula en el mismo medio y en las mismas condiciones de cultivo, no se observa una fase de adecuación y el crecimiento logarítmico se inicia inmediatamente. Sin embargo, cuando se transfiere una población de un medio rico en nutrientes a otro con menor contenido de éstos, se presentará una fase de adecuación.

La fase exponencial es una consecuencia de la división celular, donde cada célula se divide para formar dos, cada una de las cuales va a formar otras dos, y así sucesivamente. En general, las células en crecimiento exponencial están en el estado fisiológico más sano y, por ello, son a menudo las más indicadas para estudios enzimáticos y estructurales. La mayoría de los microorganismos unicelulares crecen exponencialmente pero las velocidades del crecimiento logarítmico son muy variables ya que se afectan por las condiciones ambientales y por las características genéticas del organismo. Este tipo de crecimiento no se puede prolongar de modo indefinido, ya que generalmente un nutriente esencial del medio de cultivo se usa por completo y se convierte en un factor limitante del crecimiento, o bien, se acumulan en el medio productos finales del metabolismo (ácidos orgánicos o alcoholes) y enzimas autolíticas, del tipo de las proteasas y de las nucleasas, que actúan como inhibidores de crecimiento. Frecuentemente ocurren ambos eventos. Esto provoca que la población alcance la fase estacionaria, en la cual no hay aumento ni descenso neto en el número de células. Muchas funciones celulares continúan, como el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos. En algunos casos puede ocurrir un crecimiento lento durante la fase estacionaria: aunado al crecimiento de algunas células ocurre la muerte de otras y los dos procesos se equilibran, de modo que no hay aumento ni disminución en el número de células, fenómeno llamado crecimiento crítico (Madigan *et al.*, 2009).

Si la incubación continúa después de que la población alcanzó la fase estacionaria, las células pueden continuar vivas y metabólicamente activas, pero

también pueden morir. Si ocurre esto último, se dice que la población está en fase de muerte (Madigan *et al.*, 2009).

El crecimiento celular y la acumulación de productos del metabolismo están fuertemente influenciados por la composición del medio de cultivo, fuente de nitrógeno, factores de crecimiento y sales inorgánicas (Contreras, 2013).

El crecimiento se mide en función del incremento de la masa celular según la ecuación:

$$\mu X = \frac{dx}{dt}$$

Donde:

x= concentración celular (UFC/ml)

t = tiempo de incubación (h)

μ = velocidad específica de crecimiento (h^{-1})

La velocidad específica de crecimiento (μ) es característica para cada tipo de microorganismo y medio de cultivo. Se utiliza para caracterizar el comportamiento de una población en determinadas condiciones de cultivo y depende principalmente de factores internos y externos como: la capacidad de crecimiento y del ambiente en que se encuentra el microorganismo, respectivamente (composición del medio de cultivo, pH, temperatura, presencia de inhibidores). Existen diversas expresiones para μ : la más difundida es la ecuación de Monod, que relaciona el valor de μ con la concentración de un componente del medio de cultivo que está en menor cantidad respecto a los requerimientos del microorganismo: el sustrato limitante (Contreras, 2013).

Efecto del medio de cultivo en el crecimiento y metabolismo microbiano

La célula debe ser capaz de obtener una fuente de energía del medio para sintetizar los componentes celulares y esta capacidad depende de los sistemas enzimáticos que el organismo produzca, de acuerdo a su código genético (Chan *et al.*, 2002).

El crecimiento celular y la acumulación de productos del metabolismo están fuertemente influenciados por la composición del medio de cultivo: fuente de carbono, fuente de nitrógeno, factores de crecimiento y sales inorgánicas (Contreras, 2013). Dentro de los nutrientes que más se han investigado por su relación con la producción de compuestos antibacterianos son la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno y la concentración de NaCl (De Vuyst, 1995; Chan *et al.*, 2002; Neysens *et al.*, 2003; Settanni *et al.*, 2008).

Algunos autores han reportado que las bacterias ácido lácticas (BAL) son propensas a responder a los cambios en la disponibilidad de nitrógeno mediante la regulación de sus sistemas proteolíticos para asegurar un equilibrio de nitrógeno apropiado para la célula (Savikoji *et al.*, 2006). Se ha demostrado que la concentración o ausencia de la fuente de nitrógeno, contribuye al incremento de la producción de compuestos antibacterianos, como las bacteriocinas en *Enterococcus faecium* (Pantev, 2002).

Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas, son un grupo de bacterias Gram-positivas, no esporuladas, catalasa negativas, aerotolerantes, exigentes nutricionalmente, tolerantes a pH ácido, estrictamente fermentativas y que producen ácido láctico como producto final mayoritario de la fermentación de carbohidratos. Son asociadas normalmente con hábitats ricos en nutrientes, como lo son varios productos alimenticios, pero algunas son miembros comunes de la biota normal de la boca, intestino y vagina de mamíferos (Salminen, 2012). Los géneros que se incluyen dentro de esta descripción general de las BAL son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Hutkins, 2006).

Entre las BAL se pueden distinguir dos rutas metabólicas para la fermentación de carbohidratos, la glucólisis (ruta de Embden-Meyerhof-Parnas) resulta casi

exclusivamente en la producción de ácido láctico como producto final, este tipo de metabolismo es llamado homofermentativo. La segunda es la ruta del 6-fosfogluconato/fosfocetolasa que resulta en cantidades significativas de otros productos finales como etanol, acetato, acetaldehído, CO₂, además de ácido láctico. Este tipo de metabolismo es llamado heterofermentativo (Salminen, 2012). Las BAL producen una amplia gama de sustancias con actividad antibacteriana que pueden ser metabolitos primarios o secundarios (Turner *et al.*, 2007).

Un cultivo iniciador se puede definir como una preparación microbiana de un gran número de células, de al menos un microorganismo, que es adicionado a la materia prima deliberadamente para su fermentación (Leroy y De Vuyst, 2004).

Los cultivos iniciadores deben ser capaces de crecer a las temperaturas de fermentación y condiciones de a_w del alimento, así como generar enzimas que permitan la producción de metabolitos de interés (Fernandes *et al.*, 2009).

Las BAL son los microorganismos más importantes usados como cultivos iniciadores en la fermentación de productos cárnicos, ya que producen suficiente cantidad de ácido láctico para disminuir el pH inicial de la carne de 6 hasta valores de 4.8 a 5 (Benito *et al.*, 2007).

Compuestos con efecto antimicrobiano

Se ha reportado que las BAL son productoras de metabolitos que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas y de descomposición (Danilović *et al.*, 2011). Algunos de los principales metabolitos producidos por las BAL son: peróxido de hidrógeno (Block, 1991); ácido láctico (Gould, 1991); diacetilo y acetaldehído (Daeschel, 1989); reuterina (Talarico y Dobrogosz, 1989). Todos estos compuestos tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas con diferentes mecanismos de acción, sin embargo, algunas veces, estos compuestos no son deseables en el producto cárnico final (Kröckel, 2013).

Enzimas de interés producidas por BAL

Proteasas

Las proteasas son un tipo de enzimas capaces de catalizar la ruptura hidrolítica de los enlaces peptídicos presentes en las proteínas; también son denominadas como peptidasas.

Las enzimas proteolíticas de BAL juegan un papel importante en la degradación de proteínas y péptidos, produciendo aminoácidos libres que contribuyen al sabor característicos de esos productos (Benito *et al.*, 2007).

La proteólisis que ocurre durante la maduración de los embutidos cárnicos resulta en un incremento de péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos que participan en reacciones de descarboxilación y desaminación, generando ácidos orgánicos y aminas, respectivamente, que posteriormente pueden reaccionar químicamente y generar otros compuestos volátiles, cuya composición y concentración han sido correlacionadas con el sabor y aroma de los productos fermentados (Rizzi, 1988; Johansson *et al.*, 1994; Hierro *et al.*, 1999).

Lipasas

Las lipasas (triacilglicerol éster hidrolasas) pertenecen al grupo de las carboxilesterasas, enzimas que catalizan la hidrólisis de un enlace éster para obtener como productos finales ácidos grasos libres y glicerol o sus productos intermedios como mono y diglicéridos. Estos productos en el área de productos cárnicos tienen propiedades emulsificantes, lo que conlleva una mejora en la textura en el producto final (Talon *et al.*, 2009). A su vez, los ácidos grasos libres son precursores de las moléculas aromáticas en productos procesados, así mismo, cierto grado de oxidación lipídica contribuye a la formación del aroma y sabor típico de los embutidos (Toldrá y Verplaetse, 1995).

Péptidos de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana

La producción de péptidos con actividad antimicrobiana o bacteriocinas forma parte de los diversos mecanismos de adaptación de las bacterias, como una

estrategia que les permite competir favorablemente contra otros microorganismos por los nutrientes en su hábitat, además de participar en la comunicación celular; por lo que se ha señalado que el 99% de los grupos bacterianos pueden producir algún péptido con actividad antimicrobiana. En los últimos años se ha dado una mayor importancia a la caracterización genética y fisicoquímica de aquellas bacteriocinas producidas por BAL y que pueden inhibir a bacterias patógenas, por su potencial empleo en el sector clínico, ganadería, agricultura, así como en la conservación de alimentos, considerando además que varios de los microorganismos bacteriogénicos cuentan ya con aprobación para su uso en alimentos (Katla *et al.*, 2002; Cotter *et al.*, 2005).

La mayoría de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas son péptidos catiónicos, hidrofóbicos o anfifílicos, compuestos de 20 a 60 aminoácidos (Nes y Holo, 2000). Las bacteriocinas han sido agrupadas según características diversas, como su espectro de inhibición, mecanismo de acción, estructura química, tamaño y resistencia a temperatura. Cotter *et al.*, (2005) sugirieron una clasificación, en la que las bacteriocinas quedan agrupadas en dos grupos mayoritarios: los lantibióticos que contienen lantionina (clase I) y las bacteriocinas que no contienen lantionina (clase II). Las bacteriocinas de altos pesos moleculares y termolábiles (clase III) quedan agrupadas bajo la designación de “bacteriolisinas” o peptidoglucano hidrolasas.

Peptidoglucano hidrolasas (PGH)

Una estrategia utilizada en los últimos años es la aplicación de enzimas con actividad lítica como agentes antibacterianos en la industria de los alimentos debido a que provee ventajas hacia el producto y el consumidor. Las ventajas son: la eliminación de la colonización bacteriana a membranas de la mucosa del aparato digestivo, el tratamiento en infecciones provocadas por bacterias y el biocontrol de bacterias patógenas en alimentos (García *et al.*, 2010; Fischetti, 2010; Fenton *et al.*, 2011).

Las enzimas con actividad lítica son llamadas peptidoglucano hidrolasas (PGH), ya que tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces glucosídicos o peptídicos del

peptidoglucano, que es el mayor componente de la pared celular de bacterias (Vollmer *et al.*, 2008). Dependiendo del tipo de enlace que hidrolicen se clasifican en: *N*-acetilmuramidasa (muramidasa), *N*-acetilglucosaminidasas (glucosaminidasas), *N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa (amidasa) y endopeptidasas (Lortal *et al.*, 2005; Vollmer *et al.*, 2008; Callewaert *et al.*, 2011). Las PGH's son una alternativa para la bioconservación de productos cárnicos ya que cuentan con una potente actividad *in vivo* e *in vitro* especialmente contra bacterias Gram-positivas, además de contar con actividad contra bacterias resistentes a antibióticos debido a que su mecanismo de acción es totalmente diferente al de los antibióticos (García *et al.*, 2010; Callewaert *et al.*, 2011; Rodríguez-Rubio *et al.*, 2015).

ANTECEDENTES

Las industrias de procesamiento de alimentos generan grandes volúmenes de residuos, en su mayoría biodegradables. Estos residuos, contienen componentes que podrían ser utilizados como sustratos y nutrientes de una variedad de procesos microbianos/enzimáticos, para dar lugar a otros productos. La industria cárnica es una de las industrias que produce cargas más altas de residuos (Kosseva, 2013). Los residuos generados en la industria han sido subestimados hasta ahora, ya que se pueden crear nuevas oportunidades para otros mercados de la industria alimentaria.

En México, la industria cárnica representa un sector importante en la economía, ya que de acuerdo a encuestas del INEGI las familias mexicanas gastan trimestralmente 23.3% de su ingreso a la compra de carne.

Aunado al crecimiento en la demanda, producción y consumo de derivados cárnicos, la generación de productos de desecho también se han incrementado, los cuales pueden llegar a representar hasta un 5% (Consejo nacional de empacadores de carnes frías y embutidos, 2012), los cuales impactan negativamente al medio ambiente, representando una pérdida económica importante en el sector de alimentos. A la hora de tratar residuos sólidos de tipo cárnico como sangre, huesos, desperdicios, merma, producto final confinado, etc., se debe poner en práctica nuevas formas de reciclaje que, mediante un buen proceso operacional, optimicen los recursos para desarrollar métodos sostenibles para obtener productos con un alto valor económico (Sandoval y Stuardo, 2003).

Por tal motivo, como se ha observado que los productos cárnicos permiten el adecuado crecimiento de microorganismos resulta interesante aprovechar los residuos provenientes de la industria cárnica para el crecimiento de diversas BAL que se han reportado como productoras de actividad antibacteriana y que se encuentran relacionadas con la calidad e inocuidad de los productos cárnicos

(Kröckel, 2013). Dentro de los géneros de BAL más estudiados y ampliamente utilizados: *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Pediococcus*.

Lactobacillus sakei

Lactobacillus es el género más grande y diverso entre las bacterias ácido lácticas, está constituido de cerca de 200 especies (O'Sullivan *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2015). Son bacterias microaerófilas, Gram-positivas (Canchaya *et al.*, 2006).

Lactobacillus sakei es capaz de crecer en altas concentraciones de NaCl, a_w baja así como en bajas temperaturas y pH ácido (McLeod *et al.*, 2010).

Lactobacillus sakei es ampliamente utilizado como cultivo iniciador en la industria cárnica por sus propiedades biotecnológicas óptimas para la producción de salchichas, tales como la producción de ácido láctico que acidifica el producto e inhibe el crecimiento de bacterias y agentes patógenos, así como conferir sabor y mejorar la textura (Chaillou *et al.*, 2005). Se ha reportado que tiene la capacidad de disminuir el crecimiento de microorganismos de descomposición y patógenos, aumentando la vida de anaquel de los productos (Champomier-Verrges *et al.*, 2001; Vermeiren *et al.*, 2004). Esto se debe principalmente a la producción de ácido láctico, así como otras moléculas antagonistas como las bacteriocinas (Riley y Wertz, 2002; Shikha *et al.*, 2016). Dichas bacteriocinas son usadas para alargar la vida de anaquel debido a su estabilidad al calor, su tolerancia al cambio de pH (Gautam y Sharma, 2009). Se ha reportado que *L. sakei*, cepa aislada de salami fermentado, produce enzimas con actividad lítica (PGH) con pesos de alrededor de los 70- y 80-kDa (Najjari *et al.*, 2015), las cuales le brindan inocuidad al producto final.

Enterococcus faecium

El género *Enterococcus* se encuentra dentro de la familia *Enterococcaceae* y pertenece al grupo de BAL. Son cocos Gram-positivos, no esporulados, oxidasa, catalasa y reductasa negativos, anaerobios facultativos, se pueden encontrar solos, en pares o en cadenas cortas (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006). Se pueden distinguir de otras bacterias Gram-positivas, catalasa negativas y cocos

homofermentativos, por su capacidad de crecer en un amplio intervalo de temperatura, 5-50 °C y un intervalo de pH de 4.4-9.6, con un crecimiento óptimo a 37 °C y pH 7.5; además toleran altas concentraciones de sales biliares [40% (m/v)] y hasta 6.5% de NaCl (Salminen *et al.*, 2012; Moreno, 2015). Tienen un metabolismo biosintético bastante limitado por lo que requieren medios de cultivo ricos en aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Olvera, 2010).

Su metabolismo es homofermentativo, siguen la vía de Embden-Meyerhof-Parnas, produciendo ácido L(+)-láctico, a partir de la fermentación de hexosas (Salminen, 2012).

Es un microorganismo que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, se le puede encontrar en el tracto gastrointestinal y heces de mamíferos, y debido a su habilidad de sobrevivir a ambientes adversos, los enterococos pueden colonizar diversos nichos y se suelen encontrar en el agua, en el suelo, en las plantas y vegetales, así como en alimentos de origen animal y alimentos fermentados (Giraffa, 2003).

Aunado a la contribución en características organolépticas, los enterococos pueden desempeñar un papel antagonista en contra de bacterias patógenas. Se ha reportado que *Enterococcus faecium* es capaz de producir una variedad de bacteriocinas, llamadas enterocinas, las cuales tienen como blanco de acción principal la membrana citoplásmica (Cleveland *et al.*, 2001). Se ha reportado que las enterocinas tienen actividad contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* y *Vibrio cholerae* (Ennahar *et al.*, 1998; Laukova y Czikkova, 2001; Sarantinopoulos *et al.*, 2002; Giraffa, 2003). Aunado a la producción de enterocinas, los *Enterococcus* también pueden producir diversas PGH, las cuales están relacionadas con la estabilidad e inocuidad de diversos alimentos fermentados (García-Cano *et al.*, 2014).

Pediococcus acidilactici

El género *Pediococcus* está constituido por bacterias Gram-positivas de la familia *Lactobacillaceae*, cocos no móviles (1.0-2.0 µm de diámetro), catalasa negativa que se dividen en ángulo recto en dos planos, lo que resulta de una morfología de tétrada. A este género pertenecen 13 especies (*Pediococcus pentosaceus*, *P. acidilactici*, *P. argentinus*, *P. cellicola*, *P. claussenii*, *P. damnosus*, *P. ethanolidurans*, *P. inopinatus*, *P. lolii*, *P. parvulus*, *P. siamensis*, *P. dextrinicus* y *P. stilesii* (Haakensen *et al.*, 2009)

Este género requiere de compuestos complejos de nitrógeno, por lo tanto no son capaces de utilizar las sales de amonio como única fuente de nitrógeno o reducir los nitratos a nitritos. Van desde especies aeróbicas hasta microaerofílicas, fermentan la glucosa por la vía de Embden-Meyerhof-Parnas y forman ya sea D- o L-lactato sin la producción de dióxido de carbono. Crecen a 30 °C, la temperatura óptima de crecimiento es de 25-40 °C, con un máximo de 52 °C y se destruyen por calentamiento a 72 °C por 10 min. El pH óptimo del medio de crecimiento es de 6.0-6.5, sin embargo, también crece en medios ácidos de pH 4.4. Pueden crecer en concentraciones de NaCl de 6.5%. (Holt *et al.*, 1999; Carr *et al.*, 2002 y Salminen, 2012).

En 2015, López reportó que *Enterococcus faecium* MXVK29 presentaba actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua*. El grupo de trabajo del laboratorio S-132 de la UAM-I, ha encontrado que *P. acidilactici* MXVK133 y *P. acidilactici* UAM-MGP1, bacterias aisladas de diversos productos cárnicos presentan actividad proteolítica cuando son cultivadas en medios de cultivo estándar (Richards, tesis en revisión). Además, se ha reportado que *P. acidilactici* presenta actividad antimicrobiana contra bacterias como *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella entérica*, *Typhumurium* y *Pseudomonas* (García-Cano *et al.*, 2011). Por lo cual resulta de interés hacer crecer estos microorganismos y evaluar dichas actividades en los medios de cultivo de residuos cárnicos.

El crecimiento de las bacterias lácticas puede resultar costoso, debido a los requerimientos nutricionales complejos que necesitan las BAL para poder desarrollarse y producir metabolitos de interés, si los residuos provenientes de la industria cárnica, proveen los requerimientos necesarios para el desarrollo de las BAL y además la capacidad de producir metabolitos de interés que lleven a la mejora de las características funcionales de los productos, contribuirá significativamente al crecimiento de la biotecnología en el país.

JUSTIFICACIÓN

La generación de desechos orgánicos es una problemática ambiental mundial, y en especial los que se generan en la industria cárnica; es por eso que se busca generar nuevas y mejores alternativas para la utilización de estos residuos. Una de ellas es el empleo de desechos cárnicos como una alternativa al uso de medios de cultivo para el crecimiento diferentes grupos de bacterias ácido lácticas utilizadas en la industria cárnica.

HIPÓTESIS

El crecimiento bacteriano está fuertemente influenciado por la composición del medio de cultivo: fuente de carbono, nitrógeno, factores de crecimiento y sales inorgánicas. Si los residuos provenientes de residuos cárnicos son una matriz compleja, las bacterias ácido lácticas podrán crecer en éstos y presentar un efecto directo en la producción de compuestos con naturaleza antibacteriana, proteolítica y lipolítica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Estandarizar componentes de residuos de productos cárnicos con medios de cultivo comerciales específicos para el crecimiento de bacterias ácido lácticas (MRS y CGB).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseño y estandarización de los medios de cultivo.
- Determinar el efecto de medios de cultivo de residuos de productos cárnicos sobre la velocidad de crecimiento de *Lactobacillus sakei* UAM-MGJP1, *Enterococcus faecium* MXVK29, *Pediococcus acidilactici* MXVK133 y *Pediococcus acidilactici* UAM MGP1.
- Determinar la producción de la actividad antimicrobiana, lipolítica y proteolítica.

METODOLOGÍA



Figura 2. Diagrama general de trabajo.

Procedencia y recepción de las muestras

Se trabajó con 5 residuos de productos cárnicos: salchicha de pavo, tocino ahumado, queso de puerco, chorizo y jamón tipo York, provenientes de la Empacadora Murgati S.A de C.V. Estos residuos son productos que no tuvieron un proceso correcto, no cumplieron con estándares de calidad o fueron merma. Todos los residuos cárnicos fueron recibidos en el laboratorio en hieleras a 4 °C.

Análisis químico proximal

Cada muestra se homogenizó (Ultraturrax S18, Staufen, Alemania), para distribuir uniformemente los componentes de los residuos. Se determinó la humedad de las muestras de acuerdo al método oficial AOAC 950.46. A las muestras ya deshidratadas se les determinó la grasa cruda empleando el método de Soxhlet, utilizando éter etílico como disolvente; proteína cruda se determinó con el método de Kjeldahl de acuerdo con el método oficial AOAC 2001.11. Las cenizas se

cuantificaron por el método de calcinación, y de esas cenizas se realizaron las determinaciones de fosfatos de acuerdo a la NMX-F-320-S-1978 y de cloruros por el método de Mohr (Nielsen, 1998). Los hidratos de carbono se determinaron por diferencia de todos los demás componentes. La determinación de fibra dietética total se realizó por el método de la AOAC 985.29, 993.2. La cuantificación de almidón se realizó por precipitación de complejos con yodo (Southgate, 1991).

Formulación de medios de cultivo

Los resultados de los componentes obtenidos del análisis químico proximal de cada uno de los residuos, fueron comparados con medios de cultivo comerciales como, CGB (Caldo, Glucosa-Caseína) y MRS (Man-Rogosa-Sharpe, Difco™, E.U.A.), medios de cultivo típicos para el crecimiento de bacterias ácido lácticas.

Los parámetros principales para la formulación de los medios fueron la cantidad de hidratos de carbono y de nitrógeno total.

Se pesó el residuo correspondiente y se añadió agua destilada de acuerdo a la formulación de cada uno de los medios de cultivo para después homogenizarlo y someterlos a esterilización (Yamato SM-300, Santa Clara, CA, E.U.A.) 121 °C 15 min.

Composición del medio CGB		
Reactivo	g/l	Marca
Peptona biotriptasa	20.00	BD Bioxon, México
Glucosa	10.00	J. T. Baker, E.U.A.
Extracto de levadura	5.00	Dibico, México
Citrato de amonio	2.00	J. T. Baker, E.U.A.
Fosfato disódico	2.00	J. T. Baker, E.U.A.
Sulfato de magnesio	0.10	J. T. Baker, E.U.A.
Sulfato de manganeso	0.05	J. T. Baker, E.U.A.
Tween 80	1 ml	Hycel, México

Composición del medio MRS Difco™	
Reactivo	g/l
Peptona proteosa No. 3	10.00
Extracto de carne	10.0
Extracto de levadura	5.0
Glucosa	20.0
Polisorbato 80	1.0
Citrato de amonio	2.0
Acetato de sodio	5.0
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato dipotásico	2.0

Cinéticas de crecimiento

Las BAL empleadas para la cinética fueron *Lactobacillus sakei* UAM-MGJP1, *Enterococcus faecium* MXVK29, *Pediococcus acidilactici* MXVK133 y *Pediococcus acidilactici* UAM MGP1.

Para obtener las cinéticas de crecimiento de las bacterias, se reactivaron las cepas durante 12 h a 36 °C (Prendo, SEV, E.U.A.), adicionando 50 µl de la cepa conservada a -80 °C en 5 ml de CGB. Se estandarizó el preinóculo a una $D.O_{.600nm} = 4.0$ que equivale a 10^4 UFC/ml. Posteriormente se inocularon los 5 medios estandarizados al 0.01%. La fermentación se llevó a cabo en agitación 150 rpm a 35 °C, con la finalidad de homogenizar lo más posible el medio de cultivo. Las cinéticas se realizaron durante 24 h, tomando muestra cada 2-4 h.

Determinación de la curva de crecimiento

Se tomaron alícuotas de 2 ml a las 0, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 y 24 h de crecimiento de las cuales se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en agar MRS al

1.5%. Posteriormente se incubaron a 36 °C por 24 h. Se contaron las UFC en la placa y se tomaron en cuenta las diluciones que se realizaron para obtener las UFC/ml de medio.

pH

Se tomaron alícuotas de 4 ml a las 0, 6, 10, 16 y 24 h de crecimiento para medir el pH (Orion Versa Star, E.U.A.).

Determinación de la velocidad específica de crecimiento (μ)

Con los datos de la población microbiana (UFC/ml) y el tiempo de crecimiento, se obtuvieron las velocidades específicas de crecimiento (μ) para cada BAL y para cada medio de cultivo analizado, utilizando el software ComBase 2016.

Obtención de sobrenadante

Se tomaron 10 ml de medio de cultivo, se centrifugaron a 4,000 rpm durante 15 min a 4 °C (Eppendorf 5810 R, Hamburgo, Alemania); los sobrenadantes obtenidos (proteínas extracelulares) se neutralizaron a pH 7.0 con NaOH y posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Finalmente, se filtraron a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.45 μ m, diámetro 25 mm (Millipore, Darmstad, Alemania).

Cuantificación de proteína

La concentración de proteína de los sobrenadantes se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, California, E.U.A.) a una longitud de onda de 595 nm en un lector de microplacas (Epoch, Biotek, Vermont, E.U.A.). Se colocaron 5 μ l de sobrenadante, 155 μ l de agua destilada y 40 μ l del reactivo de Bradford concentrado en un pozo de la microplaca y se homogenizó, se incubaron 5 min a temperatura ambiente y se hicieron las mediciones. La curva patrón se realizó con albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, E.U.A.) (Bradford, 1976).

Detección de la actividad antimicrobiana

Para determinar el efecto antimicrobiano se realizaron pruebas de difusión en agar con el sobrenadante. Como microorganismos blanco se utilizaron bacterias patógenas (*Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*) y bacterias ácido lácticas (*Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sakei* y *Weissella viridescens*). También se realizaron pruebas utilizando exudados de salchicha y de salami rebanado, cultivos que fueron almacenados en congelación a -20 °C y proporcionados por el grupo de trabajo. Esto con el fin de determinar si las cepas en estudio eran capaces de inhibir la microbiota responsable del deterioro de este tipo de alimentos.

En caja Petri se colocaron 15 ml de agar BHI (Brain Heart Infusion) (Difco, E.U.A.) para microorganismos patógenos y 15 ml de agar MRS para bacterias lácticas, ambos al 1.5% (m/v), las placas se dejaron solidificar. Posteriormente se adicionaron 15 ml de agar BHI o MRS al 0.8% con 2 µl del microorganismo empleado como blanco. Se realizaron pozos sobre la doble capa de agar y en cada pozo se agregaron 200 µl de los sobrenadantes. Posteriormente las cajas se incubaron a 36 °C durante 24 h. Los halos de inhibición de los microorganismos se midieron con un vernier. La prueba se consideró positiva cuando el halo de inhibición fuera mayor a 1 mm y se correlacionó con la cantidad de proteína colocada en cada pozo, para obtener la actividad específica en mm de halo/mg proteína.

Detección de actividad lipolítica

Se preparó una caja con medio agar tributirina (0.5% peptona biotriptasa, 0.5% extracto de levadura, 1% tributirina, 1.5% agar) para observar la actividad enzimática mediante la presencia de halos en el medio por la hidrólisis de tributirina. Se colocaron 20 µl de cada uno de los sobrenadantes por pozo, finalmente las placas se incubaron 48 h a 36 °C. Zona clara alrededor del pozo indicó actividad positiva (Bermúdez, 2010). Se empleó como control positivo *Bacillus pumilus* GMA1 (cepa donada por la Dra. Carolina Peña, Facultad de Química, UNAM).

Detección de actividad proteolítica

La actividad proteolítica se determinó en placa con agar Skim Milk (Difco™, E.U.A.) al 1.5%. Se colocaron 20 µl de cada uno de los sobrenadantes por pozo, finalmente y las placas se incubaron 48 h a 36 °C. Zona clara alrededor del pozo indicó actividad positiva (Casales, 2012). Se empleó como control positivo a *Bacillus pumilus* GMA1.

Precipitación de proteínas con TCA

Para evitar que la electroforesis tenga interferencia por otros compuestos presentes en los sobrenadantes, se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético (TCA).

A los sobrenadantes se les añadió 20% de TCA y se incubaron durante 1 h a 4 °C, posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 min. El precipitado se lavó con 1 ml de acetona al 90% y se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min, el lavado se repitió por tres veces más. Finalmente, el precipitado se resuspendió en Tris-HCl 100 mM pH 8.0 para cuantificar la concentración de proteína.

Electroforesis

Determinación del perfil proteínico

Para determinar el perfil proteínico de los sobrenadantes se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%.

Se prepararon los geles con los reactivos necesarios (Bis-acrilamida 30%, Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%, H₂O, TEMED y APS 10%). En cada pozo se cargó 25 µl de sobrenadante y 10 µl de amortiguador de carga (agua desionizada, 2.5% glicerol, Tris-HCl 50 mM pH 6.8, azul de bromofenol 0.5%).

Los geles se colocaron en una cámara de electroforesis de proteínas (Mini-Protean 3Cell, Bio-Rad, California, E.U.A.) que contenía amortiguador de corrida (12 mM Tris, 186 mM glicina y 1% SDS; pH 8.3).

Después de la electroforesis el gel se lavó dos veces con 50 ml de agua desionizada en agitación suave durante 30 min, se tiñó con azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad) (0.1% Coomassie G-250, 45% metanol, 10% ácido acético glacial, 45% agua v/v), durante 12 h en agitación suave y posteriormente al gel se le adicionó una solución desteñidora que contenía, 10% metanol, 10% ácido acético glacial y 80% agua desionizada (v/v). El peso molecular aparente de las bandas de proteína fue determinado por la comparación con marcadores de alto peso molecular (Bio-Rad, Little Chalfont, Reino Unido).

Para documentar las imágenes se utilizó el equipo Gel-Doc RT (CA, E.U.A.) con el software Image Lab (Bio-Rad, CA, E.U.A.).

Determinación de actividad lítica por zimograma

Se prepararon geles desnaturalizantes al 10% con 0.02% (m/v) de células liofilizadas de *M. lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, USA) como sustrato (Leclerc y Asselin, 1989). Después de la electroforesis el gel se lavó dos veces con agua desionizada en agitación suave durante 30 min. Se incubó a 37 °C con 200 ml de amortiguador renaturalizante (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, Tritón X-100 1% v/v) durante 16 h en agitación suave.

El gel se tiñó con una solución de azul de metileno durante 30 min (0.01% KOH, 0.1% azul de metileno) y se destiñó con agua desionizada. La actividad lítica fue identificada como una zona clara en contra del fondo azul. El peso molecular aparente de las bandas de proteína fue determinado por la comparación con marcadores comerciales de alto peso molecular (Bio-Rad, Little Chalfont, Reino Unido).

Determinación de actividad proteolítica por zimograma

El zimograma de gelatina se realizó al 0.1%, se preparó pesando 8.5 mg de gelatina (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y se continuó como anteriormente se describió en la determinación del perfil proteínico. Después de correr los geles bajo las mismas condiciones anteriormente descritas, el zimograma se enjuagó con agua desionizada durante 30 min en agitación suave, posteriormente se lavó

con una solución 2.5% de Tritón X-100 por 30 min en agitación suave y se incubó con amortiguador de renaturalización (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂) durante 18 h a 37 °C. Se enjuagó con agua desionizada y se le adicionó solución teñidora durante 12 h. Finalmente al gel se le adicionó solución desteñidora. Las proteínas con actividad proteolítica se identificaron como una banda clara en contra de un fondo azul (Lantz y Ciborowski, 1994).

Determinación de actividad lipolítica por zimograma

Se realizó una electroforesis en gel en condiciones nativas (sin SDS) y se corrió bajo las condiciones anteriormente descritas. Se lavó con agua desionizada, posteriormente se realizaron 3 lavados en la solución amortiguadora (fosfatos de sodio 100 mM pH 7.5, 5% Tritón X-100), por último se incubó a 37 °C por 16 h con un amortiguador de renaturalización (fosfatos de sodio 100 mM pH 7.5 y 0.5% Tritón X-100).

El gel se enjuagó con agua desionizada y se sumergió en una solución de α -naftilacetato (6 mg α -naftilacetato, 300 μ l acetona, 100 ml amortiguador de fosfatos de sodio 100 mM pH 7.5) durante 30 min en agitación suave. Finalmente el zimograma se reveló con Fast Red (80 mg Fast Red, 20 μ l Tritón X-100, 100 ml amortiguador de fosfatos de sodio 100 mM pH 7.5), hasta observar una banda color marrón (Bermúdez, 2010). El gel se guardó en amortiguador de fosfatos de sodio 100 mM.

Análisis estadístico

Para el análisis de resultados se realizó un análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia del 5% y un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el método de Tukey para la comparación de medias de velocidad específica entre medios de cultivo y las 4 cepas; para ello se empleó el paquete estadístico XLSTAT-Base (2016).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis químico proximal

Se realizó el análisis químico proximal (AQP) de cada una de las muestras para comparar los componentes con medios de cultivo comerciales (CGB y MRS).

En la Tabla 1 se presenta el porcentaje del AQP de los residuos cárnicos con los que se trabajó, a pesar de ser productos con distinto proceso tienen semejanzas, ya que son ricos en grasa y proteína. Dado que los residuos de productos cárnicos son una matriz compleja, es necesario ajustar y estandarizar la composición para que sea similar a un medio comercial para permitir la producción de metabolitos deseados en la industria alimentaria.

	Salchicha de pavo	Tocino ahumado	Queso de puerco	Chorizo	Jamón York
%Humedad	62.3±0.03	39.9±0.44	55.4±0.09	63.4±0.01	72.5±0.01
%Proteína	9.8±0.15	15.9±0.27	18.3±0.18	16.0±0.22	14.3±0.10
%Grasa	14.0±0.13	31.6±0.37	18.7±0.24	11.2±0.15	4.0±0.10
%Hidratos de carbono	11.0±0.06	10.7±0.19	5.7±0.10	6.9±0.09	4.3±0.04
%Fibra dietética	1.5±0.03	0.55±0.007	0.42±0.004	0.52±0.008	1.3±0.02
%Almidón	1.57±0.02	0.05±0.001	0.05±0.001	0.01±0.003	0.10±0.002
%Cenizas	2.9±0.02	1.9±0.007	1.9±0.002	2.5±0.06	4.9±0.03

Las proteínas son el componente más abundante de la carne, superado únicamente por el agua; dado que son productos derivados de la carne tienen una

concentración importante de proteínas, sin embargo también se añaden proteínas e hidrolizados para incrementar el contenido proteínico del producto final.

En la ficha técnica del medio de cultivo estándar no se declara la cantidad de proteína que contiene, pero si la cantidad de nitrógeno total, la cual fue comparada con la obtenida en los residuos cárnicos, para ello se tomó en cuenta la consideración de que hay 16 g de nitrógeno por 100 g de proteína (Badui, 2006).

La grasa en salchicha, tocino y queso de puerco es el segundo componente de mayor concentración. La grasa resulta imprescindible para la aceptabilidad de la carne, ya que la concentración y composición de ésta influyen de manera importante por su efecto en el sabor, aroma, jugosidad, textura y apariencia (Hui *et al.*, 2013).

El contenido de hidratos de carbono, obtenidos por diferencia del AQP, es superior al aporte del músculo *per se*. Generalmente se agregan hidratos de carbono a productos cárnicos con el fin de aumentar rendimientos en cocción, incrementar la capacidad de retención de agua y modificar textura. Los hidratos de carbono más empleados son hidrocoloides y almidones. En el caso de la salchicha, que se considera una emulsión ya que es una dispersión del tipo grasa en agua, a pesar de que las gotas de grasa presentes son semisólidas y se encuentran dispersas en una fase continua semisólida de proteínas; los hidratos de carbono añadidos actúan estabilizando la emulsión (Totosaus y Guerrero, 2013).

La relación carbono/nitrógeno, presencia de iones metálicos y de algunos azúcares de fácil metabolismo, como la glucosa, son factores que inducen a los microorganismos a producir proteasas. La síntesis de proteasas también se ve afectada por fuentes de nitrógeno fácilmente metabolizables, como presencia de aminoácidos en el medio (Contreras, 2013).

En la Figura 3, se observa la diferencia en composición de los residuos. Todos los residuos presentan un valor de humedad por arriba del 50%, a excepción del tocino el cual por el proceso de ahumado pierde un gran contenido de agua libre.

Al tener menor cantidad de agua, el tocino presentó mayor concentración de lípidos en su composición. Por el contrario, el jamón es el producto con mayor humedad y el que tiene la menor cantidad de grasa.

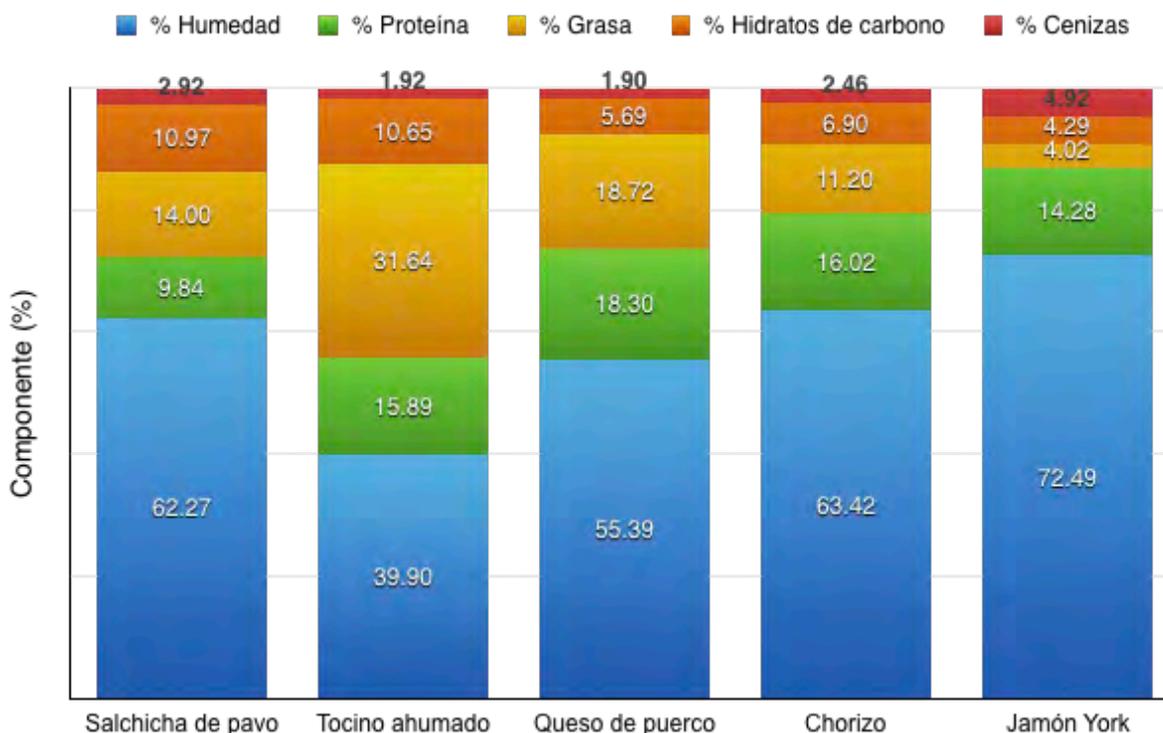


Figura 3. Composición y comparación del análisis químico proximal de los residuos de productos cárnicos.

En la Tabla 2, se observan los resultados de la determinación del contenido de NaCl y fosfatos presentes en los residuos.

La adición de fosfatos en productos cárnicos es con la finalidad de aumentar la capacidad de retención de agua de los productos cocidos, tal como jamón, salchicha y queso de puerco, además de incrementar el pH y la fuerza iónica. En el caso de la salchicha tiene el efecto de estabilizar la emulsión, es por eso que en ésta presenta mayor concentración de fosfatos. La concentración de fosfatos presentes en los residuos están dentro del límite que establece la norma NOM-145-SSA1-1995, cuya concentración debe ser menor de 5000 mg/kg. En los medios de cultivo, los fosfatos se emplean principalmente para tener un efecto amortiguador y como fuente de fósforo (Madigan *et al.*, 2009).

Tabla 2. Contenido de compuestos inorgánicos

	Salchicha de pavo	Tocino ahumado	Queso de puerco	Chorizo	Jamón York	CGB	MRS
% NaCl	1.7	1.82	1.65	1.84	4.05	-	-
% Fosfatos	0.14	0.1	0.13	0.11	0.07	0.19	0.19

Estandarización medios de cultivo

En la Tabla 3 se observa el porcentaje de fosfatos y nitrógeno presentes en las muestras y en los medios comerciales; en el caso de los residuos tienen valores por arriba de los medios CGB y MRS; sin embargo no se espera que afecte de manera significativa el crecimiento de microorganismos. Se ha observado que algunas fuentes de nitrógeno pueden provocar un aumento en el crecimiento de ciertas bacterias, otras pueden afectar solamente en la producción de compuestos antibacterianos y algunas incluso en ambos (Akhavan *et al.*, 2011).

Tabla 3. Comparación de concentración de nitrógeno, hidratos de carbono y fosfatos de residuos cárnicos con medios comerciales

	Salchicha de pavo	Tocino ahumado	Queso de puerco	Chorizo	Jamón York	CGB	MRS
% Nitrógeno	1.57	2.54	2.93	2.56	2.28	0.21	0.19
% Hidratos de carbono	10.97	10.65	5.69	6.90	4.29	1.05	1.98
% Fosfatos	0.14	0.1	0.13	0.11	0.07	0.19	0.19

Los medios se estandarizaron con base en la concentración de hidratos de carbono y nitrógeno presente en los residuos, ya que el carbono es fuente de energía para los microorganismos y el nitrógeno necesario para la síntesis proteínica (Akhavan *et al.*, 2011). Se realizaron dos estandarizaciones: una ajustada al medio CGB y otra a MRS. En la Figura 4, se observa la composición

de los medios de cultivo estandarizados a MRS, donde el porcentaje de hidratos de carbono es de 1.98% y de nitrógeno de 0.19%. El resto del porcentaje es agua.

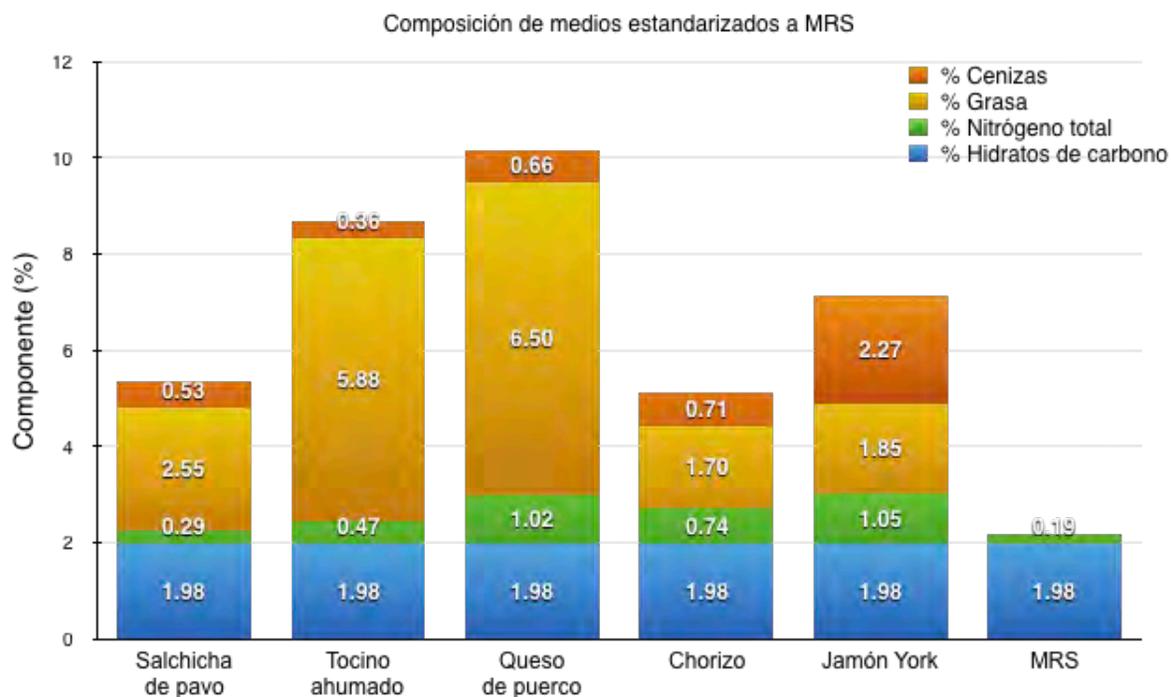


Figura 4. Comparación de la composición de los diferentes medios elaborados a partir de residuos de productos cárnicos y estandarizados a MRS.

Al comparar la cantidad de hidratos de carbono que hay en el medio MRS y en CGB (Figura 4 y 5), se observa que el MRS tiene casi el doble de hidratos de carbono que el CGB, por lo que las cantidades de residuos para la elaboración del medio fueron mayores en la estandarización del medio a MRS que en CGB, estos medios tuvieron mayor concentración de nutrientes y por lo tanto mayor cantidad de grasa.

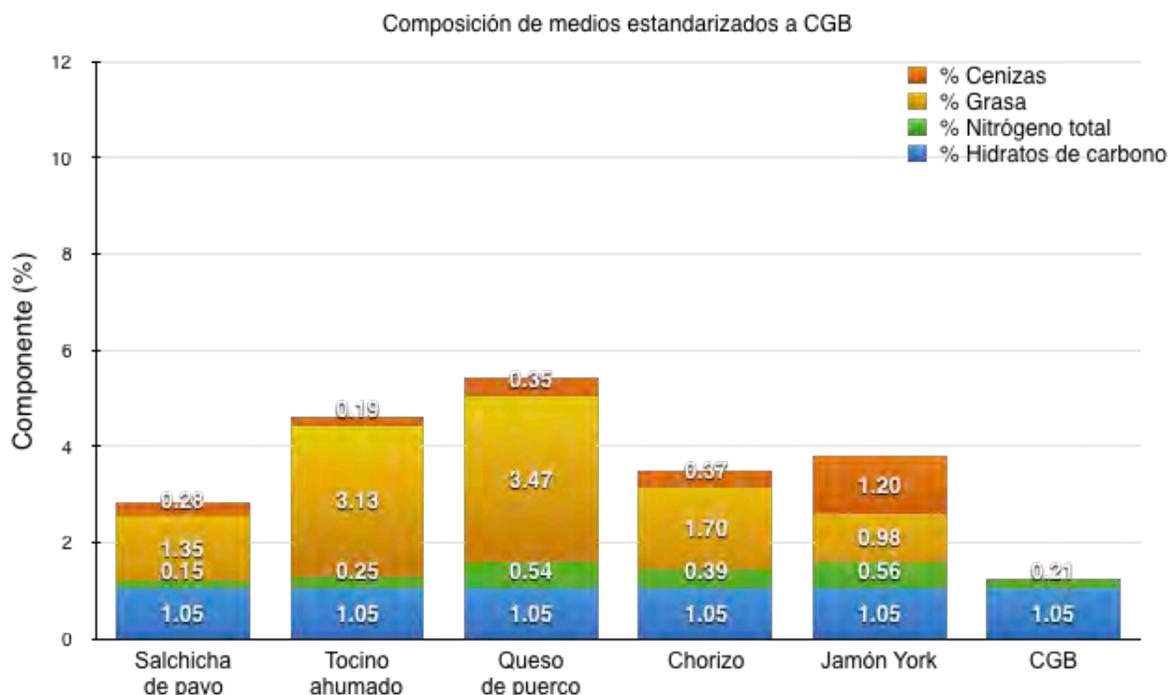


Figura 5. Comparación de la composición de los diferentes medios elaborados a partir de residuos de productos cárnicos y estandarizados a CGB.

Con el propósito de asegurar que el medio formulado con los residuos cárnicos estuviera libre de algunas otras bacterias que no fuera la inoculada para la cinética, cada medio fue sometido a esterilización a 121 °C durante 15 min, posteriormente se incubaron a 35 °C durante 24 h y se tomaron alícuotas para sembrar en agar MRS y corroborar la ausencia de otros microorganismos.

Una vez determinado que los medios de cultivo estandarizados no presentaban crecimiento después de la esterilización, se decidió crecer a las cuatro bacterias lácticas de estudio.

Los medios de cultivo de residuos se estandarizaron a los dos medios de referencia y se inocularon con las BAL, con el fin de determinar en qué medio tenían un mejor crecimiento.

Idoui y Karam en 2008, reportaron la identificación de 27 bacterias ácido lácticas presentes en una mantequilla tradicional, por lo que el contenido graso no es inhibitorio para el crecimiento de éstas, ya que el contenido de lípidos de una mantequilla es arriba del 85%, mientras que en los medios es del 1 al 3%.

Dado que en los medios elaborados de residuos hay del 1 al 4% de NaCl mientras que en el medio de cultivo CGB y MRS no hay presencia de esta sal, el crecimiento podría verse afectado, sin embargo el contenido de NaCl no representa un factor para la inhibición del crecimiento de BAL, ya que se sabe que microorganismos como el género *Enterococcus* puede crecer hasta con 6.5% de NaCl (Olvera, 2010).

Las cuatro BAL inoculadas crecieron en ambas estandarizaciones, sin embargo la cantidad de UFC/ml después de 24 h en los medios homologados a CGB fueron mayores, por lo que se decidió trabajar con esta estandarización para realizar las curvas de crecimiento durante 24 h por recuento en placa.

Cinéticas de crecimiento

Con el fin de observar el comportamiento de las cepas en medios de cultivo específicos para BAL y tener como referencia para comparar con los medios estandarizados, se evaluaron mediante el análisis de las curvas de crecimiento por cuenta en placa durante 24 h. De las cepas *Lactobacillus sakei* UAM-MGJP1, *Enterococcus faecium* MXVK29, *Pediococcus acidilactici* MXVK133 y *Pediococcus acidilactici* UAM MGP1.

En el medio de cultivo CGB las BAL inoculadas muestran una fase de adecuación muy corta (Figura 6); los inóculos se hicieron en CGB dado que los nutrientes eran los mismos no presentaron dificultad para crecer en este.

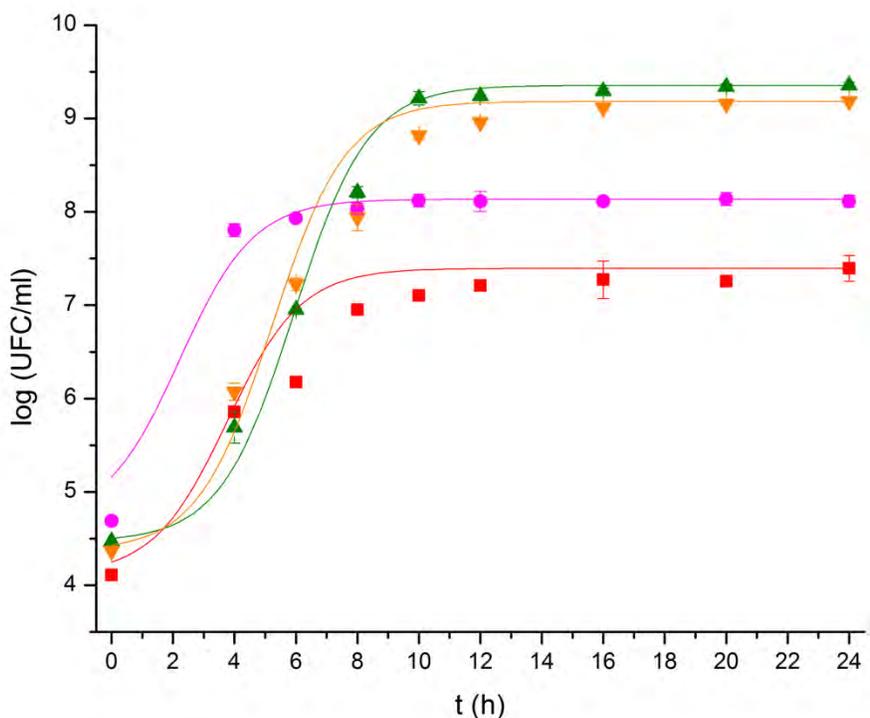


Figura 6. A) Curva de crecimiento de *L. sakei* UAM-MGJP1 (■), *E. faecium* MXVK29 (●), *P. acidilactici* MXVK133 (▲) y *P. acidilactici* UAM-MGP1 (▼) en medio de cultivo CGB.

Cuando las cepas se cultivaron en medio CGB, llegaron a la fase estacionaria alrededor de las 8-10 h, a excepción de *E. faecium* que lo hizo entre las 4-6 h.

El género *Pediococcus* presentó mayor crecimiento debido a que en ambas cepas la población microbiana (log UFC/ml) fue mayor de 9, mientras que *L. sakei* UAM MGJP1 fue la cepa que creció menos, ya que presentó 2 órdenes de logaritmo menos en comparación con los *Pediococcus* y 1 orden de log menos en comparación con el *Enterococcus*.

Las velocidades específicas de crecimiento (μ) de las BAL en este medio se observan en la Tabla 4, donde *E. faecium* MXVK29 presentó un valor mayor, esto quiere decir que la cantidad de células que se genera por ml de medio de cultivo por unidad de tiempo es mayor que la de las otras BAL. Las dos cepas de *Pediococcus* tuvieron valores similares, y al aumentar la velocidad específica el crecimiento también aumenta. Sin embargo, esto no puede generalizarse ya que

en el caso de la cepa de *Enterococcus* tuvo un valor elevado de μ pero el crecimiento fue menor que las cepas de *Pediococcus*. En el caso de la cepa de *Lactobacillus*, la μ fue menor que la de las demás cepas y también presentó el menor crecimiento.

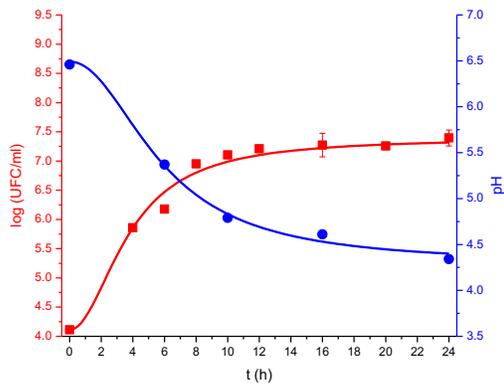
El medio CGB es un medio típico para el crecimiento de BAL, contiene los nutrientes necesarios para su crecimiento óptimo, sin embargo la velocidad de crecimiento y el crecimiento máximo obtenido varía entre las cepas, ya que aunque se someten a las mismas condiciones, son distintos géneros y especies.

Tabla 4. Velocidades específicas de crecimiento y crecimiento máximo en CGB

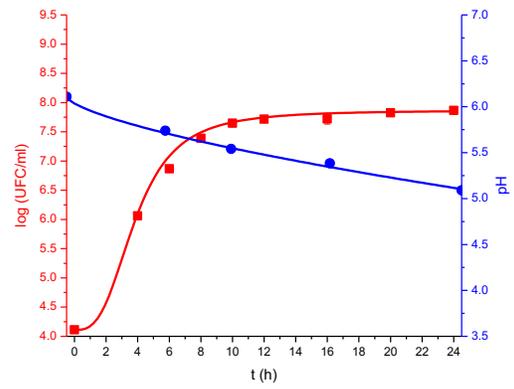
Cepa	μ (h ⁻¹)	Crecimiento máximo log (UFC/ml)
<i>Lactobacillus sakei</i> UAM-MGJP1	0.333	7.392
<i>Enterococcus faecium</i> MXVK29	0.765	8.138
<i>Pediococcus acidilactici</i> MXVK133	0.487	9.355
<i>Pediococcus acidilactici</i> UAM-MGP1	0.469	9.184

Lactobacillus sakei UAM-MGJP1

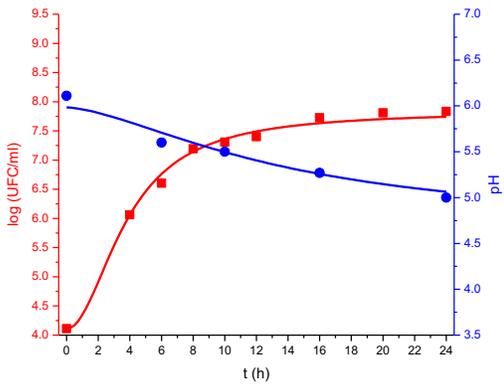
Para evaluar el comportamiento de *Lactobacillus sakei* UAM-MGJP1 en los medios de cultivo estandarizados se realizó la cinética para cada medio, tomando en cuenta las UFC/ml y el cambio de pH. En la Figura 7, se muestra el comportamiento que tuvo *L. sakei* en los distintos medios. Se puede observar que el crecimiento fue muy similar en todos los medios de cultivos utilizados y que sin importar la composición la BAL tiene la capacidad de adaptarse y crecer favorablemente. La disminución de pH fue distinta al medio de referencia, en los medios estandarizados disminuyó alrededor de una unidad mientras que en CGB disminuye más de dos unidades de pH. Sin embargo, en todos los medios el pH disminuyó durante la cinética indicando que las bacterias produjeron ácido láctico y este acidificó los medios.



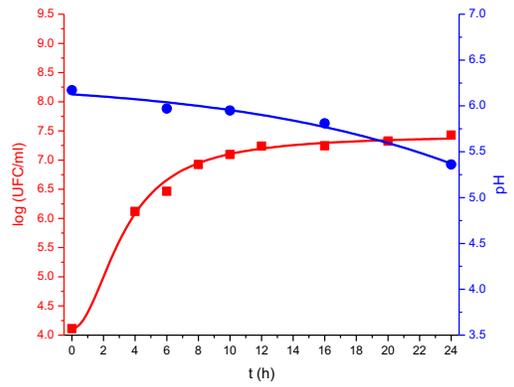
CGB



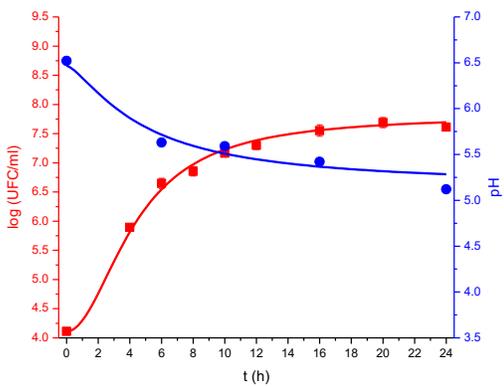
Salchicha de pavo



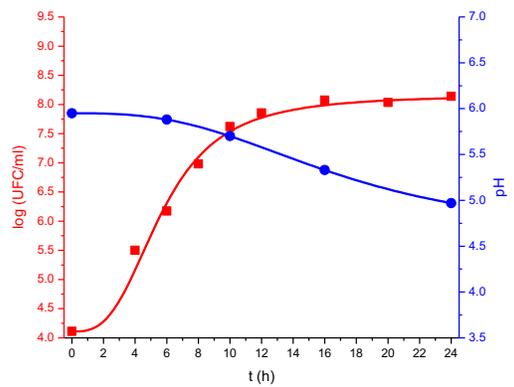
Tocino ahumado



Queso de puerco



Chorizo



Jamón York

Figura 7. Curvas de crecimiento de *L. sakei* UAM-MGJP1 en los 6 medios de cultivo.

En la Figura 8 se muestra que no hay diferencia mínima significativa en la velocidad de crecimiento entre los medios de residuos y el de referencia. Esto puede indicar que los medios son ricos en nutrientes para el crecimiento de esta cepa, ya que la fase de adecuación es muy corta y el alto contenido de grasa en medios como el de tocino y el de queso de puerco no afectan en la μ , incluso en el medio de queso de puerco presentó una mayor velocidad que en el CGB.

El valor máximo de crecimiento varió significativamente en los medios de salchicha de pavo, tocino ahumado y jamón York ya que en estos los valores de UFC son mayores que cuando crecieron en CGB. En el medio de jamón York, el crecimiento fue arriba de los 8 logaritmos y es el medio que presenta menor grasa en su composición (0.98%). Por otro lado, el medio de queso de puerco que no tuvo diferencia significativa en el crecimiento respecto al CGB, tiene un alto contenido en grasa mayor al 3%. Sin embargo, no hay una tendencia que relacione el crecimiento máximo con el contenido graso presente en el medio.

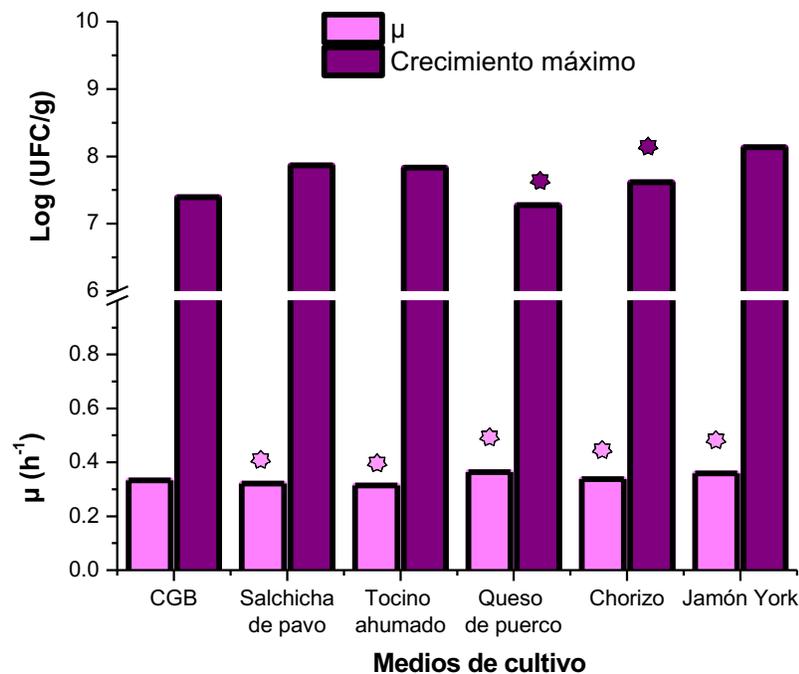


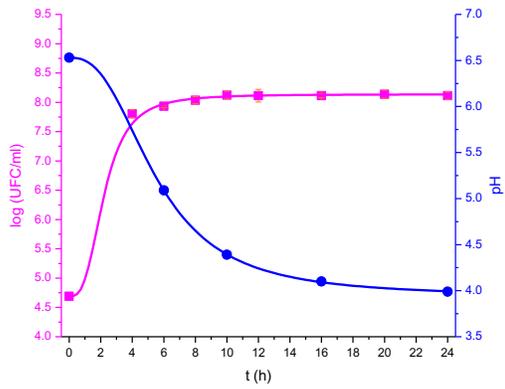
Figura 8. Velocidades de crecimiento (μ) y valores máximos de crecimiento de *L. sakei* UAM-MGJP1 en los 6 medios de cultivo. * Indica que no hay diferencia significativa con el medio CGB.

Enterococcus faecium MXVK29

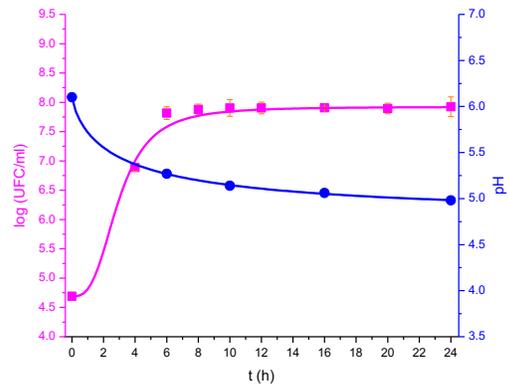
Como se observó en la Figura 6, *E. faecium* MXVK29 fue la BAL que creció en menor cantidad de tiempo, es decir tuvo una velocidad de crecimiento mayor.

El crecimiento de los *Enterococcus* se ve favorecido por la presencia de peptonas, hidrolizados y extractos (Díaz *et al.*, 2013), el medio CGB contiene en su composición peptona biotriptasa y extracto de levadura por lo que se considera un medio que favorece su crecimiento, con esto se puede explicar por qué en este medio la velocidad de crecimiento fue significativamente mayor que en los otros medios.

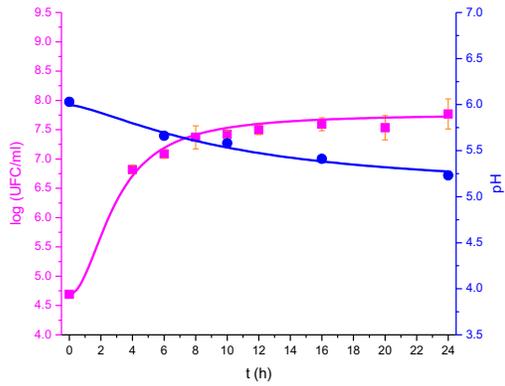
Dado que los enterococos presentan un metabolismo homofermentativo, la producción de ácido láctico se ve reflejado en la disminución del pH. Sin embargo, como se observa en la Figura 9 en medios como el de queso de puerco y el de jamón York no se ve reflejada esta disminución de pH, esto se puede deber a que al tener alta concentración de proteínas en el medio, se presente una acumulación de aminos haciendo un efecto de amortiguamiento de pH (Simpson y Benjamin, 2012). Recordando que estos medios son los que tienen mayor concentración de nitrógeno presente en el medio, el de queso de puerco con 0.54% y el de jamón York con 0.56%.



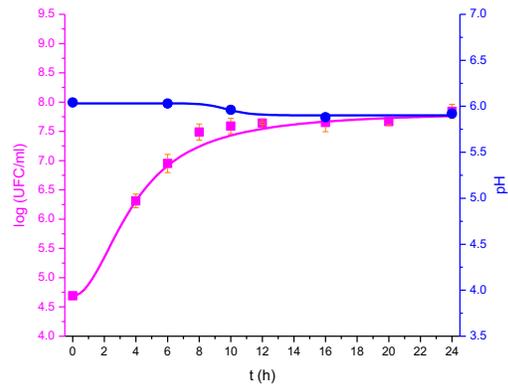
CGB



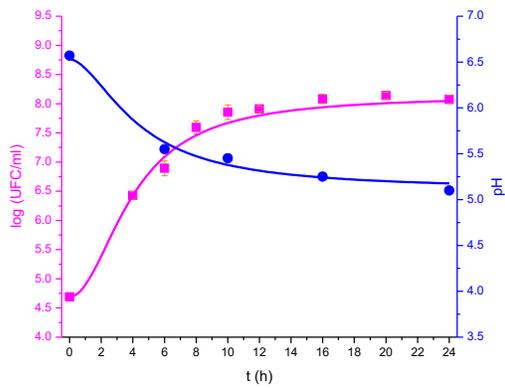
Salchicha de pavo



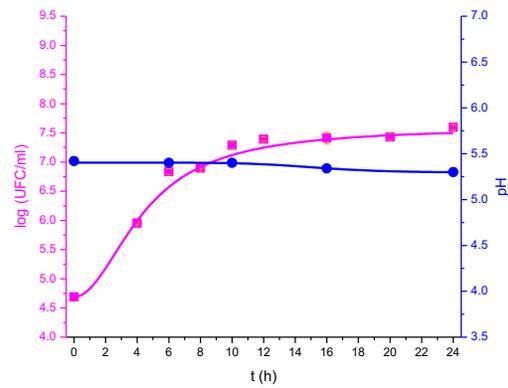
Tocino ahumado



Queso de puerco



Chorizo



Jamón York

Figura 9. Curvas de crecimiento de *E. faecium* MXVK29 en los 6 medios de cultivo

En la Figura 10, se observa la variación de la velocidad de crecimiento y la concentración de células al cambiar el medio de cultivo. *E. faecium* MXVK29 crece en muy poco tiempo en CGB con una velocidad cercana a 0.8 h^{-1} , mientras que en el medio de jamón York es de 0.3 h^{-1} . El medio de cultivo de salchicha de pavo es el que en su composición tiene menor concentración de nitrógeno total (0.15%), sin embargo es el medio que tiene una μ más cercana a la del medio de referencia, por lo que el nitrógeno presente en el medio pudo ser más óptimo para su crecimiento que el nitrógeno presente en los demás medios.

A pesar de que la μ en el medio de cultivo de chorizo fue alrededor de 0.3 h^{-1} , estadísticamente, no hubo diferencia significativa en el crecimiento máximo entre el medio CGB y este medio, ambos con valores mayores a 8 logaritmos.

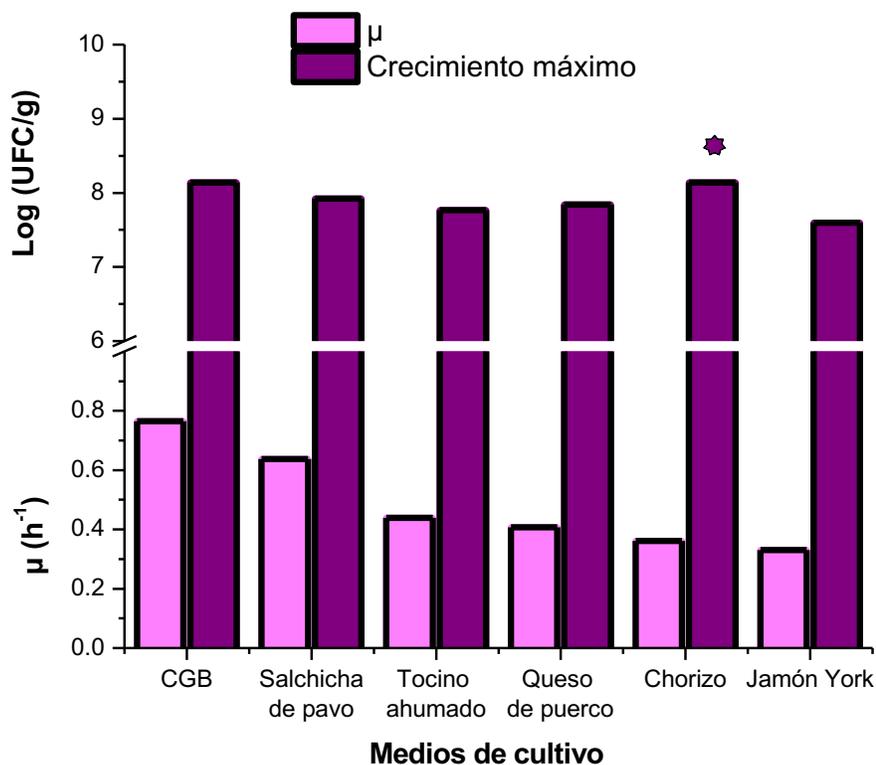


Figura 10. Velocidades de crecimiento (μ) y valores máximos de crecimiento de *E. faecium* MXVK29 en los 6 medios de cultivo. * Indica que no hay diferencia significativa con el medio CGB.

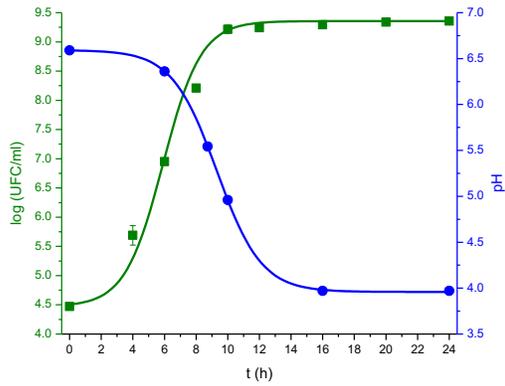
Pediococcus acidilactici

El género *Pediococcus* requiere de compuestos complejos de nitrógeno, por lo tanto no son capaces de utilizar sales de amonio como única fuente de nitrógeno (Contreras, 2013).

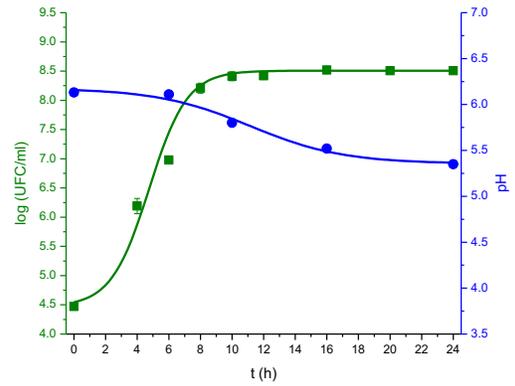
Al comparar las Figuras 11 y 12 se observa que las cinéticas de *P. acidilactici* MXVK133 y *P. acidilactici* UAM-MGP1 son muy similares en todos los medios.

En el medio de cultivo de queso de puerco ambas cepas presentaron una fase exponencial más prolongada pero con menor crecimiento, es decir la velocidad de crecimiento fue menor. Se sabe que el queso de puerco es una fuente rica de colágeno, proteínas que podrían ser una fuente de nitrógeno para las bacterias, pero no con los aminoácidos asimilables que tiene el medio de referencia por lo que el crecimiento se vio afectado disminuyendo la μ respecto al medio CGB. Este medio de cultivo tiene más del doble de concentración de nitrógeno (0.54%) que el medio CGB (0.21%), y dado que este género requiere de compuestos complejos de nitrógeno para crecer en óptimas condiciones, el medio de queso de puerco podría no tener dichos componentes y es por eso que presentó una velocidad menor y a su vez creció menos.

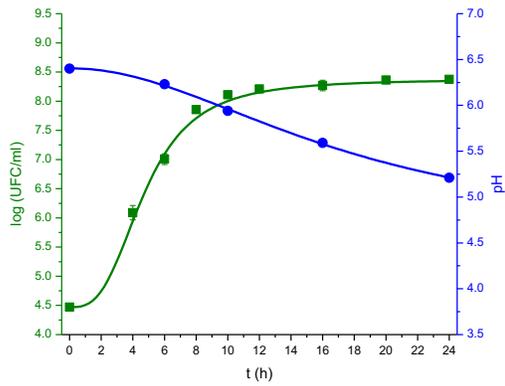
En la Figura 11, se observa que en los medios de queso de puerco y de jamón York el pH disminuye muy poco; son medios ricos en nitrógeno, ambos por arriba del 0.5% y *P. acidilactici* MXVK133 es una cepa para la cual se ha reportado que presenta actividad proteolítica, por lo que se produce una acumulación de aminos haciendo un efecto de amortiguamiento de pH.



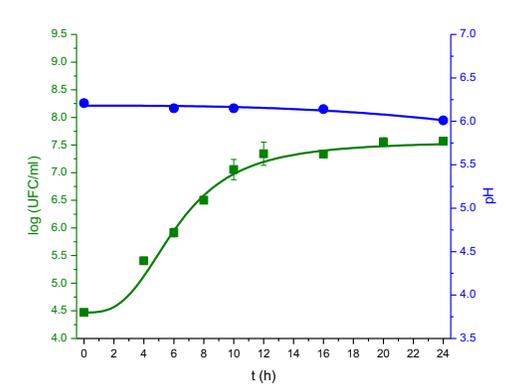
CGB



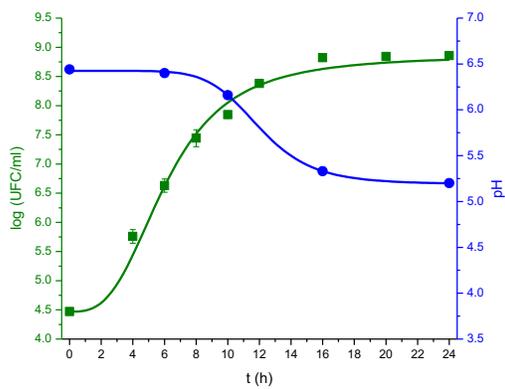
Salchicha de pavo



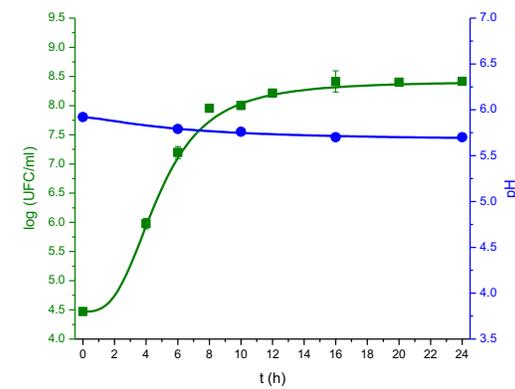
Tocino ahumado



Queso de puerco



Chorizo

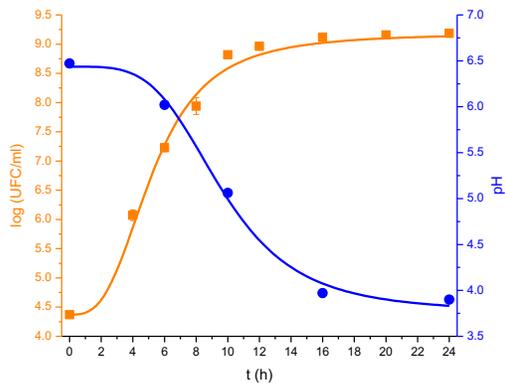


Jamón York

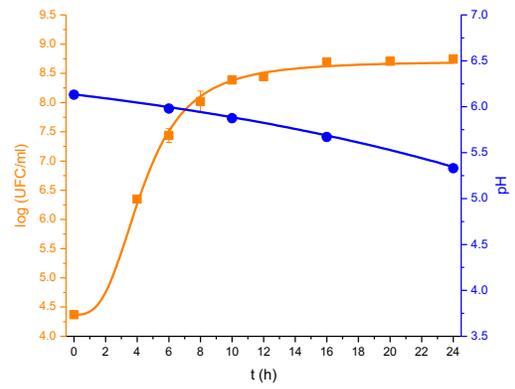
Figura 11. Curvas de crecimiento de *P. acidilactici* MXVK133 en los 6 medios de cultivo.

En la Figura 12 se observa que el pH inicial del medio de cultivo de chorizo es menor al pH inicial de los demás medios de cultivo, ya que se cambió de lote de la materia prima, este se recibió de la misma procedencia; sin embargo este cambio de pH no afecta el crecimiento ya que se sabe que *Pediococcus* puede crecer en pH de hasta 4.4 (Salminen, 2012). Y en la cinética se observa que el pH no afectó de forma negativa el crecimiento ya que es muy similar al del medio CGB.

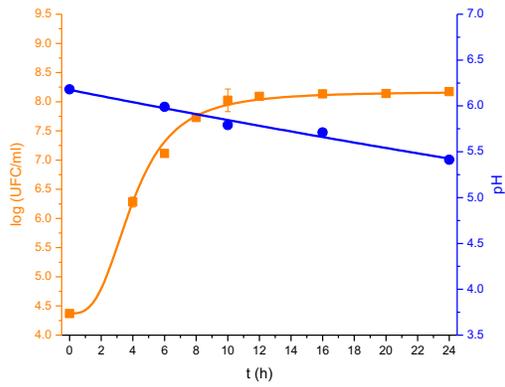
A pesar de que *P. acidilactici* UAM-MGP1 pertenece a un género exigente nutricionalmente, en los medios de cultivo de residuos tuvo los nutrientes necesarios para su crecimiento óptimo, a excepción del medio de cultivo de queso de puerco todos los demás presentaron una cinética similar a la del medio CGB.



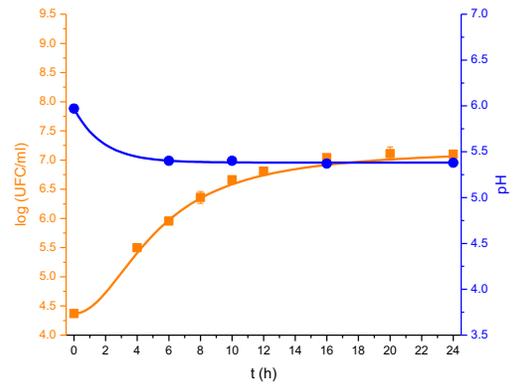
CGB



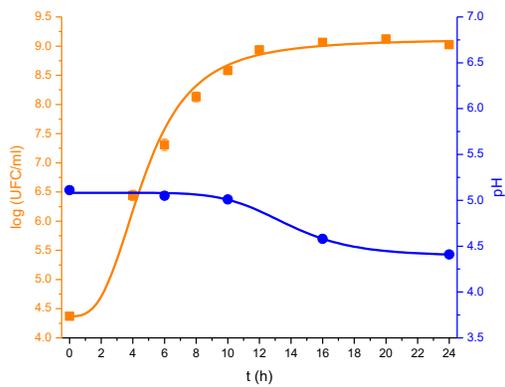
Salchicha de pavo



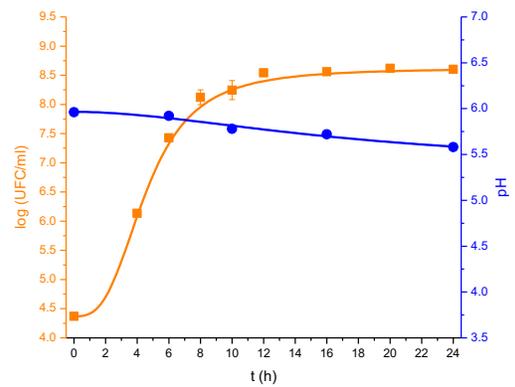
Tocino ahumado



Queso de puerco



Chorizo



Jamón York

Figura 12. Curvas de crecimiento de *P. acidilactici* UAM-MGP1 en los 6 medios de cultivo.

En la Figura 13 y 14 se observa que los *Pediococcus* tuvieron un comportamiento muy similar, a pesar de ser cepas distintas. En el medio donde crecen menos y con una menor velocidad es el de queso de puerco, podría deberse a la composición del medio al no tener los nutrientes necesarios para un óptimo crecimiento.

En el medio de cultivo de salchicha de pavo las dos cepas de *Pediococcus* tuvieron una velocidad crecimiento sin diferencia significativa respecto al medio CGB, lo que indica que tuvo los nutrientes necesarios para adaptarse rápidamente al medio, sin embargo las UFC presentes en el medio fueron menores alrededor de un logaritmo.

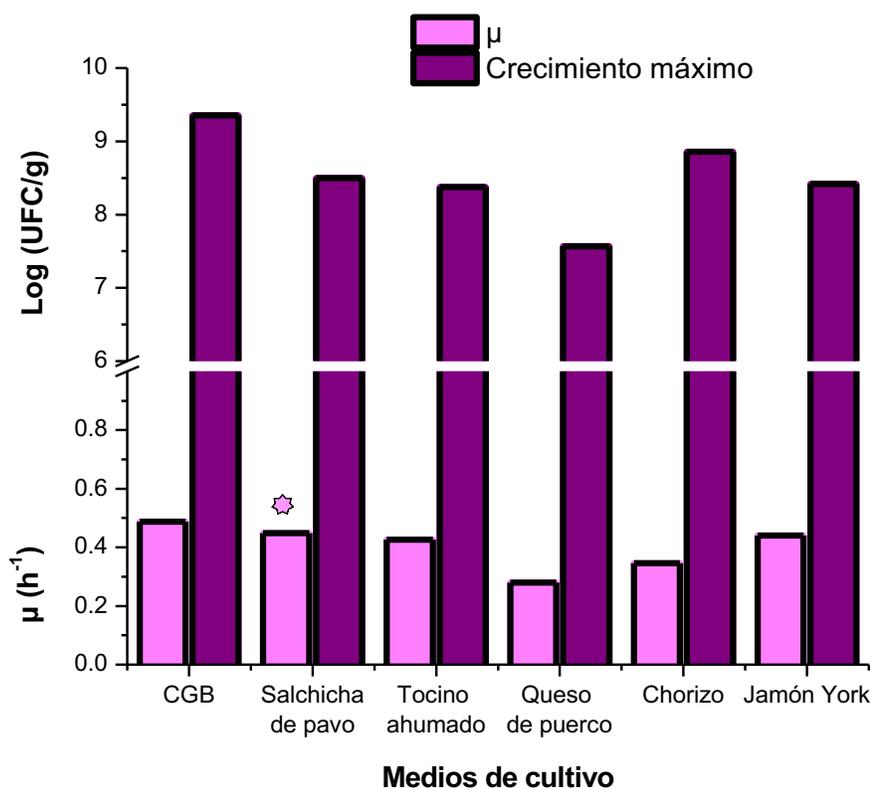


Figura 13. Velocidades de crecimiento (μ) y valores máximos de crecimiento de *P. acidilactici* MXVK133 en los 6 medios de cultivo. * Indica que no hay diferencia significativa con el medio CGB.

En la Figura 14, se observa que la μ obtenida para la cepa *P. acidilactici* UAM-MGP1 en los medios de salchicha, tocino y chorizo, no tienen diferencia significativa con el medio CGB, sin embargo al comparar el crecimiento y la velocidad en el medio de chorizo se observa que no hubo diferencia significativa.

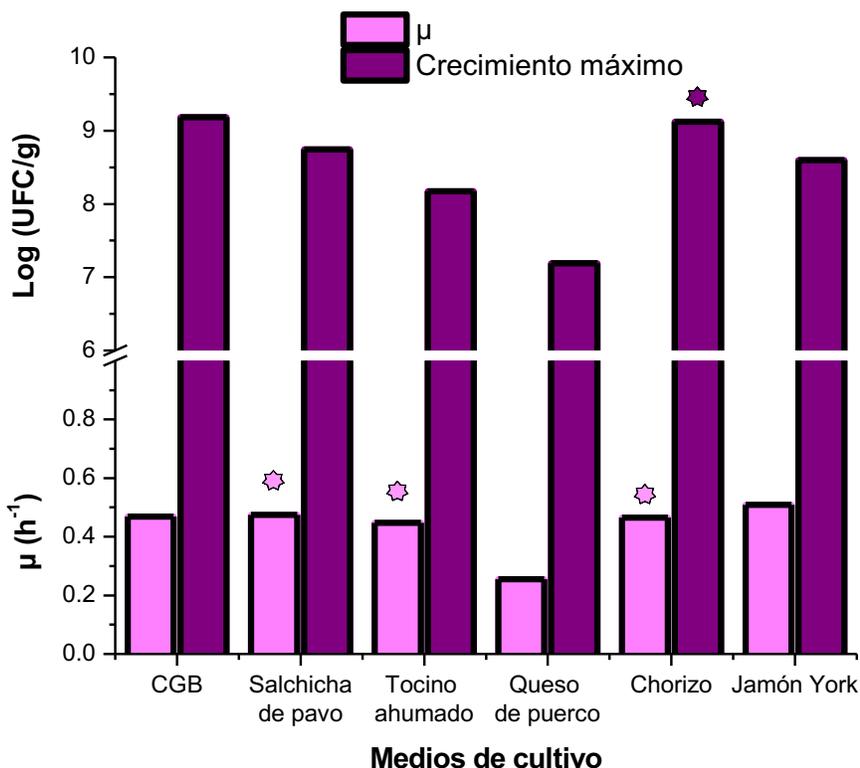


Figura 14. Velocidades de crecimiento (μ) y valores máximos de crecimiento de *P. acidilactici* UAM-MGP1 en los 6 medios de cultivo. * Indica que no hay diferencia significativa con el medio CGB.

La velocidad de crecimiento microbiano se utiliza para caracterizar el comportamiento de una población; su valor depende principalmente de la composición del medio de cultivo, presencia de inhibidores, temperatura y pH. En la Tabla 5 se presentan los valores de μ de las cuatro BAL analizadas en los 6 medios de cultivo. *Enterococcus faecium* MXVK29, es la cepa que presentó mayor variación entre sus μ , por otro lado las dos cepas de *Pediococcus* presentaron valores muy similares.

Al analizar los valores de la Tabla 5, se puede observar que el medio de cultivo sí influye en la velocidad de crecimiento; *E. faecium* MXVK29, *P. acidilactici*

MXVK133 y *P. acidilactici* UAM-MGP1 presentaron valores de μ variables al cambiar el medio de cultivo.

En el caso de *L. sakei* UAM-MGJP1, la velocidad de crecimiento no tuvo diferencia significativa entre los medios estandarizados y el medio CGB, lo que indica que son medios con los nutrientes necesarios para un crecimiento óptimo.

Las μ de *Enterococcus faecium* MXVK29 tuvieron diferencia respecto al medio de referencia ya que todas tuvieron valores por debajo de las que presentó cuando creció en el medio CGB.

Las cepas de *Pediococcus*, tuvieron una cinética muy parecida, se considera un género estricto nutricionalmente lo que indica que los medios son ricos en estos nutrientes para que puedan crecer satisfactoriamente.

Tabla 5. Velocidades específicas de crecimiento de las bacterias lácticas en los diferentes medios de cultivo

Medio	<i>Lactobacillus sakei</i> UAM-MGJP1	<i>Enterococcus faecium</i> MXVK29	<i>Pediococcus acidilactici</i> MXVK133	<i>Pediococcus acidilactici</i> UAM-MGP1
	(h ⁻¹)			
CGB	0.333	0.765	0.487	0.469
Salchicha de pavo	0.321	0.638	0.448	0.475
Tocino ahumado	0.314	0.439	0.426	0.447
Queso de puerco	0.364	0.407	0.280	0.255
Chorizo	0.338	0.361	0.346	0.465
Jamón York	0.359	0.330	0.440	0.509

Pruebas presuntivas en difusión en agar

Los métodos de susceptibilidad antimicrobiana son métodos *in vitro* que determinan la sensibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes microbianos bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas (Palavecino, 1997). La técnica de difusión en agar es ampliamente usada como prueba presuntiva para determinar si hay actividad antimicrobiana contra un microorganismo que se quiere inhibir. Se evaluaron los sobrenadantes de las 4 cepas en los 6 medios de cultivo en 3 tiempos distintos, a las 4, 8 y 14 h. Sin embargo, el tiempo en que las cepas presentaron mayor actividad fue a las 8 h.

Tabla 6. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes contra bacterias lácticas

Cepa	Medio de cultivo	Microorganismo blanco		
		<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Weissella viridescens</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
mm halo/mg proteína				
	CGB	47.1±0.8	70.5±0.9	94.3±1.2
<i>L. sakei</i> UAM-MGJP1	Tocino ahumado	42.6±0.7	ND	ND
	Chorizo	49.3±0.3	ND	ND
	Jamón York	68.0±0.9	ND	ND
<i>E. faecium</i> MXVK29	CGB	68.4±0.4	66.2±0.8	159.5±1.1
	Jamón York	22.2±0.1	ND	ND
<i>P. acidilactici</i> MXVK133	CGB	81.9±0.7	81.9±0.4	106.1±0.9
	Chorizo	ND	ND	176.9±1.3
<i>P. acidilactici</i> UAM-MGP1	CGB	65.8±0.2	65.8±0.2	114.4±0.9

*ND: No detectado.

En la Tabla 6 se observa que *L. sakei* UAM-MGJP1 cuando crece en los medios de cultivo de tocino ahumado y chorizo presentó actividad contra sí mismo, efecto que se observó cuando se inoculó en CGB. Sin embargo, esta inhibición no se

observó cuando la cepa creció en medio de cultivo de salchicha y queso de puerco.

El mayor efecto se observó sobre *Leuconostoc mesenteroides*, bacteria que se ha identificado que produce efectos no deseables en alimentos como jamón y salchicha.

García-Cano y colab. (2011), reportaron que *Pediococcus acidilactici* presentaba actividades líticas por PGH contra *M. lysodeikticus* y *Staphylococcus aureus*, y como se observa en la Tabla 7, las dos cepas de *P. acidilactici* presentaron actividad contra *S. aureus*.

Tabla 7. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes contra bacterias patógenas

Cepa	Medio de cultivo	Microorganismo blanco	
		<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
		mm halo/mg proteína	
<i>L. sakei</i> UAM-MGJP1	CGB	ND	92.8±0.6
<i>E. faecium</i> MXVK29	CGB	93.5±0.7	ND
<i>P. acidilactici</i> MXVK133	CGB	ND	123.8±0.9
	Salchicha de pavo	ND	144.5±0.8
<i>P. acidilactici</i> UAM-MGP1	CGB	95.8±0.9	65.8±0.4
	Jamón York	34.33±0.1	ND

*ND: No detectado.

En investigaciones realizadas anteriormente por el grupo de trabajo del laboratorio S-132 de la UAM-I se aislaron e identificaron por métodos moleculares microorganismos presentes en exudado de salami rebanado y salchicha (Palafox, 2015). Siguiendo la metodología de difusión en agar, se realizó esta prueba con los exudados como microorganismo blanco. En la Tabla 8, se presentan diámetro de halos de inhibición por mg de proteína.

Las cepas presentaron mayor actividad inhibitoria contra los microorganismos presentes en los exudados que contra los microorganismos blanco descritos en las Tablas 6 y 7, esto se puede explicar debido a que algunas bacterias producen péptidos con actividad antimicrobiana como una estrategia que les permite competir favorablemente contra otros microorganismos (Cotter *et al.* 2005; Zheng *et al.*, 2015).

Tabla 8. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes contra exudados de productos cárnicos

Cepa	Medio de cultivo	Microorganismo blanco	
		Exudado de salchicha	Exudado de salami
		mm halo/mg proteína	
	CGB	ND	ND
<i>L.sakei</i> UAM-MGJP1	Salchicha de pavo	42.2±0.5	105.5±1.2
	Tocino ahumado	17.0±0.1	51.1±0.8
	Queso de puerco	11.6±0.1	63.3±0.9
	Jamón York	19.3±0.2	85.9±1.0
	CGB	ND	ND
<i>E.faecium</i> MXVK29	Salchicha de pavo	25.2±0.3	44.7±0.5
	Chorizo	36.3±0.2	88.3±0.9
	Jamón York	26.7±0.3	57.9±0.8
	CGB	ND	ND
<i>P. acidilactici</i> MXVK133	Salchicha de pavo	38.8±0.5	78.9±0.9
		95.8±1.1	65.7±0.9
<i>P. acidilactici</i> UAM-MGP1	Salchicha de pavo	34.3±0.4	ND
	Tocino ahumado	16.6±0.4	58.2±0.7
	Queso de puerco	189.0±1.7	30.6±0.5
	Jamón York	17.2±0.2	ND

*ND: No detectado.

Los medios de cultivo utilizados tradicionalmente para BAL tienen distintas fuentes de nitrógeno como lo son: peptona biotriptasa, peptona de caseína, extracto de

levadura, extracto de carne. Estas fuentes tienen distintos contenidos de nitrógeno, el cual no siempre puede ser asimilado por la bacteria de manera eficaz, siendo mejor fuente la peptona de caseína o peptona proteosa que ofrecen un mayor contenido de aminoácidos asimilables que los extractos de carne o levadura (Contreras, 2013). Se ha reportado que la concentración o ausencia de la fuente de nitrógeno, ayuda al incremento de la producción de compuestos antibacterianos como bacteriocinas (Pantev, 2002). El medio de salchicha de pavo es el medio con menor concentración de nitrógeno y es el medio donde todas las cepas presentaron actividad contra los microorganismos de los exudados, esto se puede deber a que el nitrógeno presente en el medio era una fuente más asimilable que los demás medios aun cuando tuvieron mayor concentración de nitrógeno.

Las condiciones que afectan el metabolismo de los microorganismos incluyen nutrientes, agua, pH, inhibidores, oxígeno, temperatura y tiempo (Chan *et al.*, 2002). Dado que condiciones como temperatura, agitación, tiempo fueron las mismas para el crecimiento de todos los microorganismos, se descartan como factores para que haya influido en la producción de proteasas y lipasas.

En la Tabla 9, se puede observar que cuando las cepas son cultivadas en medio CGB, estas no logran sintetizar proteasas ni lipasas. Sin embargo, cuando se inocularon en los medios estandarizados la composición del medio de cultivo afectó directamente a estas cepas en la producción de dichas enzimas.

E. faecium MXVK29 no presentó actividad lipolítica en ningún medio de cultivo, lo que indica que en estos medios no es capaz de producir lipasas capaces de hidrolizar a la tributirina. Se observó que la cepa de *P. acidilactici* MXVK133 no tuvo producción de proteasas en ningún medio inoculado. Por otra parte, *P. acidilactici* UAM-MGP1 si produjo proteasas y lipasas cuando creció en los medios de tocino ahumado y queso de puerco, medios con más del 3% de grasa en su composición.

El término estrés se refiere a cualquier factor o condición que afecte el crecimiento o supervivencia microbiana, y una vez que los microorganismos detectan el factor

de estrés sigue una respuesta adaptativa o de protección, la cual incrementa la tolerancia del organismo a la condición estresante que impide su desarrollo. Casos de esta respuesta adaptativa son entre otras, que los microorganismos pueden producir proteínas que reparen el daño, mantengan la célula o eliminen el agente de estrés (Yousef y Juneja, 2003). En la Tabla 9 se observa que la producción de proteasas y lipasas en las cuatro cepas se dio cuando crecieron en medios de residuos cárnicos, medios ricos en proteínas y grasa, las cepas pudieron entrar en estrés microbiano y producir enzimas que les permitiera adaptarse mejor a los medios.

Tabla 9. Actividad proteolítica y lipolítica de sobrenadantes

Cepa	Medio de cultivo	Actividad proteolítica	Actividad lipolítica
		mm halo/mg proteína	
<i>L. sakei</i> UAM-MGJP1	CGB	ND	ND
	Salchicha de pavo	41.5±0.5	40.2±0.4
	Tocino ahumado	75.1±0.7	85.1±0.9
	Queso de puerco	62.8±0.7	67.3±1.0
	Chorizo	70.4±0.3	ND
	Jamón York	28.1±0.3	31.2±0.4
<i>E. faecium</i> MXVK29	CGB	ND	ND
	Salchicha de pavo	199.5±1.5	ND
	Chorizo	79.3±0.8	ND
<i>P. acidilactici</i> MXVK133	CGB	ND	ND
	Chorizo	ND	65.0±0.9
<i>P. acidilactici</i> UAM-MGP1	CGB	ND	19.0±0.2
	Salchicha de pavo	ND	32.8±0.4
	Tocino ahumado	59.2±0.5	18.3±0.1
	Queso de puerco	75.6±0.7	39.1±0.4

*ND: No detectado.

Determinación del perfil proteínico, de la actividad lítica, proteolítica y lipolítica mediante zimogramas en SDS-PAGE

Se realizaron geles de acrilamida con SDS al 10% para obtener el perfil proteínico, así como zimogramas contra *M. lysodeikticus* o gelatina como sustratos para determinar actividad lítica y proteolítica, respectivamente. El tiempo de cultivo para tomar los sobrenadantes fue de 8 h. Todos los sobrenadantes se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) para evitar interferencia durante la electroforesis con otros componentes del medio como grasa o carbohidratos, ya que este método es efectivo para remover sales, polisacáridos y detergentes de las proteínas (Montuenga, 2009).

En la Figura 15-A se presenta el perfil electroforético de diversos sobrenadantes provenientes de diferentes fuentes y microorganismos. Se puede apreciar algunas bandas bien definidas, que son proteínas extracelulares.

En la Figura 15-B se observa que las proteínas con actividad lítica están alrededor de los 70- y 110-kDa y no todas las muestras que se corrieron presentaron actividad. A pesar de que *P. acidilactici* MXVK133 mostró actividad inhibitoria en la prueba de difusión en agar, no presentó actividad en zimograma contra *M. lysodeikticus*, esto pudo deberse a que la sensibilidad de ambos métodos es distinta.

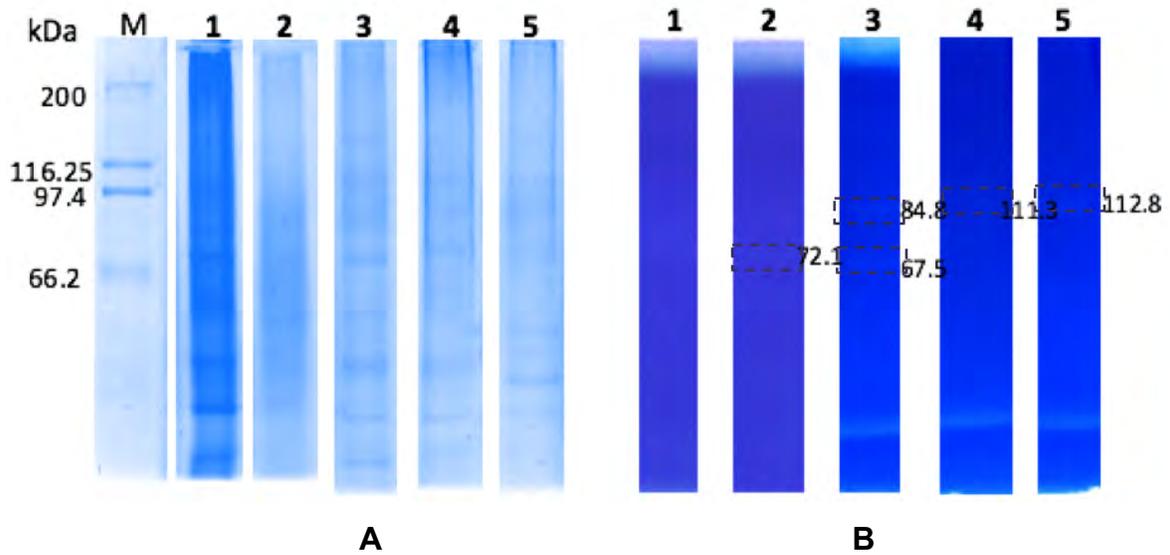


Figura 15. A. Gel de poliacrilamida al 10%. **B.** Zimograma al 10% contra *M. lysodeikticus*. Sobrenadantes precipitados con TCA. Carril 1, *L. sakei* (Salchicha de pavo); carril 2, *L. sakei* (Jamón York); carril 3, *E. faecium* MXVK29 (Chorizo); carril 4, *E. faecium* MXVK29 (CGB); carril 5, *P. acidilactici* UAM MGP1 (Tocino ahumado).

L. sakei y *E. faecium* fueron las cepas que mostraron mayor actividad proteolítica en zimograma, cuando fueron inoculadas en los medios de cultivo de tocino ahumado, chorizo y queso de puerco. El hecho de que en estos medios haya una mayor producción de proteasas puede deberse a las diferentes fuentes de nutrimentos y a la concentración en que están presentes, ya que podría deberse a que son medios con una concentración mayor de nitrógeno que el medio CGB. Ninguna de las cepas en estudio presentó actividad proteolítica en CGB, lo que indica que los medios de residuos tuvieron un efecto para que hubiera producción de estas enzimas.

Un estudio del efecto de la fuente de carbono en la producción de proteasas por *Bacillus licheniformis* concluyó que al agregar glucosa al medio como única fuente de carbono se presentaba un efecto negativo de la glucosa sobre la síntesis de proteasas (Ageitos *et al.*, 2007). Esta puede ser la razón por la que las cepas no mostraron actividad en CGB, mientras que en medios como tocino ahumado, queso de puerco y chorizo sí presentaron proteólisis; la concentración de hidratos

de caborno se ajustó para todos los medios al 1.05%, sin embargo en el caso de los medios de residuos no todo ese porcentaje era unicamente glucosa como en el medio CGB.

En la figura 16 se observa el zimograma de actividad protelítica, utilizando como sustrato gelatina. Se observan bandas por debajo de los 66-kDa y cuando *E. faecium* creció en el medio de queso de puerco se observó una banda de actividad proteolítica con tamaño aproximado a 89.3-kDa.

Lactobacillus sakei fue la cepa que presentó mayor producción de proteasas en los medios de residuos, ya que en el medio CGB no hubo presencia de bandas con actividad proteolítica. Esto pudo deberse a la fuente de nitrógeno presente en los medios.

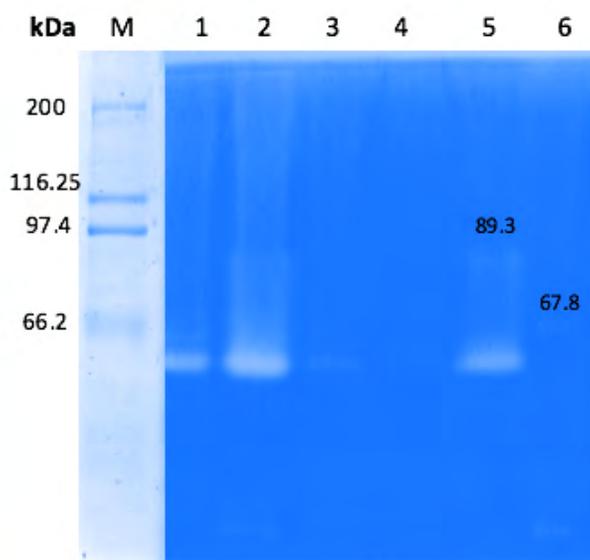


Figura 16. Zimograma de actividad proteolítica. Sobrenadantes precipitados con TCA. Carril 1, *L. sakei* UAM-MGJP1 (Tocino ahumado); carril 2, *L. sakei* UAM-MGJP1 (Chorizo); carril 3, *L. sakei* UAM-MGJP1 (Queso de puerco); carril 4, *L. sakei* (salchicha de pavo); carril 5, *E. faecium* MXVK29 (Queso de puerco); carril 6, *E. faecium* MXVK29 (Chorizo).

En el zimograma de actividad lipolítica (Figura 17) se observa que los géneros que produjeron lipasas fueron *Lactobacillus* y *Pediococcus*, géneros que están

filogenéticamente relacionados y que en algunos casos producen los mismos metabolitos (Zheng, 2015). Sin embargo, el medio de cultivo también tiene efecto en la producción de estas enzimas, se observa que hubo presencia de bandas en medios que en su composición hay mayor lípidos que en el medio CGB.

En la Figura 17, se observa que *L. sakei* produce enzimas con actividad lipolítica por debajo de los 66-kDa. Sin embargo, *P. acidilactici* UAM-MGP1 cuando creció en tocino ahumado se observó una banda con actividad de 110.4 kDa.

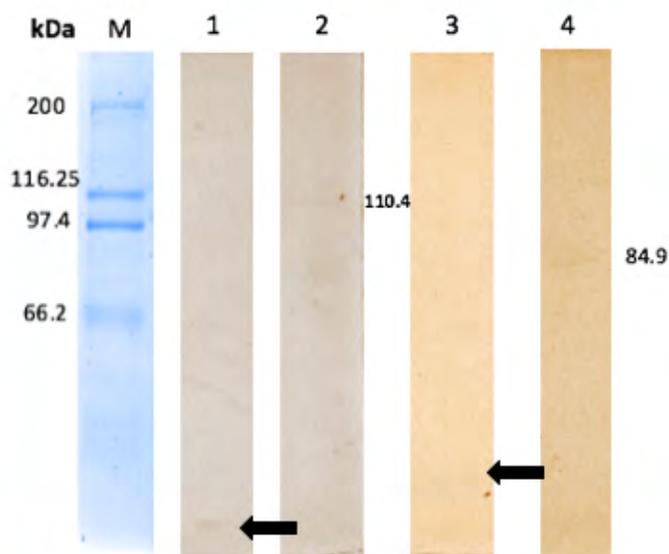


Figura 17. Zimograma de actividad lipolítica. Sobrenadantes precipitados con TCA. Carril 1, *L. sakei* UAM-MGJP1 (Tocino ahumado) condiciones nativas; carril 2, *P. acidilactici* UAM-MGP1 (Tocino ahumado) condiciones nativas; carril 3, *L. sakei* UAM-MGJP1 (salchicha de pavo) condiciones desnaturalizantes; carril 4, *P. acidilactici* MXVK133 (chorizo) condiciones desnaturalizantes.

Los residuos cárnicos pueden ser aprovechados dentro de la industria cárnica, ya que como se observó cuentan con los requerimientos necesarios para el crecimiento de BAL y a su vez favorecen en la producción de metabolitos con posible aplicación en la industria de alimentos. La producción de proteasas y lipasas por las cepas en estudio son de gran importancia. Ambas están relacionadas con la textura, sabor y aroma de los productos fermentados, mejorando las propiedades organolépticas de los alimentos. Además, los residuos cárnicos son un buen sustrato para el crecimiento y producción de proteínas con actividad inhibitoria, lo que brinda al consumidor un producto inocuo.

CONCLUSIONES

- Los residuos cárnicos utilizados cuentan con los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento de BAL, como *Lactobacillus sakei* UAM MGJP1, *Enterococcus faecium* MXVK29, *Pediococcus acidilactici* MXVK29 y *Pediococcus acidilactici* UAM-MGP1 y estas a su vez producir enzimas de interés biotecnológico, como proteínas con actividad lítica, proteasas y lipasas.
- *Lactobacillus sakei* UAM-MGJP1, presentó los valores de velocidad específica de crecimiento más bajos y tuvo menor crecimiento, sin embargo fue la cepa con más actividad cuando creció en los medios estandarizados.
- La producción de enzimas varía de acuerdo a la composición del medio de cultivo, ya que las bacterias lácticas presentaron mayor actividad lítica y proteolítica en los medios estandarizados con respecto al medio de referencia.
- Se observó la producción de enzimas con actividad lítica contra *M. lysodeikticus*, alrededor de 70- y 110-kDa por *L. sakei* UAM-MGJP1, *P. acidilactici* UAM-MGP1 y *E. faecium* MXVK29.
- Los medios de residuos favorecieron la producción de proteasas por *L. sakei* UAM-MGJP1 y *E. faecium*.
- La producción de lipasas se dio en medios de cultivo de tocino ahumado, chorizo y salchicha de pavo en las cepas de *L. sakei* UAM-MGJP1, *P. acidilactici* MXVK133 y *P. acidilactici* UAM-MGP1.
- Esta propuesta permitirá aprovechar los residuos cárnicos generados por la industria, para el crecimiento de bacterias ácido lácticas y a su vez evaluar el efecto de los metabolitos producidos e identificados en la conservación de alimentos cárnicos procesados, con la finalidad de reducir costos y con la intención de producir compuestos con diferentes actividades para alargar la vida de anaquel de sus productos y desarrollar diferentes propiedades organolépticas deseables en embutidos cárnicos.

PERSPECTIVAS

- Evaluar combinaciones de distintos tipos de residuos cárnicos como medio de cultivo.
- Explorar las actividades microbianas y caracterizar las proteasas y lipasas encontradas en esta investigación.

REFERENCIAS

- Ageitos, J., Vallejo, J., Sestelo, A., Poza, M., Villa, T. (2007). Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2205-2213.
- Akhavan, S., Jabalameli, L. (2011). Effect of culture conditions on the production of an extracellular protease by *Bacillus* sp. isolated from soil sample of Avizan Jungle Park. *Enzyme Research*.
- AOAC-INTERNATIONAL. (2005). *Official Methods of Analysis* (Vol. 18th Ed.). Gaithersburg.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos* (Vol. Cuarta Edición). Estado de México: Pearson.
- Benito, M., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevaldo, F., Ruíz-Moyano, S., Córdoba, M. (2007). Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented salchichón and chorizo sausages. *Journal of food science*, 193-201.
- Bermúdez, G. E. (2010). *Modificación enzimática de flavonoides con las carboxilesterasas*. Tesis de licenciatura, UNAM, México, D.F.
- Biswas, S., Purbita, R., Jhonson, C., Ray, B. (1991). Influence of Growth conditions on the Production of a Bacteriocin, Pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H⁺. *Applied and environmental microbiology*, 57(4), 1265-1267.
- Block, S. (1991). *Peroxigen compounds in Desinfection, sterilization and preservation*. Philadelphia: S.S. Bloc, Lea y Feabiger.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(2), 248-254.
- Callewaert, L., Walmagh, M., Michelis, C., Lavigne, R. (2011). Food applications of bacterial cell wall hydrolases. *Curr Opin Biotech*, 22, 164-171.

- Canchaya, C., Claesson, M., Fitzgerald, G., Van Sinderen, D., O'Toole, P. (2006). Diversity of the genus *Lactobacillus* revealed by comparative genomics of five species. *Microbiology*(152), 3185-3196.
- Carr, F., Chill, D., Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28, 281-370.
- Casales, G. (2012). Localización y caracterización de la actividad proteolítica de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de licenciatura, UNAM, México, D.F.
- Chaillou, S., Champomier-Verges, M., Cornet, M., Crutz-Le Coq, A., Dudez, A., Martin, V., Zagorec, M. (2005). The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nat Biotechnol*, 23, 1527-1533.
- Champomier-Verges, M., Cillou, S., Cornet, M., Zagorec, M. (2001). Erratum to "Lactobacillus sakei: recent developments and future prospects". *Research in Microbiology*, 153, 115-123.
- Chan, L., Bal, L., Cai, Z., Ouyang, F. (2002). Optimization of a culture medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *Journal of biotechnology*, 83, 27-34.
- Cleveland, J., Montville, T., Nes, I., Chikindas, M. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20.
- Contreras, M. (2013). Efecto del medio de cultivo en la producción de enzimas de interés biotecnológico por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de licenciatura. México: UNAM.
- Cotter, P., Hill, C., Ross, P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Microbiology Reviews*, 3, 777-788.
- Daeschel, M. (1989). Antimicrobial substance from acid lactic for use as food preservative. *Food Technology*, 43, 164-176.
- Danilović, B., Joković, N., Petrović, L., Veljović, K., Tolinački, M., Savić, D. (2011). The characterization of lactic acid bacteria during the fermentation of an artisan Serbian sausage (Petrovska Klobása). *Meat Science*, 88, 668-674.

- De Vuyst, L. (1995). Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 28-73.
- Díaz, M., Rodríguez, C., Zhubenko, R. (2013). *Enterococcus*, conventional and chromogenic culture media. *Rev Cubana Hig Epidemiol*, 51(1), 97-110.
- Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Assobhei, O., Hasselman, C. (1998). Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. *Journal Appl. Bacteriology*, 85, 521-526.
- FAO. (s.f.). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura*. Recuperado el 5 de Agosto de 2016, de <http://www.fao.org/ag/ags/industrias-agroalimentarias/carne-y-leche/grupos-de-productos-carnicos/es/>
- Fenton, M., Ross, R., McAuliffe, O., O'Mahony, J., Coffey, A. (2011). Characterization of the staphylococcal bacteriophage lysin CHAP(K). *J Appl Microbiol*, 111, 1025-1035.
- Fernandes, R. (2009). *Microbiology handbook: meat products*. Leatherhead: Royal Society of Chemistry.
- Fischetti, V. (2010). Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *Int J Med Microbiol*, 300, 357-362.
- Foulquié-Moreno, M., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*(106), 1-24.
- García-Cano, I., Serrano-Maldonado, C., Olvera-García, M., Delgado-Arciniega, E., Peña-Montes, C., Mendoza-Hernández, G., Quirasco, M. (2014). Antibacterial activity produced by *Enterococcus* spp. isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 1-9.
- García-Cano, I., Velasco-Pérez, L., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S., Mendoza-Hernández, S., 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, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A., Martínez, B. (2010). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends Food Sci Tech*(21), 373-382.
- Gautam, N., Sharma, N. (2009). Bacteriocin: safest approach to preserve food products. *Indian J Microbiol*, 49(3), 204-211.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International journal of Food Microbiology*, 88, 215-222.
- Gould, G. (1991). *Antimicrobial compounds in Biotechnology and food ingredients*. New York: Goldberg J.R. Williams VNRVAN Nostrand Reinhold.
- Haakensen, M., Dobson, C., Hill, J., Ziola, B. (2009). Reclassification of *Pediococcus dextrinicus* (Coster and White 1964) back 1978 (Approved Lists 1980) as *Lactobacillus dextrinicus* comb. nov., and emended description of the genus *Lactobacillus*. *Int K Syst Evol Microbiol*(59), 615-621.
- Heusen, C., Dowdle, E. (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical biochemistry*, 102, 196-202.
- Hierro, E., De la Hoz, L., Ordoñez, J. (1999). Contribution of the microbial and meat endogenous enzymes to the free amino acid and amine contents of dry fermented sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*(47), 1156-1161.
- Holt, J., Noel, R., Krieg, P., H., S., Stanley, J., Williams, T. (1999). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Vol. 9th Edition). Lippincott Williams.
- Hui, Y., Guerrero, I., Rosmini, M. (2013). *Ciencia y tecnología de carnes*. México: Limusa.
- Hutkins, R. (2006). *Microbiology and technology of fermented foods*. Iowa: Blackwell Publishing.
- Idoui, T., Karam, N. (2008). Lactic acid bacteria from Jijers traditional butter: Isolation, identification and major technological traits. *Grasas y aceites*, 59(4), 361-367.

- Johansson, G., Berdagué, J., Larsson, M., Tran, N., Borch, E. (1994). Lipolysis, proteolysis and formation of volatile components during ripening of a fermented sausage with *Pediococcus pentosaceus* and *Staphylococcus xylosus* as starter cultures. *Meat Science*(38), 203-218.
- Katla, T., Moretro, T., Sveen, I., Aasen, I., Axelsson, L., Rorvik, L., Naterstad, K. (2002). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in chicken cold cuts by addition of sakacin P producing by *Lactobacillus sakei*. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 191-196.
- Kosseva, M. (2013). Sources, Characterization, and Composition of Food Industry Wastes. En M. Kosseva, C. Webb, *Food industry wastes: assessment and recuperation of commodities* (págs. 37-60). Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Kröckel, L. (2013). The Role of Lactic Acid Bacteria in Safety and Flavour Development of Meat, Lactic Acid Bacteria. En M. Kongo, *R&D for Food, Health and Livestock Purposes* (págs. 129-152). InTech.
- Lantz, M., Ciborowski, P. (1994). Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. En *Methods in enzymology. Bacterial pathogenesis. Part A. Identification and regulation of virulence factors* (págs. 563-594). New York: V.L. Clark and P.M. Bavoil. Academic Press Inc.
- Laukova, A., Czikkova, S. (2001). Antagonistic effect of enterocin CCM 4231 from *Enterococcus faecium* on "bryndza", a traditional Slovak dairy product from sheep milk. *Microbiological Research*, 156, 31-34.
- Leclerc, D., Asselin, A. (1989). Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing gel electrophoresis. *Can J Microbiol*(35), 749-753.
- Leroy, F., De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 67-78.
- López, A. (2015). Expresión del gen estructural e inductor de la bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* y su efecto en la variación de la actividad antimicrobiana. Tesis de maestría. México: Universidad Autónoma Metropolitana.

- Lortal, S., Chapot-Chartier, M. (2005). Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *Int Dairy J*, 15, 857-871.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., Clarck, D. (2009). *Brock: Biología de los microorganismos* (Vol. 12a edición). Madrid: Pearson Educación.
- McLeod, A., Zagorec, Monique., Champomier-Vergès, M., Naterstad, K., Axelsson, L. (2010) Primary metabolism in *Lactobacillus sakei* food isolates by proteomic analysis. *BMC Microbiology* 10:120
- Montuenga, L. (2009). Técnicas en histología y biología celular. *Elsevier*, 42.
- Moreno, K. (2015). Caracterización de la respuesta inmune adaptativa de *Enterococcus faecium*. Tesis de maestría, UNAM, D.F.
- Najjari, A., Amairi, H., Chaillou, S., Mora, D., Boudabous, A., Zagorec, M., Ouzari, H. (2015). Phenotypic and genotypic characterization of peptidoglycan hydrolases of *Lactobacillus sakei*. *Journal of Advanced Research*.
- Nes, I., Holo, H. (2000). Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers (Peptide Science)*, 55, 50-61.
- Neysens, P., Messens, W., Vuyst, D. (2003). Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 29-39.
- Nielsen S. (1998). Food Analysis Second Edition; An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland, USA.
- NMX-F-065-1984. (s.f.). ALIMENTOS. SALCHICHAS. ESPECÍFICACIONES. FOODS. SAUSAGE. SPECIFICATIONS. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.
- NMX-F-126-1969. (s.f.). ALIMENTOS PARA USO HUMANO. CALIDAD PARA TOCINO. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.
- NMX-F-141-1969. (s.f.). CALIDAD PARA QUESO DE PUERCO. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.
- NMX-F-320-S-1978. DETERMINACIÓN DE FOSFATOS EN EMBUTIDOS. NORMAS MEXICANAS. DIRECCIÓN GENERAL DE NORMAS.

- NOM-145-SSA1-1995. (s.f.). PRODUCTOS CARNICOS TROCEADOS Y CURADOS. PRODUCTOS CARNICOS CURADOS Y MADURADOS. DISPOSICIONES Y ESPECIFICACIONES SANITARIAS.
- NOM-158-SCFI-2003. (s.f.). JAMÓN-DENOMINACIÓN Y CLASIFICACIÓN COMERCIAL, ESPECIFICACIONES FISICOQUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS, ORGANOLÉPTICAS INFORMACIÓN COMERCIAL Y MÉTODOS DE PRUEBA.
- Olvera, M. (2010). Efecto del medio de cultivo en la producción de compuestos antibacterianos por *Enterococcus sp.* Tesis de licenciatura, UNAM, D.F.
- O'Sullivan, O., O'Callaghan, J., Sangrador-Vegas, A., McAuliffe, O., Slaterry, L., Kaleta, P., Beresford, T. (2009). Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. *BMC Microbiol*, 5, 9-50.
- Palafox, M. (2015). *Identificación molecular de microorganismos de descomposición en productos cárnicos*. Informe de residencia profesional, Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Los Mochis.
- Palavecino, A. (1997). *Interpretación de los estudios de susceptibilidad antimicrobiana*. (Vol. 26). Boletín de la escuela de medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Pantev, A. (2002). Effects of Nitrogen Sources on Bacteriocin Production by *Enterococcus faecium* A 2000. *Folia Microbiology*, 47(6), 659-662.
- Riley, M., Wertz, J. (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, 84, 357-364.
- Richards, H. (2016). Estudio de las actividades enzimáticas de bacterias ácido lácticas aisladas de productos cárnicos madurados. Tesis de licenciatura en revisión, UNAM.
- Rizzi, G. (1988). Formation of pyrazines from acrolein precursors under mild conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*(36), 349-352.
- Rodríguez-Rubio, L., Gutiérrez, D., Donovan, D., Martínez, B., Rodríguez, A., García, P. (2015). Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical antimicrobials. *Critical Reviews in Biotechnology*(21), 1-11.

- Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A., Lahtinen, S. (2012). *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and functional aspects* (Vol. Fourth Edition). U.S.A.: CRC Press.
- Sandoval, A., Stuardo, A. (2003). *Compost: una buena alternativa de sustrato*. Universidad de Chile: Centro de Semillas de Árboles Forestales. Facultad de Ciencias Forestales.
- Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. (2002). Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 76, 93-105.
- Savikoj, K., Ingmer, H., Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71, 394-406.
- Settani, L., Valmorri, S., Suzzi, G., Corsetti, A. (2008). The role of environmental factor and medium composition on bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) production by *Enterococcus mundtii* strains. *Food Microbiology*(25), 722-728.
- Shikha, K., P.Kerry, J., Alvarez, C., Walsh, D., Tiwari, B. Effect of high intensity ultrasoun on the fermentation profile of *Lactobacillus sakei* in a meat model system. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 539-545.
- Simpson, K., B. (2012). *Food Biochemistry and Food processing* (Vol. Second Edition). Blackwell Publishing.
- Southgate, D.A.T.; Determination of Food Carbohydrates Second Edition; Elsevier Applied Science, London and New York 1991.
- Talarico, T., Dobrogosz, W. (1989). Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33, 674-679.
- Talon, R., Leroy.Sétrin, S., Fadda, S. (2009). Bacterial starters involved in the quality of fermented meat products. En F. Toldrá, *Reserch advances n the quality of meat and meat products* (págs. 175-191). Burjassot, Spain: Research Signpost.

- Toldrá, F., Verplaetse, A. (1995). Endogenous enzyme activity and quality for raw product processing. En *Composition of Meat in Relation to Processing, Nutritional and Sensory Quality* (págs. 41-55). Utrecht, The Netherlands: ECCEAMST.
- Totosaus, A., Guerrero, I. (2013). Propiedades funcionales y textura. En I. Hui, I. Guerrero, M. Rosmini, *Ciencia y tecnología de carnes*. México: Limusa.
- Turner, M. S. (2007). Antimicrobial activity of lysostaphin and a *Listeria monocytogenes* bacteriophage endolysin produced and secreted by lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 30, 58-67.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., Debevere, J. (2004). Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for biopreservation of cooked meat products. *Int J Food Microbiol*, 96, 149-164.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., Foster, S. (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol*, 32, 259-286.
- Yousef, A., Juneja, V. (2003). *Microbial stress adaptation and food safety*. CRC Press.
- Zheng, J., Ruan, L., Sun, M., Gänzle, M. (2015). A Genomic View of *Lactobacilli* and *Pediococci* Demonstrates that *Phylogeny* Matches Ecology and Physiology. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), 7233-7243.