



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA VIDA DE ANAQUEL DE UNA SALCHICHA TIPO
VIENA CON LA ADICIÓN DE METABOLITOS ANTIMICROBIANOS
PRODUCIDOS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

ELVIA KARINA ROA BELTRÁN



MÉXICO, CD.MX.

2017



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: Olga del Carmen Velázquez Madrazo
VOCAL: Profesor: Eduardo Mendoza Martínez
SECRETARIO: Profesor: Israel García Cano
1er. SUPLENTE: Profesor: Argelia Sánchez Chinchillas
2° SUPLENTE: Profesor: Tania Gómez Sierra

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

Elvia Karina Roa Beltrán

EVALUACIÓN DE LA VIDA DE ANAQUEL DE UNA SALCHICHA TIPO VIENA CON LA ADICIÓN DE METABOLITOS ANTIMICROBIANOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Productos cárnicos.....	2
Vida de anaquel.....	3
Análisis de perfil de textura	3
Color en los alimentos	4
ANTECEDENTES	6
Bacterias ácido lácticas	6
Bacterias lácticas aisladas de exudados de salami	6
Lactobacilos	7
Enterococos	8
Efecto del medio de cultivo en el crecimiento de bacterias y producción de metabolitos	8
Compuestos con efecto antimicrobiano	10
Bacteriocinas	10
Peptidoglucano hidrolasas	11
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	13
OBJETIVOS	13
METODOLOGÍA	14
ETAPA I: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE <i>L. plantarum</i> Y <i>E. faecium</i>	15
Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de <i>L. plantarum</i> y <i>E. faecium</i>	15

Elaboración de medios ajustados al medio comercial CGB y TSB	15
Obtención de sobrenadantes	15
Cuantificación de proteína	16
Determinación de actividad antimicrobiana en placa	16
ETAPA II: VIDA DE ANAQUEL DE SALCHICHAS TIPO VIENA	17
Procedencia y recepción de las muestras.....	17
Análisis microbiológico.....	17
Análisis fisicoquímico	17
pH.....	17
a_w	18
Bases volátiles totales de nitrógeno (BVT-N) y oxidación de lípidos.....	18
Análisis de perfil de textura (TPA).....	18
Análisis colorimétrico.....	19
ETAPA III: IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR ZIMOGRAMA.	19
Aislamiento de microorganismos	19
Extracción de DNA	19
Amplificación del gen de referencia del DNAr 16S.....	20
Actividad antimicrobiana en zimogramas y SDS-PAGE 10%	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
ETAPA I: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE <i>L. plantarum</i> Y <i>E. faecium</i>.....	23
ETAPA II: VIDA DE ANAQUEL DE SALCHICHAS TIPO VIENA	30
Análisis microbiológico.....	30
Análisis fisicoquímico	35
Análisis de perfil de textura.....	40
Análisis de color.....	42
Estimación de la vida de anaquel	42

ETAPA III: IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR ZIMOGRAMA.	46
Microorganismos aislados y amplificación del gen 16S.....	46
Actividad antimicrobiana en zimograma y SDS-PAGE al 10%	48
CONCLUSIONES.....	50
PERSPECTIVAS.....	50
BIBLIOGRAFÍA.....	51

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son utilizadas en la industria cárnica como cultivos iniciadores, debido a que brindan ventajas como: disminuir el tiempo de maduración, proveer características sensoriales y garantizar la inocuidad del producto. Las BAL pueden inhibir el desarrollo de la microbiota contaminante debido a que producen ácido láctico y otros compuestos con actividad antibacteriana, a favor de la seguridad, calidad y la aceptabilidad del producto final.

En este proyecto se determinó la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes provenientes de *L. plantarum* y *E. faecium* que fueron crecidos en cinco diferentes residuos cárnicos (chorizo, jamón tipo York, salchicha de pavo, tocino y queso de puerco) ajustados a la concentración de carbohidratos del medio CGB (10 g/L) y TSB (2.5 g/L). El mejor medio de cultivo fue el elaborado con salchicha de pavo ajustado al medio TSB ya que presentó la mayor actividad antimicrobiana. Se prepararon sobrenadantes de *L. plantarum* y *E. faecium*, los cuales se entregaron a la empacadora Murgati para que se aplicaran superficialmente a salchichas tipo Viena y posteriormente retornarlas al laboratorio para evaluar la vida de anaquel. El estudio se realizó a 10 °C por un periodo de 12 días. Las variables de respuesta fueron: pH, a_w , color, bases volátiles totales, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, color y textura. Microbiológicamente, se determinó la población de mesófilos aerobios, enterobacterias, psicótrofos y BAL. Se utilizó un modelo matemático para estimar la vida de anaquel del producto, la cual se logró alargar hasta 21 días, con respecto al control, cuando se utilizó el sobrenadante proveniente de *L. plantarum*. Posteriormente, se aislaron e identificaron las bacterias predominantes utilizando métodos moleculares, al final de la vida de anaquel predominó el género *Lactobacillus*. Finalmente, se analizó la actividad antimicrobiana de las proteínas por zimografía contra *Micrococcus lysodeikticus*. La actividad lítica perduró a lo largo del tiempo de análisis, ya que se observó una banda de actividad a los 97 kDa durante toda la vida de anaquel. La aplicación de los sobrenadantes en productos cárnicos como las salchichas tipo Viena pueden ser una alternativa al uso de conservadores químicos.

INTRODUCCIÓN

Productos cárnicos

La NOM-213-SSA1-2002 se refiere a los productos cárnicos procesados como aquellos que son elaborados a partir de carne, vísceras, estructuras anatómicas, sangre o sus mezclas, provenientes de mamíferos o aves, que pueden someterse a ahumado, cocción, curación, desecación, maduración, salado, entre otros. Además, también define a los productos cárnicos cocidos los cuales son sometidos a proceso térmico y que pueden presentarse enteros, en cortes, emulsionados o troceados.

En México en el año 2016 se elaboraron 1 millón 47 mil toneladas de productos cárnicos procesados, de los cuales alrededor del 42 % corresponde a salchicha y jamón (Consejo Mexicano de la carne, 2016). La NOM-158-SCFI—2003 define al jamón de cerdo como el producto cárnico curado y/o cocido y/o ahumado y/o madurado elaborado con carne (masas musculares íntegras de las piernas traseras del cerdo) de animales declarados aptos para el consumo humano. El jamón de pavo se describe como el producto alimenticio, elaborado exclusivamente con la carne de los muslos del pavo, declarado apto para el consumo humano por la autoridad responsable, de la especie *Meliagridis gallopavo*, que cumpla con las especificaciones generales que se establecen en dicha norma. Y la NMX-F-065-1984 define a la salchicha tipo Viena como un producto alimenticio embutido de pasta semifirme de color característico, elaborado con la mezcla de carne (60 % mínimo) de res y cerdo y grasas de las especies antes mencionadas y emulsificados, adicionando condimentos, especias y aditivos para alimentos, sometidos a curación y pudiendo ser ahumados o no, sometidos a cocción y enfriamiento, empacados en material adecuado para su distribución y conservación en refrigeración.

El procesamiento de la carne tuvo como propósito original la preservación de esta, inhibiendo o retardando la descomposición microbiana. Después se observó que además de prevenir el deterioro, el procesamiento daba como resultado productos con sabores agradables y nutritivos (Pearson y Tauber, 1984).

Vida de anaquel

La vida de anaquel está definida en la NOM-109-SSA1-1994 como el tiempo durante el cual un alimento es seguro y conserva un nivel de calidad sanitaria aceptable para su consumo, bajo condiciones específicas de procesamiento, envasado y almacenamiento.

Por otra parte, hay otras propiedades por las que los consumidores juzgan la calidad de los alimentos como lo son la apariencia y la textura (Gray *et. al.*, 1996).

Análisis de perfil de textura

Los consumidores buscan que los productos cárnicos sean seguros, nutritivos, ricos en variedad e innovación y que sean atractivos visualmente, además de la textura, olores y sabores agradables. La industria cárnica desarrolla nuevas formulaciones en las que la variedad y cantidad de los ingredientes como los fosfatos, sal y grasa, repercuten directamente en la textura. Para medir los parámetros de textura actualmente se utiliza el análisis de perfil de textura (TPA) que se basa en imitar las condiciones de masticación a las que se someten los alimentos cuando se consumen. Los parámetros obtenidos con TPA han sido utilizados en salchichas de carne para determinar la calidad del producto (Torres *et. al.*, 2015).

Los parámetros que se determinan en el análisis de perfil de textura son establecidos por Szczesniak, 1963 y Bourne, 1978 los cuales son la fracturabilidad, la dureza, la adhesividad, la cohesividad, la elasticidad, la gomosidad y la masticabilidad (Figura 1; Torres *et. al.*, 2015).

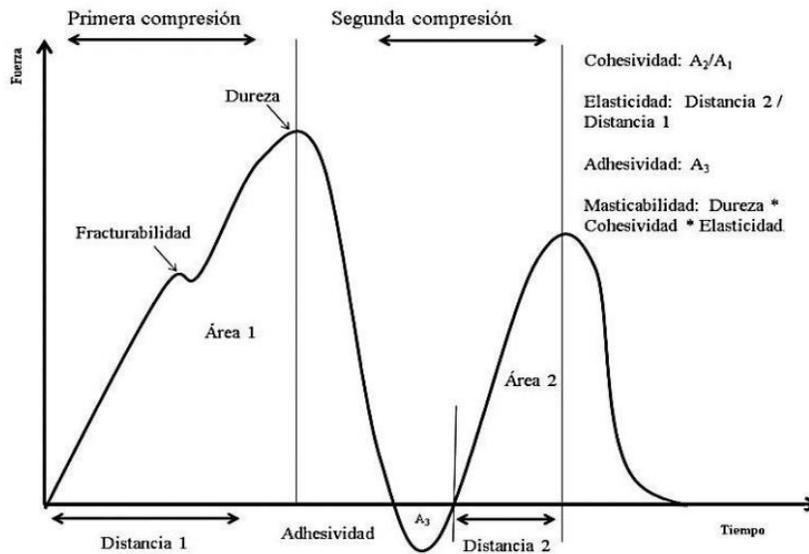


Figura 1 Gráfica general de análisis de perfil de textura (Torres *et. al.*, 2015)

Color en los alimentos

El color es una característica sensorial importante ya que nos da una primera impresión de los alimentos a consumir, como es una característica que no depende del objeto si no de la perspectiva, fue necesario encontrar parámetros para poder medirlo, clasificarlo y reproducirlo. El color de los alimentos se mide principalmente con los parámetros de CIE L^* , a^* , b^* que es un estándar internacional para medirlo, implementado por la Comisión Internacional de Iluminación (CIE) en 1976. El parámetro L^* tiene valores de 0 a 100 (de negro a blanco), a^* y b^* van de -120 a +120. a^* va de verde (-) a rojo (+) y b^* de azul (-) a amarillo (+) (Figura 2; Girolami *et. al.*, 2013).

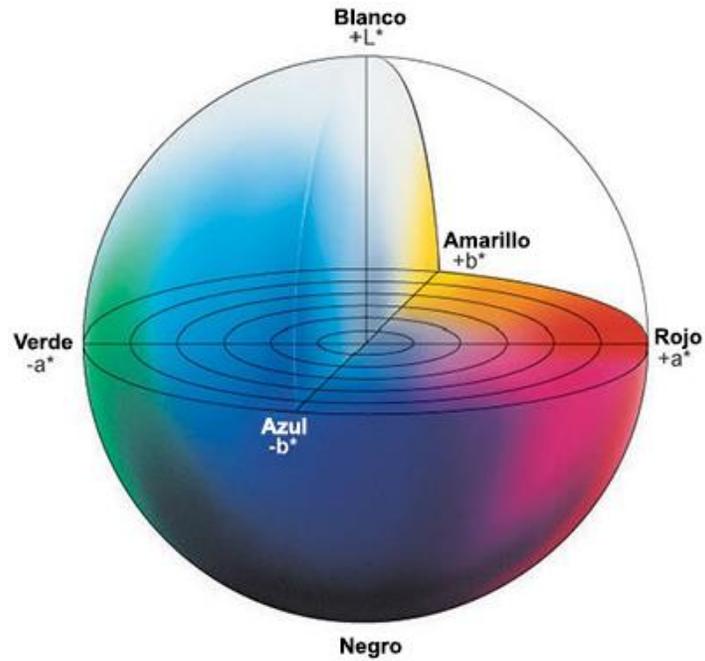


Figura 2 Parámetros L^* , a^* y b^* (Konica Minolta Sensing Americas, 2014).

Los productos cárnicos son susceptibles a la descomposición microbiana porque poseen una matriz rica en nutrimentos como proteínas, carbohidratos y lípidos, es por ello que se favorece el crecimiento de microorganismos como las bacterias lácticas y algunas patógenas que modifican las características sensoriales del producto y que podrían causar problemas de salud en los consumidores (Ospina y Cartagena, 2008). Es por esto que la industria cárnica utiliza conservadores que pueden ayudar a alargar la vida de anaquel de los productos.

ANTECEDENTES

Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son bacilos y cocos Gram-positivos, no esporuladas, catalasa negativas, tolerantes a pH que producen ácido láctico como único o principal producto de la fermentación. Todas las bacterias ácido lácticas crecen anaeróticamente, sin embargo no son sensibles al oxígeno por lo tanto se denominan anaerobios aerotolerantes. Se dividen en dos grupos, homofermentativos porque producen ácido láctico como único producto de la fermentación y heterofermentativos porque producen otros compuestos como el etanol y CO₂, así como también el lactato (Madigan *et. al.*, 2009, Salminen *et. al.*, 2004). Los géneros que se encuentran dentro de las BAL son *Aerococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Weissella* (Leroy *et. al.*, 2006).

La actividad metabólica de las BAL da como resultado un deterioro que genera sabores y olores desagradables, producción de exudados y abombamiento del empaque. Las especies de BAL encontrados en jamón y salchicha son *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc carnosum*, *Weissella viridescens*, entre otros (Samelis *et. al.*, 2000).

Bacterias lácticas aisladas de exudados de salami

Previamente en el equipo de trabajo del laboratorio S-132 de la UAM-Iztapalapa, Salas (Tesis de licenciatura en proceso, 2017) aisló dos cepas, las cuales presentaron un halo de inhibición contra la microbiota acompañante (Figura 3). Estas cepas fueron identificadas molecularmente como *Lactobacillus plantarum* (No. 4) y *Enterococcus faecium* (No. 5).

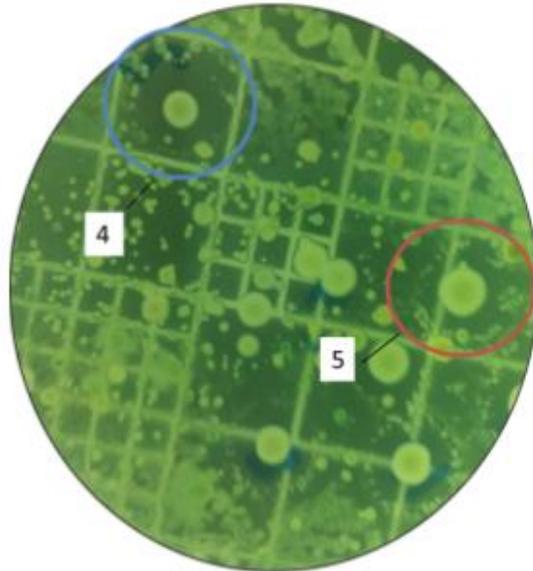


Figura 3 Colonias que presentaron actividad contra el consorcio de bacterias presentes en salami. (4) *Lactobacillus plantarum*; (5) *Enterococcus faecium*.

Lactobacilos

Los lactobacilos son bacterias lácticas que presentan normalmente morfología bacilar que varía desde bacilos largos hasta cortos y curvados. La mayoría de las especies son homofermentativas. Se encuentran habitualmente en los productos derivados de la leche y algunas cepas se utilizan como cultivos iniciadores en alimentos fermentados. Son normalmente más resistentes a condiciones ácidas que otras bacterias lácticas, ya que son capaces de crecer eficientemente a valores de pH de 4 (Madigan *et. al.*, 2009). Los lactobacilos han sido aislados de distintos nichos ecológicos, algunos de ellos como *Lactobacillus delbrueckii* o *Lactobacillus rhamnosus* no se encuentran tan fácilmente, sin embargo *L. plantarum* se encuentra en productos lácteos, verduras, ensilados, vino, en el tracto gastrointestinal y vaginal, además se utiliza como cultivo iniciador en la fermentación de productos lácteos y de productos cárnicos, actúa también como probiótico y presenta propiedades antibacterianas que son interesantes para la seguridad alimentaria. Se sabe que *L. plantarum* produce compuestos antimicrobianos tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas conocidas como plantaricinas que actúan contra microorganismos

patógenos como lo son *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Listeria innocua* (Seddik *et. al.*, 2017).

Enterococos

Los Enterococos pertenecen al grupo de BAL, son cocos Gram-positivos, no esporulados, generalmente no móviles, catalasa, reductasa y oxidasa negativos. Juegan un papel importante en la microbiota del tracto gastrointestinal de seres humanos y animales. Pueden desempeñar papeles benéficos en algunos alimentos ya que contribuyen en la maduración, desarrollando aromas y sabores característicos en algunos quesos o salchichas fermentadas (Pieniz *et. al.*, 2015). Dentro del género *Enterococcus* se han encontrado más de 20 especies. Las principales y frecuentemente reportadas son *E. faecium*, *E. faecalis* y *E. durans* (Giraffa, 2003).

Estudios anteriores demuestran los beneficios de *Enterococcus faecium*, ya que son utilizados como cultivos iniciadores en alimentos fermentados, además de la capacidad de inhibir el crecimiento de algunos microorganismos patógenos presentes en dichos productos, como: *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, esto a consecuencia de la producción de PGH's y bacteriocinas (Barbosa *et. al.*, 2014, García-Cano *et. al.*, 2014, Alvarez-Sieiro *et. al.*, 2016). A pesar de que el género *Enterococcus* es responsable de efectos benéficos en los alimentos, no son considerados como GRAS debido a que son utilizados como indicadores de contaminación fecal y la frecuente asociación con enfermedades transmitidas por alimentos (Franz *et. al.*, 2007).

Efecto del medio de cultivo en el crecimiento de bacterias y producción de metabolitos

El crecimiento celular y la producción de metabolitos están influenciados por la composición del medio de cultivo en el que se desarrollan. La fuente de carbono y nitrógeno, los factores de crecimiento y las sales orgánicas son algunos de los factores que intervienen. Así, la célula debe ser capaz de obtener una fuente de energía para llevar a cabo el metabolismo y sintetizar los componentes celulares, esta capacidad depende de los sistemas enzimáticos que el organismo sea capaz de producir de acuerdo a su código genético (Contreras-Cruz, 2013).

En la tabla 1 se muestra la composición de los medios CGB y TSB, la cual muestra que el primero tiene más nutrientes comparado con el segundo. Contreras-Cruz (2013) hace referencia a estudios en los que se demostró que se veía incrementada la expresión de seis unidades transcripcionales cuando las células se encontraban en un medio con fuente de nitrógeno limitada y que eran reprimidas cuando se adicionaba hidrolizados de caseína que contenían 80% de péptidos y 20% de aminoácidos libres. Con esto y otros estudios realizados se ha demostrado el efecto de inhibición por fuentes de nitrógeno en la producción de metabolitos proteicos con actividad lítica. Como conclusión de su trabajo determinó que cuando hizo crecer una BAL en medio TSB se presentó mayor producción de enzimas proteolíticas, sugiriendo que las fuentes de carbono y nitrógeno pueden ejercer un efecto de regulación en la producción de proteasas cuando se encuentra en mayores cantidades como es el caso del medio CGB y que la producción de dichas enzimas se favorece cuando los nutrientes son limitados como es el caso del medio TSB.

Tabla 1 Composición de los medios CGB y TSB

CGB		TSB (Dibico, México)	
Nutriente	g/L	Nutriente	g/L
Peptona de biotriptasa (BD Bioxon, México)	20.0	Peptona de caseína	17.0
Glucosa (J.T. Baker, E.U.A.)	10.0	Cloruro de sodio	5.0
Extracto de levadura (Dibico, México)	5.0	Peptona de soya	3.0
Citrato de amonio (J.T. Baker, E.U.A.)	2.0	Glucosa	2.5
Fosfato disódico (J.T. Baker, E.U.A.)	2.0	Fosfato dipotásico	2.5
Sulfato de magnesio (J.T. Baker, E.U.A.)	0.1		
Sulfato de manganeso (J.T. Baker, E.U.A.)	0.05		
Tween 80 (Hycel, México)	1.0 mL		

Compuestos con efecto antimicrobiano

Las BAL presentan un efecto conservador debido a la producción de metabolitos como los ácidos orgánicos (láctico, acético, fórmico, propiónico y butírico) que reducen el pH del medio y otros compuestos como el etanol, ácidos grasos, acetoína, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, compuestos antifúngicos como el propionato, proteasas (Villaruel *et. al.*, 2004), peptidoglucano hidrolasas (PGH's; Lortal y Chapot-Chartier, 2005) y bacteriocinas como la nisina, reuterina, pediocina, entre otras (Salminen, 2004; Reis *et. al.*, 2012).

El uso de BAL, sus bacteriocinas o PGH's para controlar a los microorganismos transmitidos por alimentos y el deterioro ha generado interés en los últimos años. Su uso como bioconservadores puede reducir el uso de agentes químicos y tratamientos térmicos intensos, resultando en alimentos mínimamente procesados y conservados naturalmente (Seddik *et. al.*, 2017).

Bacteriocinas

Las BAL pueden producir bacteriocinas que son compuestos proteicos que poseen actividad antimicrobiana contra ciertos microorganismos y que pueden ser modificados o no después de la traducción. El mecanismo de acción de las bacteriocinas es generalmente la formación de poros en la membrana lipídica provocando la entrada y salida de compuestos extracelulares e intercelulares respectivamente, además de que se desestabiliza el potencial de membrana dejando así de producir energía y provocando la muerte celular. (Alvarez-Sieiro *et. al.*, 2016).

La producción de bacteriocinas puede considerarse una ventaja para la industria de los alimentos, ya que en cantidades suficientes estos péptidos pueden matar o inhibir a bacterias patógenas o de descomposición que compiten por los nutrientes del medio. Se creía que las bacteriocinas no actuaban contra bacterias Gram-negativas, ya que la membrana externa actúa como barrera de permeabilidad para la célula, sin embargo hay reportes de actividad de bacteriocina contra este grupo de bacterias. Algunos ejemplos son la plantaricina 35d, producida por *L. plantarum* y que actúa contra *Aeromonas hydrophila*, además de las bacteriocinas ST28MS y

ST26MS de *L. plantarum* aislado de melaza y que presentaron actividad contra *Escherichia coli* y *Acinetobacter baumannii* y contra algunas bacterias Gram-positivas (Parada *et. al.*, 2007). *Enterococcus faecium* también produce bacteriocinas llamadas enterocinas como la MT 104 y MT 162 las cuales redujeron significativamente el crecimiento de *L. monocytogenes* en salchichas de carne (Woraprayote *et. al.*, 2016)

Peptidoglucano hidrolasas

Las peptidoglucano hidrolasas son enzimas producidas por algunas bacterias y que pueden utilizarse para controlar el crecimiento de patógenos Gram-positivos y Gram-negativos que se encuentran en los alimentos. Las peptidoglucano hidrolasas se clasifican dependiendo de los enlaces que hidroliza en el peptidoglucano, N-acetilmuramidasa que rompen el enlace β -1,4 dejando un extremo ácido N-acetilmurámico reductor libre, N-acetilglucosaminidasas que igualmente hidrolizan el enlace β -1,4 de la cadena de glicanos dejando a la N-acetilglucosamina como reductor, las N-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa que hidrolizan el enlace amida entre el N-acetilmurámico y la L-alanina del péptido. Las carboxipeptidasas que son capaces de hidrolizar el último aminoácido del extremo carboxilo de los péptidos y las endopeptidasas que rompen completamente los puentes formados por los péptidos (García Cano, 2013).

En la industria de los alimentos se ha utilizado la lisozima la cual presenta actividad de N-acetilmuramidasa y que constituye un mecanismo natural de animales y humanos contra patógenos. La lisozima se ha utilizado en carnes y embutidos y en vinos para inhibir el crecimiento de bacterias indeseables. Otro ejemplo de PGH's es la lisostafina producida por *Staphylococcus simulans* y que actúa contra la pared celular de *S. aureus* (García-Cano, 2013).

Hernández González (2016) utilizó residuos cárnicos para el crecimiento de BAL, donde evaluó el efecto de la composición del medio para la producción de metabolitos de interés con actividad lítica, con potencial uso como bioconservador en alimentos. Primeramente, realizó el análisis químico proximal (AQP) a cinco residuos cárnicos (salchicha, jamón tipo York, tocino, queso de puerco y chorizo) y tomando en cuenta la concentración de carbohidratos de cada residuo, elaboró medios ajustados a la composición de medio CGB, en los cuales inoculó tres cepas de BAL por separado, para evaluar el crecimiento y la producción de metabolitos con actividad lítica utilizando las técnicas de difusión en agar y zimogramas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el crecimiento de las cepas aisladas del salami, en cinco residuos cárnicos ajustando la composición a medios comerciales (CGB y TSB), con el propósito de determinar si la composición influye en la producción de metabolitos con actividad lítica. También evaluar la actividad antimicrobiana de *L. plantarum* y *E. faecium* por difusión en agar contra bacterias patógenas, bacterias lácticas y contra el consorcio de los exudados de salami y salchicha. Posteriormente, evaluar la vida de anaquel de salchichas tipo Viena a las cuales se les aplicó el sobrenadante del medio de residuo cárnico que presentó actividad antimicrobiana.

Existen diferentes estrategias para determinar la vida útil de los alimentos, si el objetivo es identificar a los microorganismos patógenos y a los causantes de la descomposición que crecerán en el caso de un abuso de temperatura, es necesario realizar un estudio de desafío en el cual se aumenta la temperatura de almacenamiento para acelerar el crecimiento bacteriano y algunas reacciones de deterioro como la oxidación de lípidos. Para realizar este trabajo se almacenaron las muestras de salchicha tipo Viena a 10 °C (Erickson y Hung, 1997).

JUSTIFICACIÓN

Alargar la vida de anaquel de los productos cárnicos es algo que trae muchos beneficios a la industria de los alimentos, ya que puede reducir costos y el desperdicio de los productos. Las bacterias ácido lácticas producen metabolitos con actividad antimicrobiana los cuales pueden sustituir a los conservadores químicos. Se ha encontrado que dichas bacterias pueden crecer y generar los metabolitos cuando crecen en medios de residuos cárnicos. Es por eso que en este trabajo se hicieron crecer dos cepas *L. plantarum* y *E. faecium* en medio de residuo de salchicha de pavo y el sobrenadante se aplicó a salchichas tipo Viena para observar el comportamiento de las muestras y discutir si es viable el uso de estos como una alternativa de conservador.

HIPÓTESIS

Las cepas de *L. plantarum* y *E. faecium* crecerán en los medio de residuos cárnicos ajustado a la cantidad de carbohidratos del medio TSB para aplicar el sobrenadante con metabolitos antimicrobianos producidos por dichos microorganismos a salchichas tipo Viena y alargar la vida de anaquel.

OBJETIVOS

- Evaluar la actividad antimicrobiana de las cepas de *L. plantarum* y *E. faecium* cuando crecen en medios de residuos cárnicos ajustados a la concentración de carbohidratos de los medios comerciales CGB y TSB.
- Estimar la vida de anaquel de las salchichas tipo Viena a las cuales se les aplicaron los sobrenadantes
- Identificar los microorganismos presentes en las salchichas tipo Viena al principio y al final de la vida de anaquel
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes y del sobrenadante aplicado en las salchichas al día 1, día 6 y día 12 de la vida de anaquel en zimograma contra *Micrococcus lysodeikticus*.

EVALUACIÓN DE LA VIDA DE ANAQUEL DE UNA SALCHICHA TIPO VIENA CON LA ADICIÓN DE METABOLITOS ANTIMICROBIANOS PRODUCIDOS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.

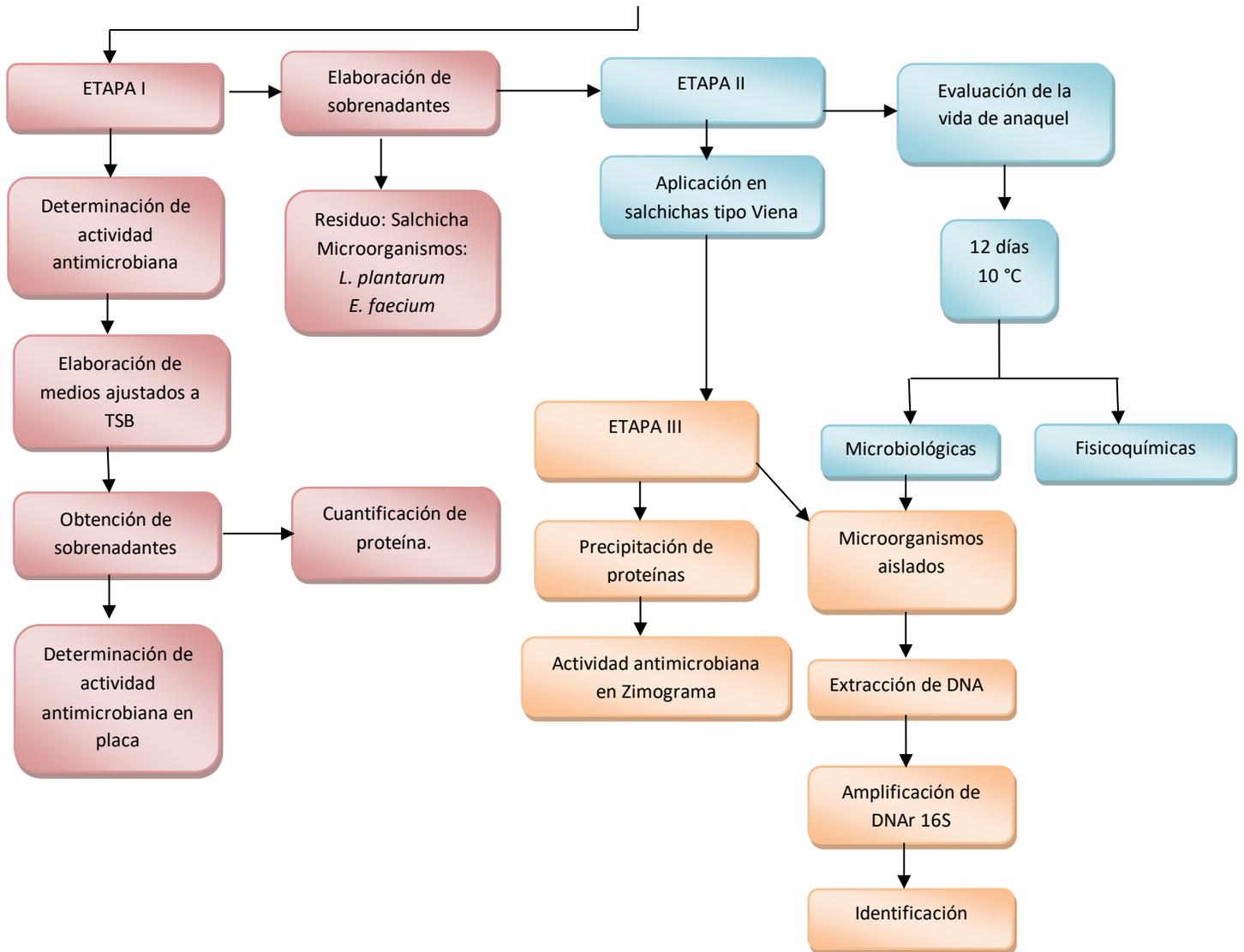


Figura 4 Diagrama general de trabajo

ETAPA I: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *L. plantarum* Y *E. faecium*

Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de *L. plantarum* y *E. faecium*.

Hernández González (2016) determinó que algunas bacterias lácticas podían crecer y producir metabolitos antimicrobianos en medios elaborados a partir de residuos de productos cárnicos ajustados a la cantidad de carbohidratos que contiene el medio comercial CGB (caldo caseína glucosa). En este trabajo, se hizo crecer a *L. plantarum* y *E. faecium* en dichos medios y después se decidió evaluar la actividad antimicrobiana de estas cepas cuando crecían en medios TSB (caldo soya tripticaseína). En la tabla 1 se observa que el medio CGB contiene más nutrientes y el contenido de glucosa es mayor con respecto al medio TSB, como se mencionó anteriormente. El tener mayor cantidad de fuente de carbono o de nitrógeno no asegura que se producirá mayor cantidad de metabolitos de interés.

Elaboración de medios ajustados al medio comercial CGB y TSB

De acuerdo al análisis químico proximal de los residuos de productos cárnicos (Hernández, 2016), se elaboraron 50 mL de medio, tomando la masa correspondiente de cada residuo, el cual se homogeneizó con agua destilada (Ultraturrax S18, Staufen, Alemania). Se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 lb, 15 min (Yamato SM-300, Santa Clara, CA, E.U.A.). Cada cepa utilizada se reactivó colocando 50 µL del microorganismo conservado a -80 °C en 5 mL de medio CGB estéril e incubando por 12 h a 37 °C (Prendo, SEV, Puebla, México), posteriormente se inocularon los matraces con el medio de residuo cárnico al 0.01 % de cultivo y se incubó por 8 y 24 h a 37 °C.

Obtención de sobrenadantes

Se tomaron 10 mL de cada medio de residuo cárnico los cuales se centrifugaron a 4,000 rpm por 15 min a 4 °C (Eppendorf 5810 R, Hamburgo, Alemania). Después se neutralizó a pH 7.0 (Orion Versa Star, E.U.A.) con una solución de NaOH 1 M y por último se filtró con membrana de 0.22 µm (Millipore, Darmstad, Alemania).

Cuantificación de proteína

La concentración de proteína se determinó por el método Bradford (1976), se tomaron 10 μ L del sobrenadante, se agregaron 150 μ L de agua destilada y 40 μ L de reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, California, E.U.A.), se homogenizó y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm contra un blanco en un lector de placas (Epoch, Biotek, Vermont, E.U.A.). La curva patrón se realizó utilizando albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, E.U.A.) (Bradford, 1976).

Determinación de actividad antimicrobiana en placa

Para esta determinación se realizaron pruebas de difusión en agar para cada sobrenadante. Se utilizaron microorganismos blanco como bacterias patógenas (*S. typhimurium* ATCC 2753, *S. aureus* ATCC 6538 y *L. innocua* CFQ-B-232) y bacterias lácticas (*L. mesenteroides*, *L. sakei* UAM-MGJP1 y *W. viridescens* UAM-MGS). También se realizó la difusión en agar utilizando exudados de salchicha y salami rebanado almacenados a -80 °C (Palafox, 2015).

Se realizaron cajas Petri con doble capa de agar, la capa inferior se elaboró con medio BHI (Infusión Cerebro Corazón, Difco, E.U.A.) para bacterias patógenas y con medio CGB para bacterias lácticas, ambas a 1.5 % de agar. La capa superior se elaboró con los mismos medios pero al 0.8 % de agar y con el 0.01 % del microorganismo blanco. En la capa superior se realizaron pozos en donde se depositaron 150 μ L de cada sobrenadante. Posteriormente, se incubaron las cajas a 37 °C por 12 h. Pasado el tiempo los halos mayores a 1 mm se midieron con ayuda de un vernier y se determinó la actividad antimicrobiana haciendo una relación de los mm de inhibición entre los mg de proteína.

ETAPA II: VIDA DE ANAQUEL DE SALCHICHAS TIPO VIENA

Procedencia y recepción de las muestras

Los sobrenadantes se enviaron a la empacadora Murgati S.A. de C.V., los cuales se aplicaron por aspersión a las salchichas tipo Viena y empacadas al vacío inmediatamente.

La empacadora envió al laboratorio S-132 de la UAM Iztapalapa, paquetes de salchicha tipo Viena de aproximadamente 400 g, divididas en un control y dos tratamientos (solución 1 de *L. plantarum* y solución 2 de *E. faecium*). Dichas muestras llegaron en hieleras a 4 °C, se almacenaron a 10 °C con la intención de acelerar el crecimiento microbiano y las reacciones de deterioro como la oxidación de lípidos. A continuación se describirán las determinaciones realizadas.

Análisis microbiológico

Se tomaron 25 g de muestra y se homogeneizaron con 225 mL de solución salina estéril al 0.85 % en un Stomacher® 400 Circulator (E.U.A) por 30 seg. Se realizaron diluciones seriadas y se inocularon 100 µL en cajas Petri con agar cuenta estándar (BD Bioxon, México) para la determinación de bacterias mesófilas y psicotróficas; agar eosina y azul de metileno (BD Bioxon, México) para enterobacterias; y agar MRS (De Man, Rogosa y Sharpe; BD DIFCO, E.U.A.) con 0.0025 % (m/v) de verde de bromocresol (MRS-VB) para bacterias ácido lácticas. Las cajas de agar para determinar mesófilos, enterobacterias y bacterias ácido lácticas se incubaron a 37 °C por 24-48 h. Las BAL se colocaron en una cámara de anaerobiosis. Las bacterias psicotróficas se incubaron por 7 días a 4 °C. Se determinaron las UFC/g de muestra.

Análisis fisicoquímico

pH

Se tomaron 5 g de muestra y se homogenizaron con 45 mL de agua destilada, se filtraron con tela manta de cielo y se procedió a tomar la lectura con un potenciómetro (Orion Versa Star, E.U.A.).

a_w

Se colocaron 5 g de pasta de salchicha en el porta muestras del equipo AquaLab 4TE (Decagon Devices, Inc. E.U.A) y posteriormente se realizó la lectura de la actividad de agua.

Bases volátiles totales de nitrógeno (BVT-N) y oxidación de lípidos

Bases Volátiles Totales de Nitrógeno (BVT-N). Esta determinación se realiza para cuantificar el nitrógeno de las bases volátiles como lo son la trimetilamina, dimetilamina y el amoníaco, que se genera de la descomposición química y microbiológica de los alimentos (FAO, 1998).

Extracto. Se tomaron 10 g de muestra que se homogeneizaron con 30 mL de ácido tricloroacético (J.T. Baker, E.U.A) al 5 %, se centrifugó a 4,000 rpm por 5 min (Eppendorf 5810 R, Hamburgo, Alemania). Se tomaron 10 mL de extracto, se destilaron con NaOH al 20 % (Büchi Distillation Unit K-350, Suiza) y el producto de la destilación se recibió en 50 mL de ácido bórico (Laboratorios LAITZ, S.A., México) al 3 %, posteriormente se tituló con HCl 0.01 N. Se calcularon los mg de N/g de muestra.

Oxidación de lípidos. Se determinó la oxidación por el método de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). El ácido tiobarbitúrico (J.T. Baker, UK) reacciona con productos de oxidación secundaria de los lípidos. Se realizó previamente una curva patrón utilizando malonaldehído como el compuesto que reacciona con el TBA para producir un compuesto colorido y se midió la absorbancia a 530 nm (Iturbe y Sandoval, 2013). Se colocaron 500 μ L del extracto más 500 μ L de TBA (90 mM, en ácido acético al 90%), se metió en un baño de agua a ebullición por 30 min. Por último, se leyó en un lector de placas a 530 nm y se calcularon los mg de MDA/kg de muestra.

Análisis de perfil de textura (TPA)

Para poder realizar el TPA (Texturómetro TAXT Plus, Stable Micro Systems, UK), las muestras de salchicha se cortaron de 2 cm de alto. Se realizó una prueba de doble ciclo de compresión hasta un 50 % de compresión de la altura de la porción original con una sonda circular de compresión de 75 mm de diámetro. Se dejó

transcurrir un tiempo de 5 seg entre los dos ciclos de compresión. Se obtuvieron curvas de deformación de fuerza-tiempo con una celda de carga de 25 kg aplicada a una velocidad de cruce de 5 mm/s. Se midieron los parámetros de la elasticidad y la fuerza de corte, para el segundo parámetro se utilizaron muestras de salchicha de la misma altura, se fijó un punto un agarre de tracción a la base del texturómetro, la separación de agarre fue de 17.0 mm y la velocidad de la navaja fue de 1.0 mm/s hasta la ruptura (Herrero *et. al.*, 2008).

Análisis colorimétrico

El color de las muestras se midió utilizando un colorímetro (ColorFlex EZ spectrophotometer 45°/0°, HunterLab, E.U.A) obteniendo los parámetros L, a* y b* que indican la luminosidad, si la muestra se encuentra en la gama del rojo o verde y si la muestra se encuentra en la gama de los amarillos o los azules respectivamente (Hu *et. al.*, 2008).

ETAPA III: IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR ZIMOGRAMA.

Aislamiento de microorganismos

Las colonias crecidas en las cajas Petri con agar MRS-VB fueron caracterizadas morfológicamente, posteriormente se picaron con palillos estériles para inocularlos en tubos con 5 mL de caldo MRS e incubarlas a 37 °C. Se realizaron siembras por agotamiento en cajas con agar MRS-VB para verificar que se tratara de un solo microorganismo, junto con una tinción de Gram.

Extracción de DNA

Del cultivo líquido fresco se tomaron 1.5 mL y se colocaron en un microtubo de 1.5 mL, se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet con sacarosa 10.3 %, se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y al pellet se le adicionó 1 mL de amortiguador SET (Tris 50 mM pH 8.0, EDTA 50 mM y sacarosa 20 %) más 100 µL de lisozima (10 mg/mL) y 10 µL de RNAasa (10 mg/mL), se mezcló perfectamente y se incubó a 37 °C por 60 min con agitación de 50 rpm, se centrifugó a 6,000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante para resuspender el pellet en 200 µL de

sacarosa 10.3 %, 5 μ L de EDTA 0.5 M y 80 μ L de SDS 10 %, se mezcló, y se adicionaron 300 μ L de NaCl 5 M y se agitó vigorosamente, se incubó a 4 °C por 30 min, se recuperó el sobrenadante en microtubos de 1.5 mL estériles, se adicionaron 800 μ L de isopropanol y se agitó, se dejó en incubación a temperatura ambiente toda la noche. Se procedió a centrifugar a 14,000 rpm por 15 min, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet dos veces con 800 μ L de etanol al 70 %, se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante y se dejó evaporar el solvente, finalmente el pellet se resuspendió en 50 μ L de Tris 50 mM. Se cuantificó la concentración del DNA en un lector de placas Take3 midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en el lector de placas (Biotek). La calidad e integridad del DNA se evaluó con un gel de agarosa al 0.8 % teñido con bromuro de etidio (Bio Rad, 0.001%).

Amplificación del gen de referencia del DNAr 16S

Se realizaron reacciones de PCR para amplificar la región 16S del DNAr, agregando en un microtubo 14.57 μ L de agua grado biología molecular, 0.4 μ L de dNTP's (10 mM c/u), 0.4 μ L de cebador dirección directa (fD1 10 μ M), 0.4 μ L de cebador dirección reversa (rD1 10 μ M), 2.0 μ L de amortiguador para la enzima *Pfu*, 0.23 μ L de enzima *Pfu* (Thermo Scientific, E.U.A.) y 100 ng de DNA bacteriano (García-Cano *et. al.*, 2014).

Se colocaron en el termociclador (Eppendorf, Mastercycler) para llevar a cabo un ciclo a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C por 2 min, 42 °C por 30 s, 72 °C por 4 min y finalmente un ciclo a 72 °C por 10 min, una vez terminada la reacción se realizó una electroforesis en un gel de agarosa (0.8 %) para corroborar que se realizó la amplificación (amplicones esperados de aproximadamente 1,500 pb). Se cortaron las bandas y se purificaron con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean UP-System (E.U.A.). El DNA obtenido se cuantificó en la placa Take3 en el lector de placas. Se mandó a secuenciar a los laboratorios de Macrogen Inc, en Seúl, Corea del Sur. Con las secuencias proporcionadas y utilizando la base de datos Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) se logró obtener el género y la especie de cada cepa.

Actividad antimicrobiana en zimogramas y SDS-PAGE 10%

Preparación de las muestras. Se tomaron 5 g de muestra (día 1, 6 y 12 de evaluación de vida de anaquel) y se homogeneizaron en un mortero con 5 mL de Tris-HCl pH=8.0 50 mM (amortiguador de trabajo). Después se centrifugó en tubos de 2 mL a 14,000 rpm por 10 min. Se reservaron 500 µL del sobrenadante, y al resto se le adicionó TCA al 100 %, se incubó a 4 °C por 1 h, se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min. El precipitado se lavó tres veces con acetona al 90% y por último se resuspendió en 50 µL de amortiguador de trabajo.

Para determinar el perfil electroforético se elaboró un gel con los siguientes reactivos, Bis-acrilamida 30 %, Tris-HCl 1.5 M pH 8, dodecil sulfato de sodio (SDS) 10 %, H₂O, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y persulfato de amonio (APS) 10%. Para determinar la actividad lítica por zimograma se elaboró un gel al 10 % con células liofilizadas de *M. lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, E.U.A.).

El zimograma y el SDS-PAGE se cargaron con 35 µL de los sobrenadantes que contenían las proteínas resuspendidas más 15 µL de amortiguador de carga (agua destilada, 2.5 % glicerol, Tris-HCl 50 mM pH 8.0, azul de bromofenol 0.005%). Se corrieron los geles en una cámara de electroforesis de proteínas (Mini-Protean 3Cell, Bio-Rad, California, E.U.A.).

Después de la electroforesis los SDS-PAGE se lavaron con agua destilada, y se tiñeron con azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad) (0.1 % Coomassie G-250, 45 % metanol, 10 % ácido acético glacial, 45 % agua) durante 12 h en agitación, pasado el tiempo se retiró el colorante y se lavó con una solución desteñidora que contenía 10 % de metanol, 10 % de ácido acético glacial y 80 % de agua destilada. Se utilizó un marcador de alto peso molecular (Bio-Rad, E.U.A.) para comparar las bandas de proteína de las muestras. El gel se escaneó utilizando el equipo Gel-Doc RT con el software Image Lab (Bio-Rad).

Después de la electroforesis el zimograma se lavó varias veces con agua destilada, se agregó solución renaturalizante (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, Tritón X-100 1 %) y se incubó a 37 °C por 12 h. Pasado el tiempo el gel se tiñó con una solución de azul de metileno (0.01 % KOH y 0.1 % azul de metileno) por 30 min y se lavó varias veces con agua destilada. La actividad antimicrobiana se observó

con bandas traslúcidas en el gel azul y se comparó el peso molecular de las proteínas con un marcador de alto peso molecular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ETAPA I: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *L. plantarum* Y *E. faecium*

En la figura 5 se observan los halos de inhibición que presentaron los sobrenadantes de *L. plantarum* cuando crecieron en medios de residuos cárnicos ajustados a medio CGB en un tiempo de 8 h.

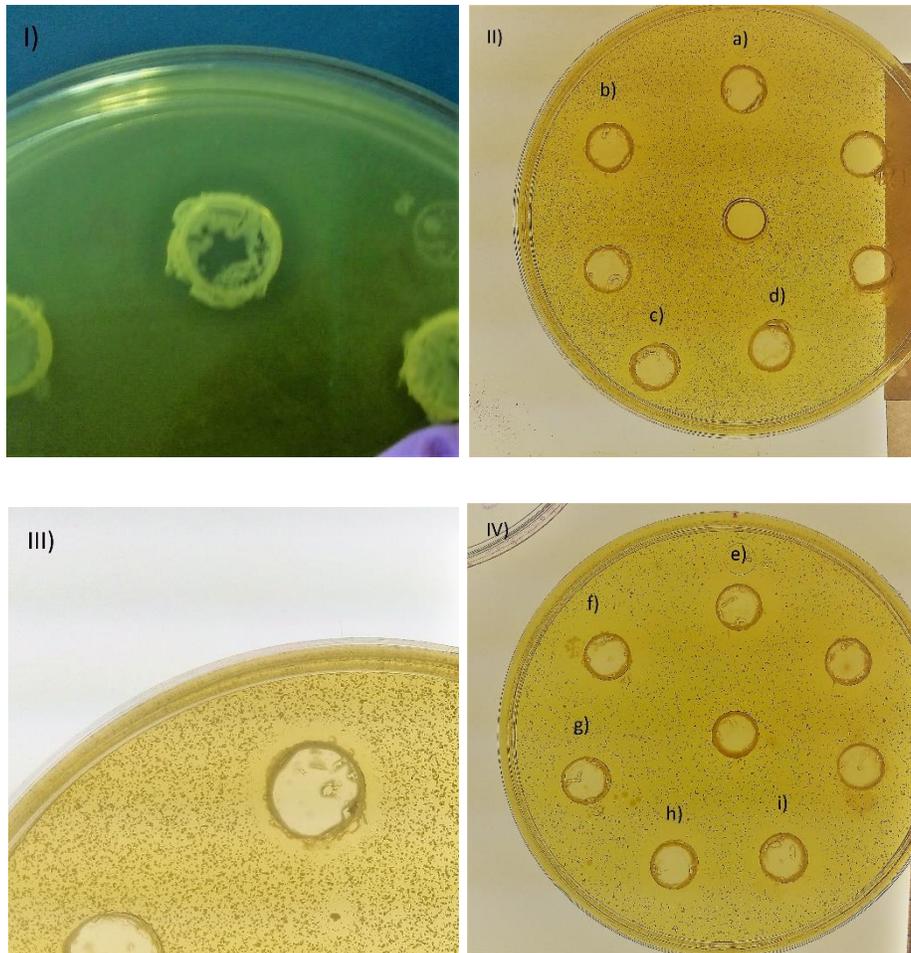


Figura 5 I. Sobrenadante de queso de puerco contra *L. innocua*. II.- a) sobrenadante de chorizo; b) sobrenadante de queso de puerco; c) sobrenadante de salchicha; d) sobrenadante de jamón tipo York contra exudado de salchicha. III.- Sobrenadante de queso de puerco contra *L. sakei*. IV.- e) sobrenadante de chorizo; f) sobrenadante de queso de puerco; g) sobrenadante de tocino; h) sobrenadante de salchicha; i) sobrenadante de jamón tipo York contra exudado de salami.

En la figura 6 se muestra la actividad antimicrobiana específica (mm de inhibición/mg proteína total) de estos mismos sobrenadantes, el medio de queso de puerco fue el que presentó mayor actividad y que inhibió a 4 de los 8 microorganismos blanco.

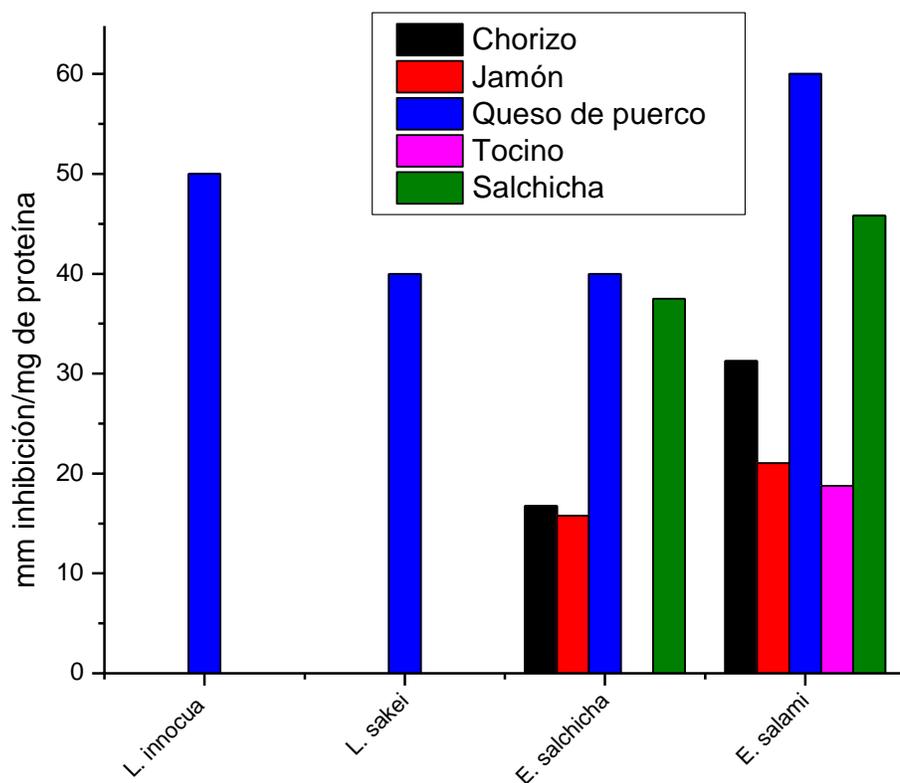


Figura 6 Actividad antimicrobiana específica contra los microorganismos blanco de sobrenadantes de *L. plantarum* a las 8 h de crecimiento.

En la figura 7 se observan los halos de inhibición que presentaron los sobrenadantes de residuos cárnicos cuando se hizo crecer *E. faecium* en ellos, actuando contra el exudado de salchicha y salami. En la figura 8 se muestra la

actividad antibacteriana específica de dicho microorganismo, comparando esta con la actividad de *L. plantarum* fue menor y solo pudo inhibir a la microbiota de los exudados.

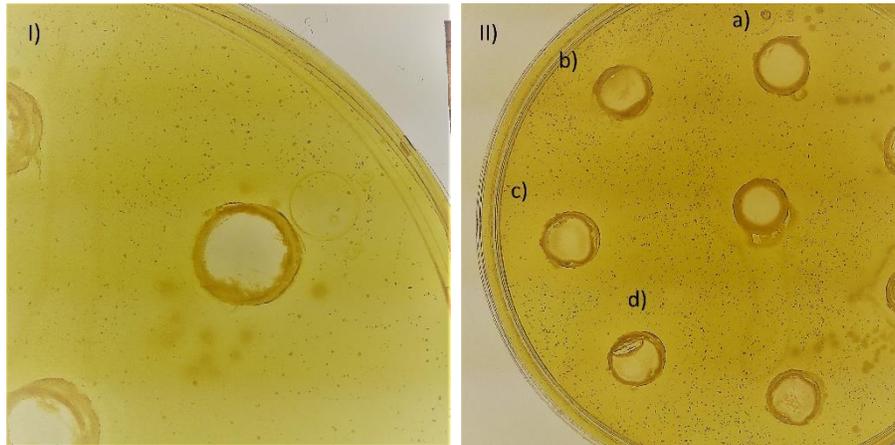


Figura 7 I.- Sobrenadante de chorizo contra exudado de salchicha II.- Sobrenadantes contra exudado de salami, a) de chorizo; b) de queso de puerco; c) de tocino; d) de salchicha.

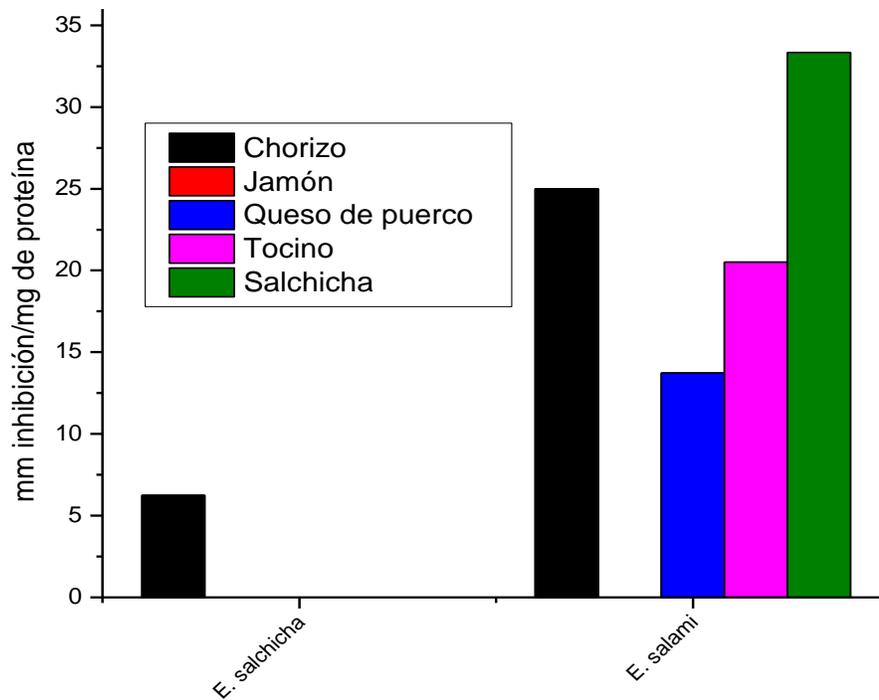


Figura 8 Actividad antimicrobiana específica contra los microorganismos blanco de sobrenadantes de *E. faecium*

En la figura 9 se muestran los halos de inhibición de los sobrenadantes de *L. plantarum* cuando creció en los medios de residuos cárnicos ajustados a la composición de TSB.

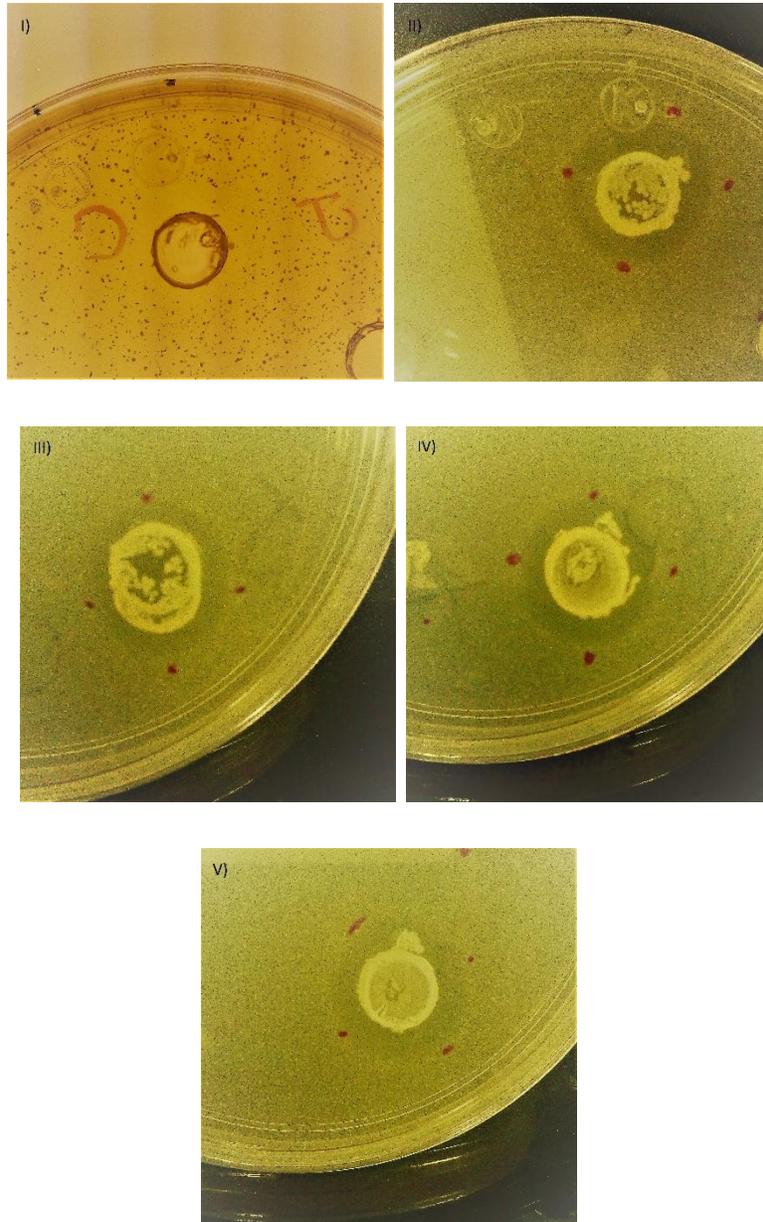


Figura 9 I.- Sobrenadante de chorizo contra exudado de salami. II.-Sobrenadante de chorizo contra *S. aureus* III.- Sobrenadante de jamón tipo York contra *S. aureus* IV.- Sobrenadante de queso de puerco contra *S. aureus* V.- Sobrenadante de tocino contra *S. aureus*.

El medio TSB contiene menos cantidad de nutrientes comparado con el CGB, como se mencionó en los antecedentes. Mariana Contreras (2016) describió que *P. acidilactici* producía dos enzimas con actividad lítica cuando creció a la cepa en medio TSB comparando con el CGB y otros medios. En este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de *L. plantarum* y *E. faecium* ajustando los medios de residuos cárnicos a la composición del TSB. En la figura 10 se observa que 4 de los 5 sobrenadantes tuvieron actividad contra *S. aureus* y que el sobrenadante de tocino inhibió a *L. innocua*.

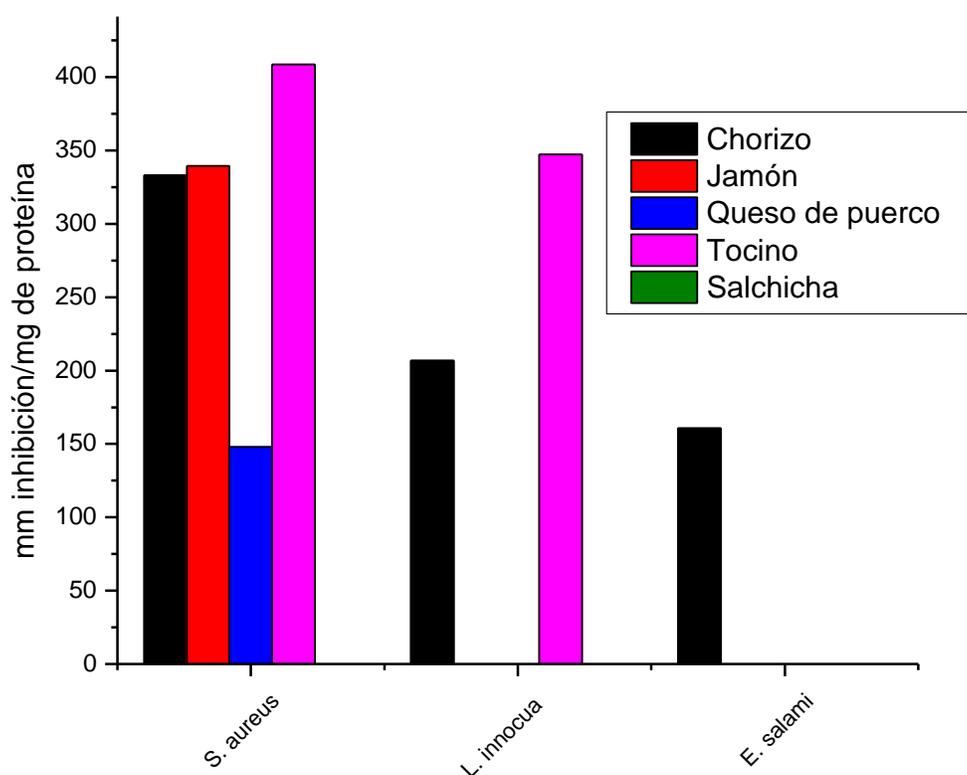


Figura 10 Actividad antimicrobiana específica de los sobrenadantes de *L. plantarum* en medios ajustados a TSB a las 8 h de crecimiento.

En la figura 11 se observan los halos de inhibición de los sobrenadantes de *E. faecium* cuando creció en medios de residuos cárnicos ajustados a TSB.

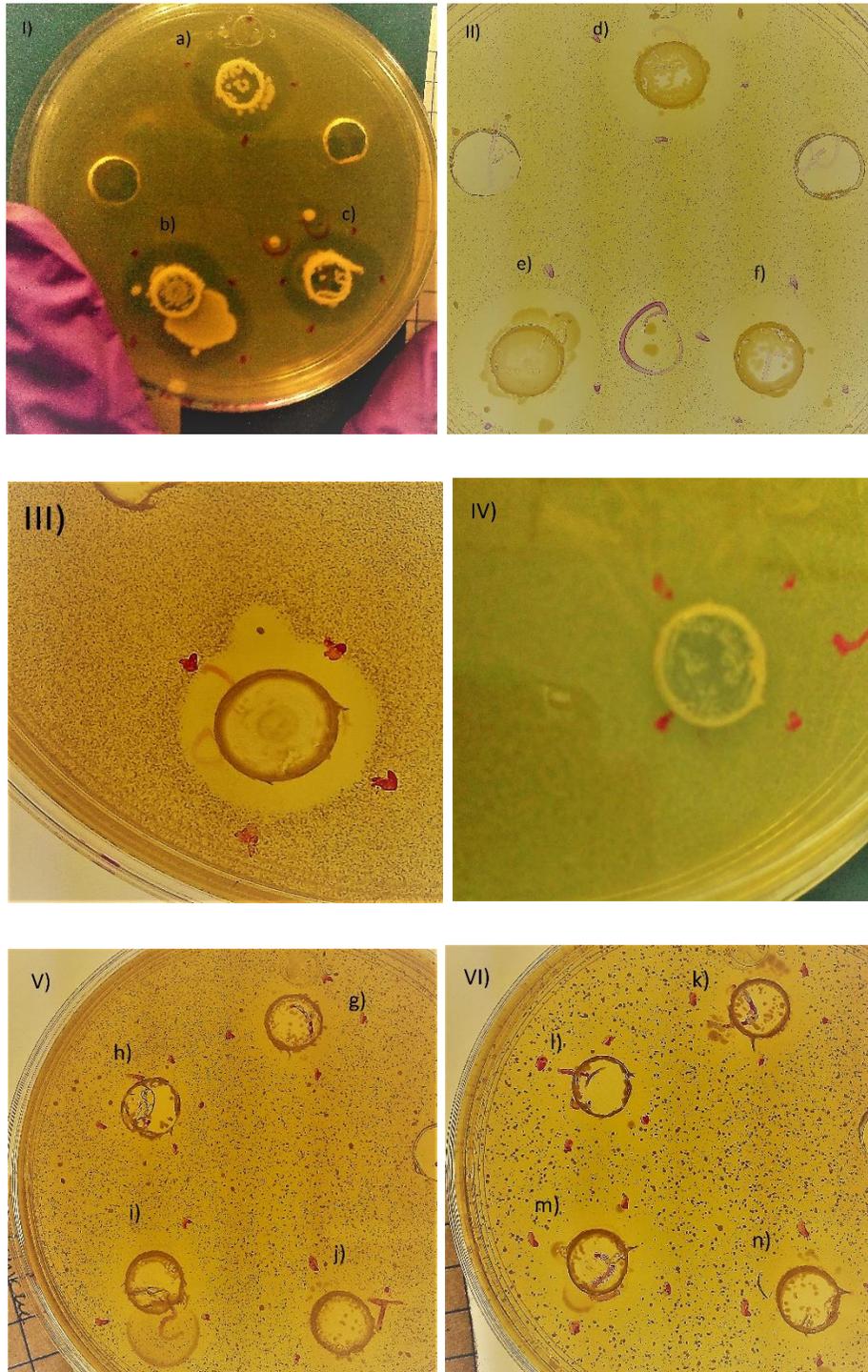


Figura 11 I.- Sobrenadantes contra *L. innocua*, a) de chorizo; b) de salchicha; c) de tocino. II.- Sobrenadantes contra *S. aureus*, d) de chorizo; e) de salchicha; f) de tocino. III.- Sobrenadante de salchicha contra *L. mesenteroides*. IV.- Sobrenadante de salchicha contra *W. viridescens*. V.- Sobrenadantes contra exudado de salchicha, g) de chorizo; h) de jamón tipo York; i) de salchicha; j) de tocino. VI.- Sobrenadantes contra exudado de salami, k) de chorizo; l) de jamón tipo York; m) de salchicha; n) de tocino.

En la figura 12 se observa que la actividad inhibitoria incrementó, ya que inhibió a 6 de los 8 microorganismos blanco con los sobrenadantes del medio elaborado con salchicha.

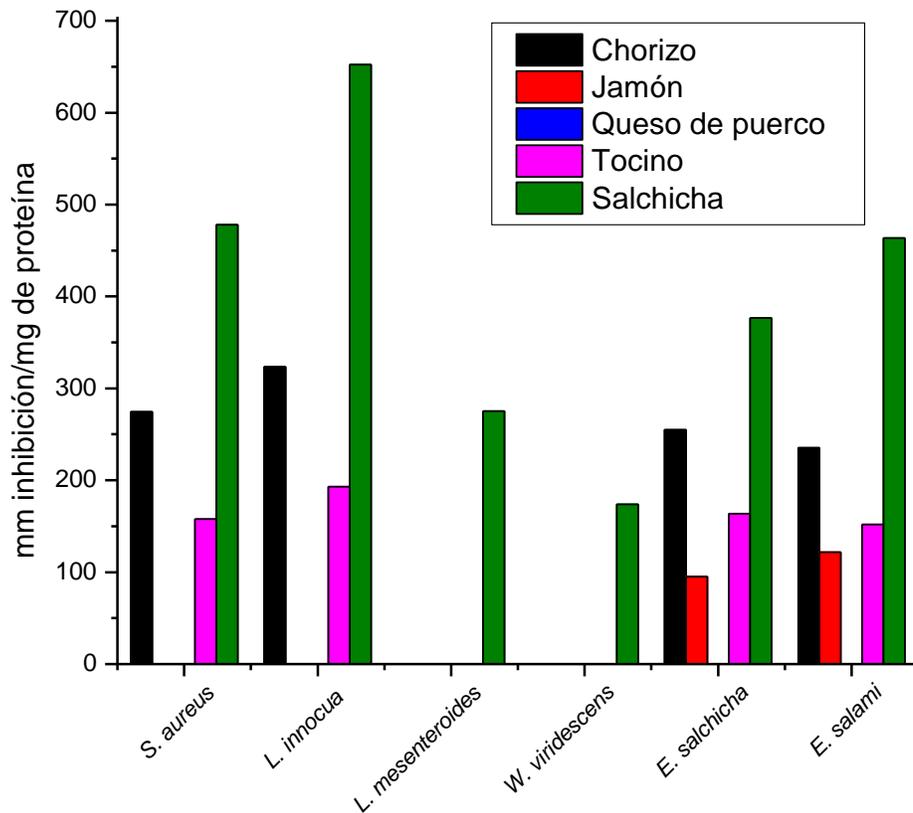


Figura 12 Actividad antimicrobiana específica de sobrenadantes de *E. faecium* contra microorganismos blanco a las 8 h de crecimiento.

Se determinó que el medio elaborado con salchicha de pavo presentó mayor actividad antimicrobiana comparándolo con los demás residuos. A partir de este medio se obtuvieron los sobrenadantes para ser aplicados a las salchichas tipo Viena y evaluar la vida de anaquel (Figura 14).



Figura 14 Muestras de salchicha tipo Viena al día 1 de muestreo.

ETAPA II: VIDA DE ANAQUEL DE SALCHICHAS TIPO VIENA

Análisis microbiológico

La NOM-122-SSA1-1994 indica que los productos cárnicos curados y cocidos como lo son las salchichas tipo Viena tienen como límite en el punto de venta 600,000 UFC/g (5.77 log) de microorganismos mesófilos. En la figura 15 se observa que las muestras control tuvieron una velocidad de crecimiento mayor ($\mu=0.592$) con respecto a las que contenían los sobrenadantes de *L. plantarum* ($\mu=0.447$) y *E. faecium* ($\mu=0.479$), esto indica que los sobrenadantes tuvieron un

efecto de inhibición del crecimiento de bacterias mesófilas. Además se muestra que el crecimiento máximo para el caso del control fue muy cercano al límite que marca la norma (5.711 log) y que fue inhibido alrededor de 1.6 unidades de log para las muestras con sobrenadantes comparado con el control. De acuerdo con los valores de velocidad de crecimiento y el crecimiento máximo se determinó que el sobrenadante de *L. plantarum* es el que presentó mayor inhibición en el desarrollo de microorganismos mesófilos.

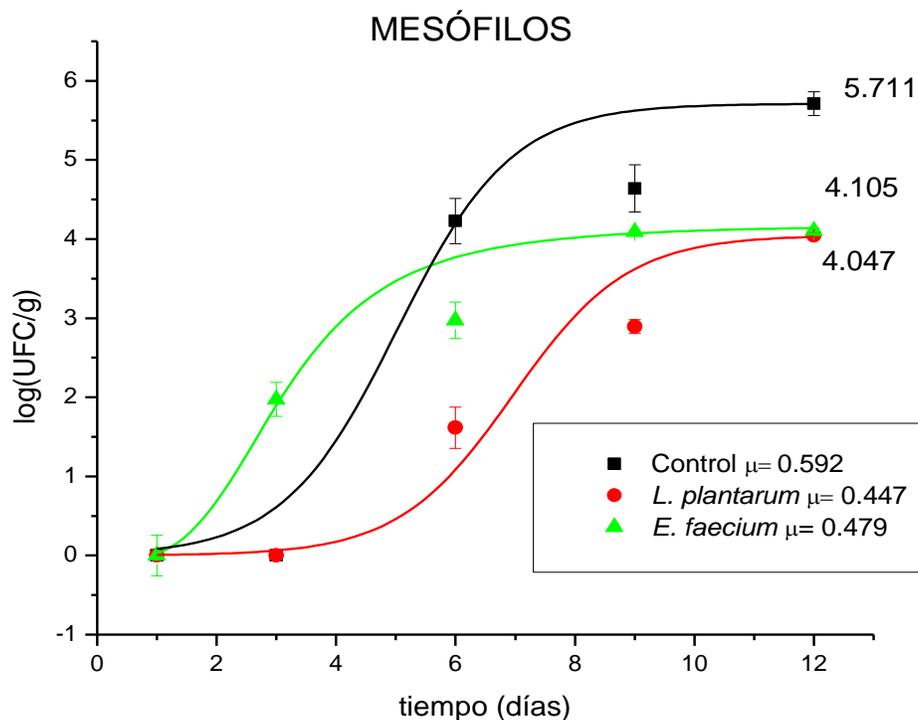


Figura 15. Bacterias mesófilas en las salchichas durante la evaluación de la vida de anaquel.

El grupo de las bacterias lácticas con mayor frecuencia reportados en productos cárnicos son los géneros: *Weissella*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* que son productores de gas y algunos metabolitos que se relacionan con la descomposición de estos productos (Kröckel, 2013).

La norma antes mencionada no especifica un límite para estos microorganismos, sin embargo se sabe que las bacterias lácticas pueden disminuir el pH debido a la

producción de ácidos orgánicos, acelerando la descomposición del producto. Como se observa en la figura 16, el crecimiento máximo de las BAL en las salchichas control fue de 3.875 log con una μ de 0.582 días⁻¹, es decir que se desarrollaron más rápido comparando con las muestras con sobrenadante de *L. plantarum*, que tuvo valores de crecimiento máximo y velocidad de crecimiento de 3.294 log y 0.495 días⁻¹ respectivamente. En las salchichas con el sobrenadante de *E. faecium* hubo mayor crecimiento de BAL y este fue más rápido comparado con los anteriores, teniendo un crecimiento máximo de 6.199 log y una μ de 0.999 días⁻¹. En esta evaluación también el sobrenadante de *L. plantarum* fue el que presentó mayor inhibición en el crecimiento de las BAL. Cabe mencionar que las BAL compiten con las enterobacterias por los carbohidratos y que estas se inhiben por la formación de ácidos orgánicos como el láctico y el fórmico (Östling y Lindgren, 1993).

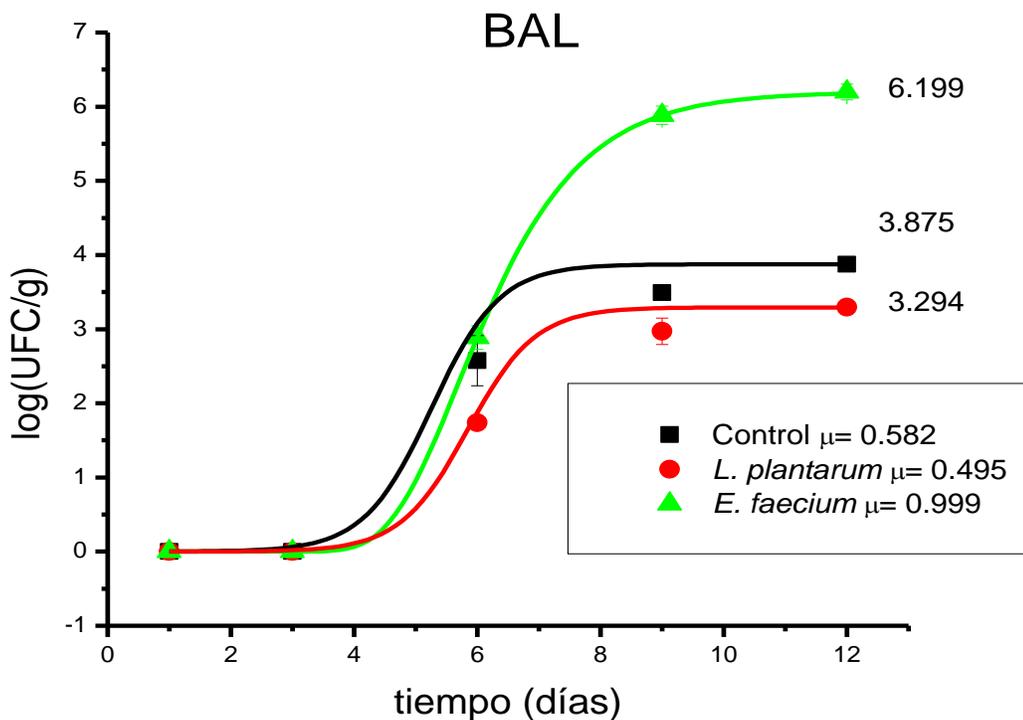


Figura 16 Bacterias lácticas durante la evaluación de la vida de anaquel.

La figura 17 indica que no hubo crecimiento de enterobacterias en las muestras control y en las que contenían el sobrenadante de *L. plantarum* por lo que no se puede hablar de efecto inhibitorio si no que las muestras no contienen dichos microorganismos, para el caso de las salchichas con el sobrenadante de *E. faecium* se presentó un crecimiento de 3.304 log al final de la evaluación, lo que pudo deberse a una contaminación

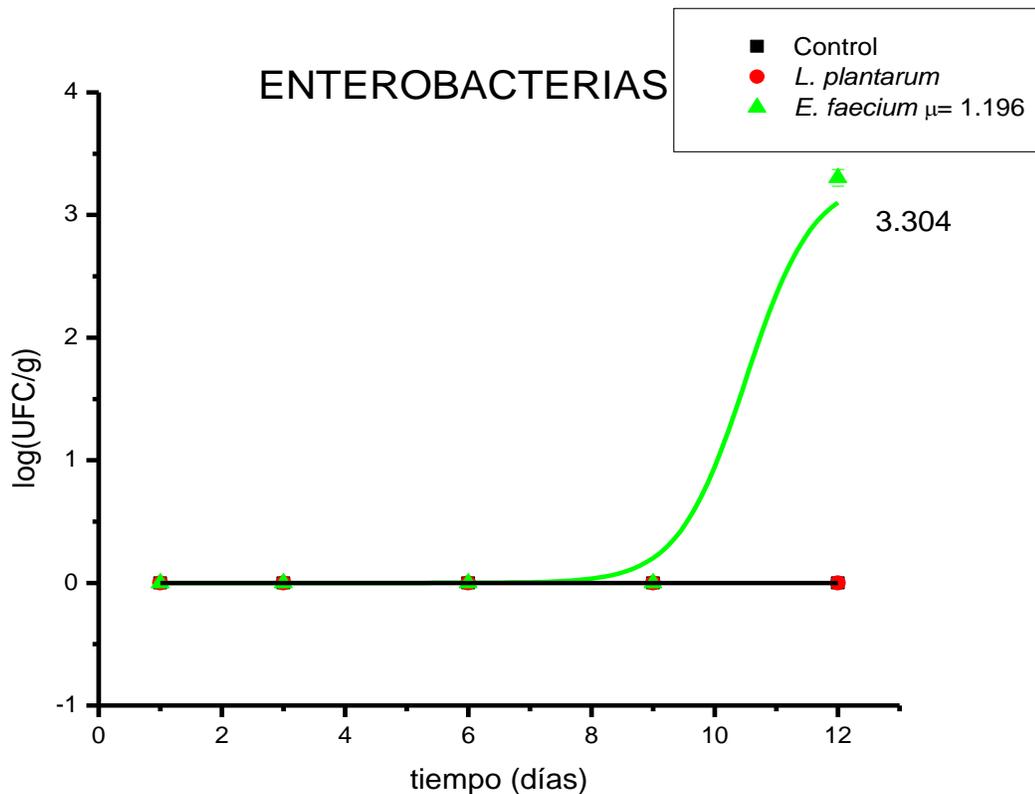


Figura 17 Enterobacterias durante la evaluación de la vida de anaquel.

Los microorganismos psicotróficos son aquellos que crecen a bajas temperaturas (<5 °C) y dentro de este grupo se encuentran los géneros de: *Acinetobacter*, *Brochothrix*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, entre otros (Jay, 2005). Es importante monitorearlos ya que el almacenamiento de los productos cárnicos entre ellos las salchichas tipo Viena, va de los 2 a los 4 °C para mantener la cadena de frío y no alterar la vida de anaquel. En la figura 18 se observa que hubo

inhibición de estos microorganismos en las muestras con el sobrenadante de *L. plantarum* con un crecimiento máximo de 4.459 y una μ de 0.537 días⁻¹ en comparación al control y a las muestras que contenían el sobrenadante de *E. faecium*.

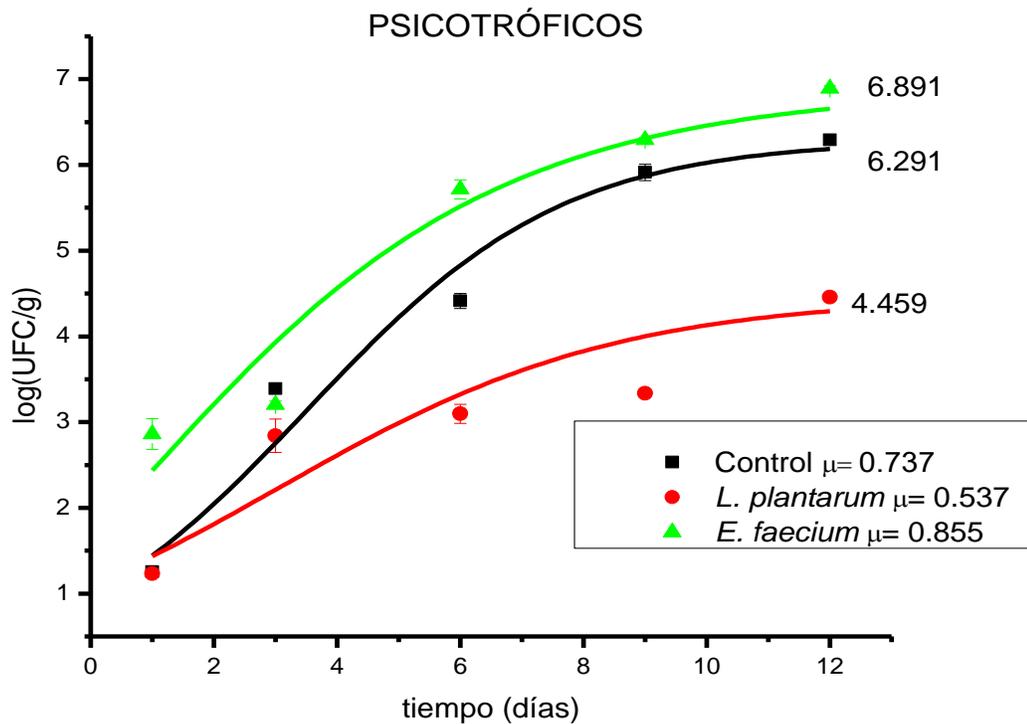


Figura 18 Bacterias psicotróficas durante la evaluación de la vida de anaquel.

De este análisis microbiológico, el sobrenadante de *L. plantarum* aplicado sobre la salchicha fue el que presentó mayor inhibición con respecto al sobrenadante de *E. faecium*, el cual, aunque logró inhibir a los microorganismos mesófilos presentó mayor crecimiento de BAL, enterobacterias y psicotróficos. Existe el reporte de una bacteriocina producida por *L. plantarum* 423 que fue utilizado como cultivo iniciador en salamis y que tuvo la capacidad de inhibir a *L. innocua* inoculada intencionalmente en estos productos y que además proporcionó características sensoriales favorables como el aroma el sabor color y textura (Woraprayote *et. al.*, 2016).

Análisis fisicoquímico

El pH es un parámetro de calidad de la carne y los productos cárnicos, ya que afecta las características del producto. El pH tiene un efecto sobre la capacidad de retención de agua (CRA), cuando el pH disminuye la CRA disminuye también lo que provoca la liberación de agua y la generación de exudados, esto puede producir la proliferación de microorganismos y cambios en las características sensoriales del producto (Thomsen y Zeuthen, 1988). El valor de pH de las salchichas cocidas se encuentra alrededor de 6.2-6.3 independientemente del valor de pH de la masa cruda y del uso de los fosfatos (Puolanne *et. al.*, 2001).

En la figura 19 se observa que el pH de las muestras control y las muestras con el sobrenadante de *E. faecium* tuvieron un descenso de 0.2 unidades de pH a lo largo de los 12 días y que las muestras con el sobrenadante de *L. plantarum* se mantuvieron constantes por 9 días y finalmente tuvieron un descenso de casi 0.2 unidades. La NOM establece un rango de valor de pH de las salchichas que va de 5.2 a 6.5 se observa que las muestras con los sobrenadantes están por arriba de lo establecido por lo que no cumplen con esta especificación.

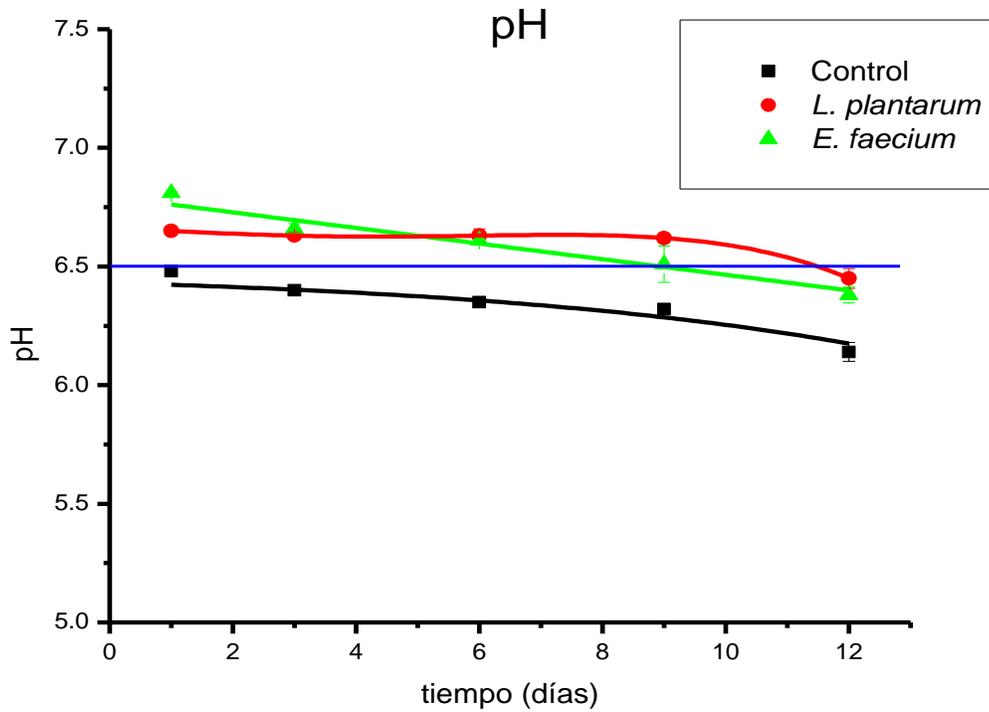


Figura 19 Comportamiento del pH durante la evaluación de la vida de anaquel.

Otra determinación realizada fue la actividad de agua (a_w) que se refiere al agua disponible. En la figura 20 se observa que no hubo un cambio drástico por lo que no se puede decir si hubo un efecto positivo o negativo sobre las salchichas. Este parámetro está relacionado con el crecimiento de microorganismos ya que se sabe que a valores de $a_w > 0.91$ se favorece la proliferación de bacterias (Badui, 2006).

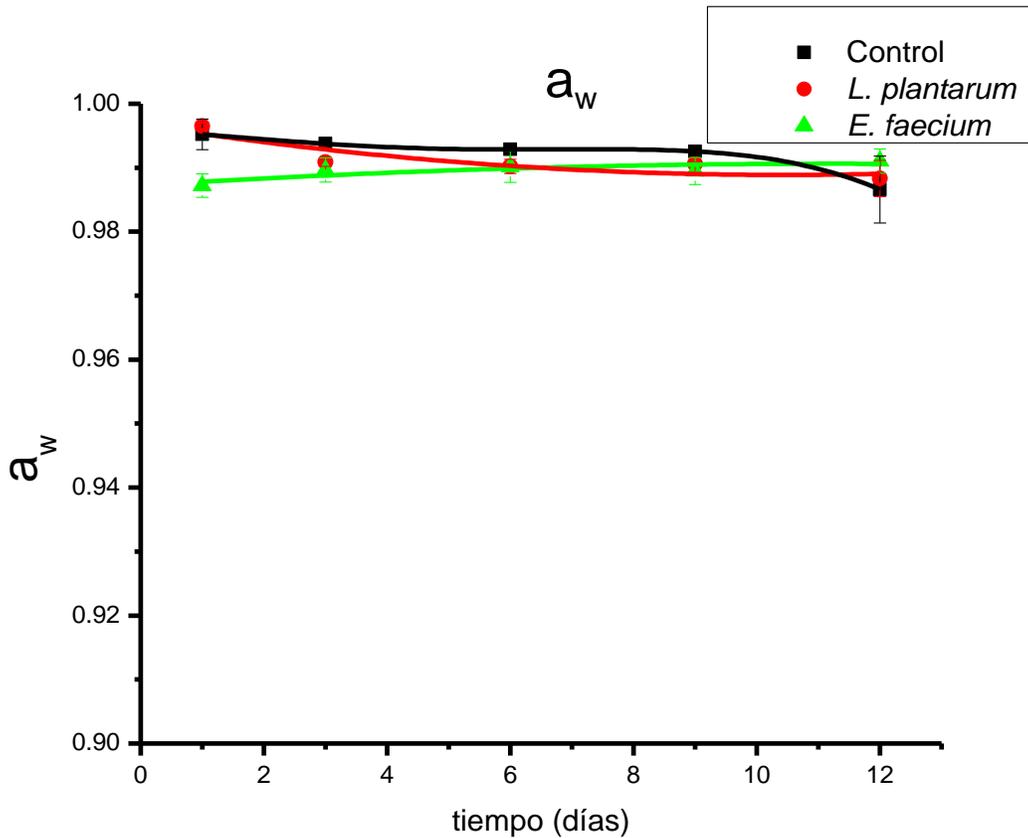


Figura 20 Actividad de agua a lo largo de la determinación de la vida de anaquel.

También se considera a las bases volátiles totales de nitrógeno como un parámetro de calidad, ya que cuantifica todas aquellas bases nitrogenadas volátiles, como lo son la trimetilamina que se produce por la descomposición bacteriana, la dimetilamina que se produce por enzimas autolíticas durante el almacenamiento a bajas temperaturas, el amoniaco que se produce por la desaminación de aminoácidos y catabolitos de nucleótidos, entre otro compuestos nitrogenados asociados al deterioro de los alimentos (FAO, 1998). Un alimento se considera fresco cuando el valor de BVN-T es inferior a 20 mg N/100g de muestra, valores por arriba de este son indicadores de deterioro avanzado y valores superiores a 35 mg N/100g de muestra indican que el alimento ya es inadecuado para el consumo (Kirk *et. al.*, 2006).

En la figura 21 se observa que ninguna muestra llega a los límites por lo que se considera que el deterioro no es tan avanzado en cuanto a las BVT-N. También se observa que las muestras con el sobrenadante de *L. plantarum* presentaron menos cantidad de bases volátiles con respecto al control, mientras que las que contenían el sobrenadante de *E. faecium* presentaron más cantidad de estos compuestos, que el control.

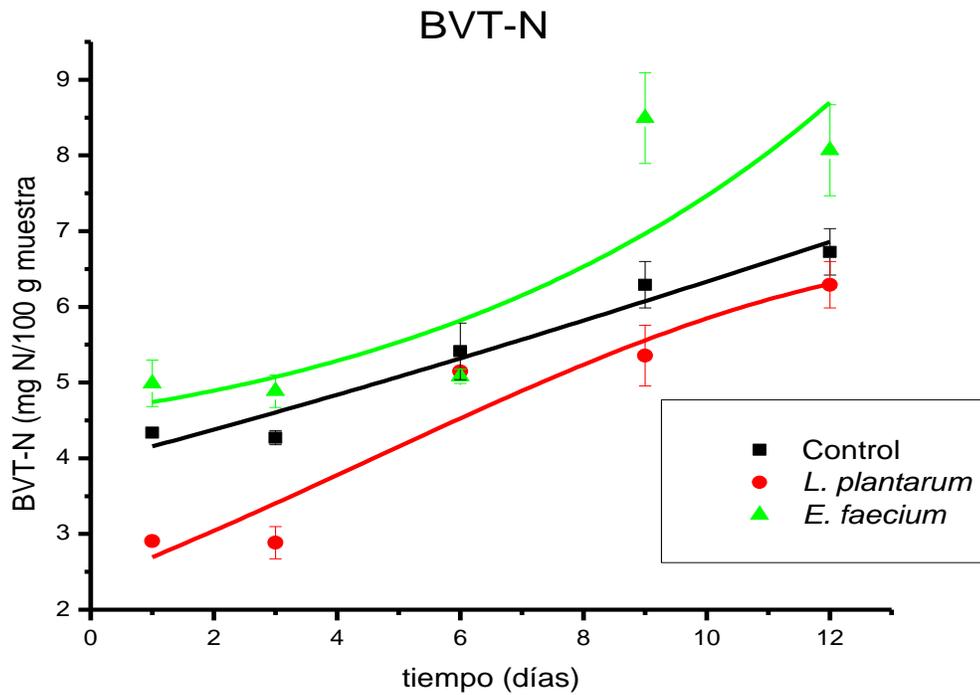


Figura 21 Bases Volátiles Totales durante la evaluación de la vida de anaquel

Se determinó el grado de oxidación de lípidos, este parámetro indica la cantidad de sustancias que son reactivas al ácido-2-tiobarbitúrico (TBARS) y se expresan en equivalentes de malonaldehído (MDA)/kg de muestra (Huang y Greene, 1978). En la figura 22 se muestra que la solución de *L. plantarum* presentó menor oxidación de lípidos con respecto al control y a las muestras con sobrenadante de *E. faecium*.

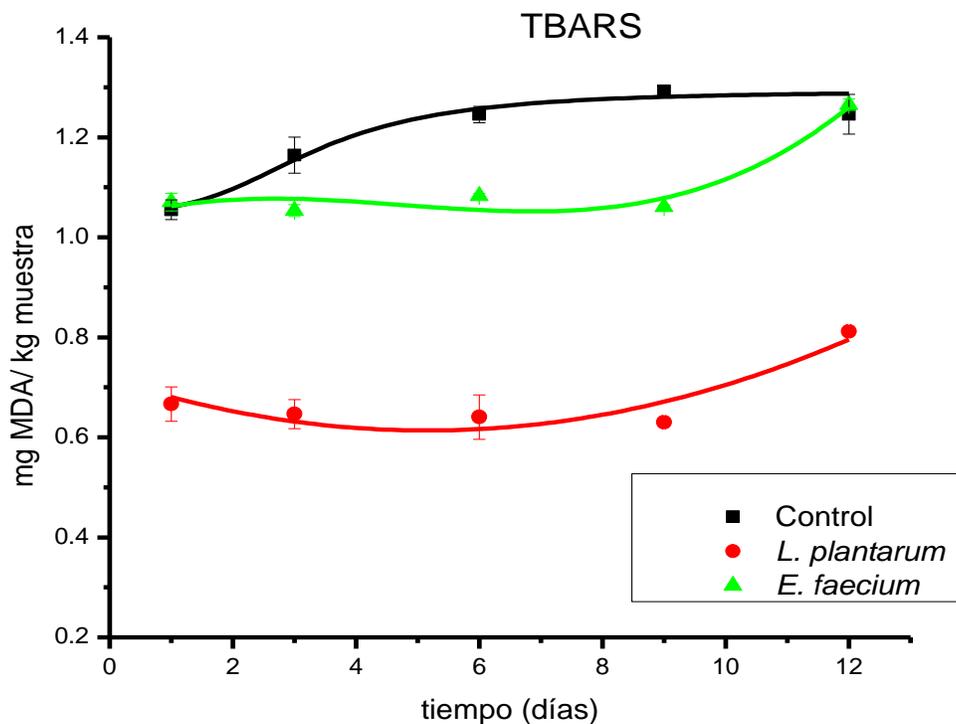


Figura 22 Oxidación de lípidos durante la evaluación de la vida de anaquel.

Análisis de perfil de textura

La textura está comprendida por varios parámetros como la fuerza, adhesividad, elasticidad, cohesividad, gomosidad, masticabilidad y resistencia. Estos atributos determinan cómo se comporta un alimento al ser consumido (Ruiz *et. al.*, 2005). Los parámetros a determinar en las salchichas fueron la fuerza que simula el esfuerzo de la mandíbula al morder y la elasticidad que se refiere la capacidad del alimento a recuperar su forma original después de la primera compresión.

En la figura 23 se observa el comportamiento de la fuerza de corte, la cual disminuye después del día 3 para las muestras control y a las que se les aplicó el sobrenadante de *L. plantarum*, lo que indica que la salchicha se vuelve blanda y puede perder aceptabilidad por parte de los consumidores. El comportamiento de la elasticidad se observa en la figura 24, este parámetro no presentó cambios significativos y las muestras a evaluar se comportaron prácticamente igual al control. El pH y el a_w son parámetros que influyen en la textura de los alimentos (Herrero *et. al.*, 2007).

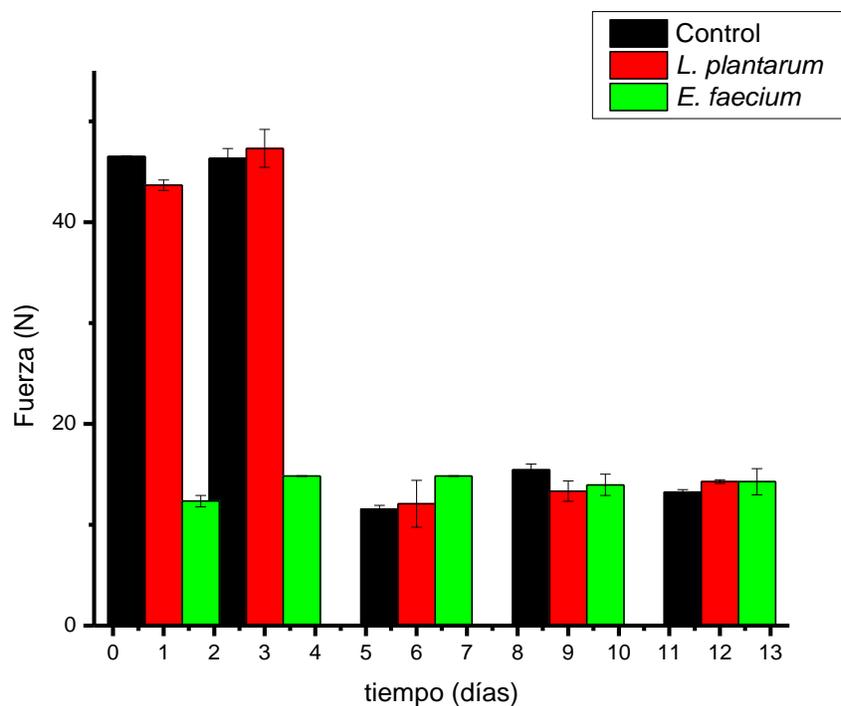


Figura 23 Comportamiento de la fuerza de las salchichas durante la evaluación de la vida de anaquel.

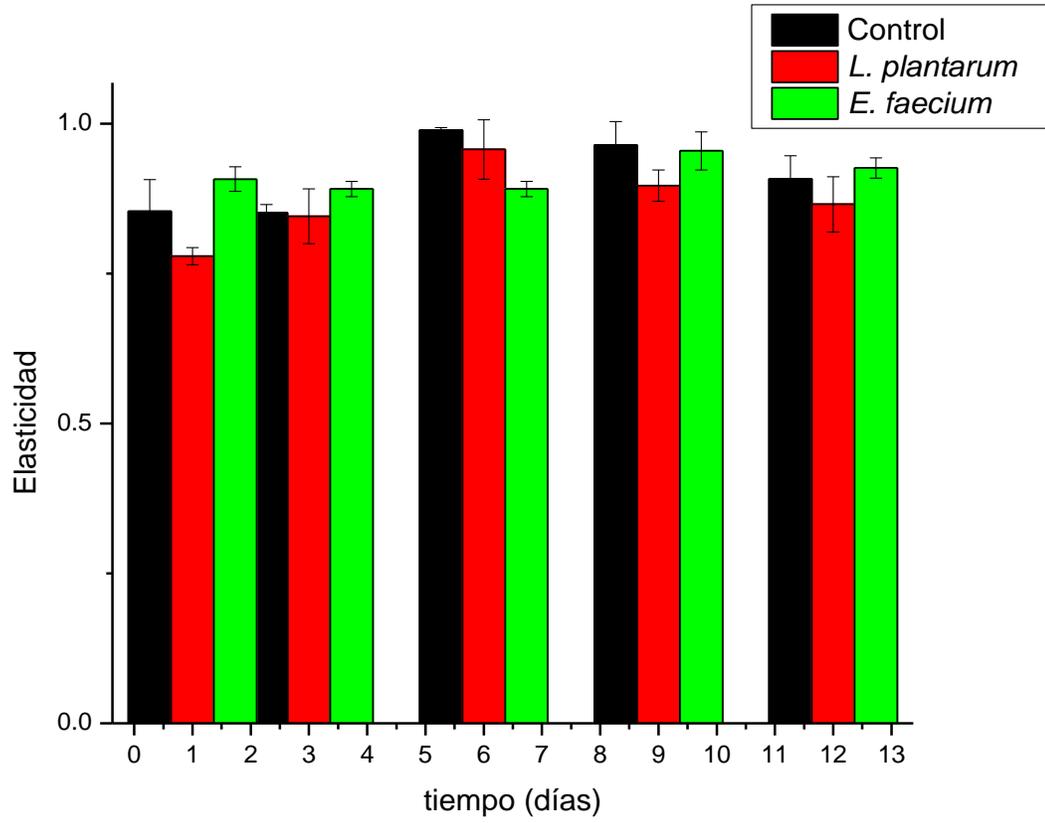


Figura 24 Elasticidad de las salchichas durante la evaluación de la vida de anaquel.

Análisis de color

En la tabla 2 se muestran los resultados de color para las muestras de salchicha que fueron tratadas con los sobrenadantes de *L. plantarum* y *E. faecium*, además del control. En general, los valores de L*, a* y b*, no presentaron diferencia significativa con respecto al control.

Tabla 2 Parámetros L*, a* y b*

tiempo (días)	Control			Sobrenadante de <i>L. plantarum</i>			Sobrenadante de <i>E. faecium</i>		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L	a*	b*
1	48±0.2	15±0.4	13±0.3	49±1.2	15±0.7	13±0.2	49±2.6	17±0.1	13±0.2
3	55±1.3	16±0.1	14±0.1	47±0.7	15±0.2	12±0.4	46±0.5	16±0.2	12±0.4
6	51±0.7	15±0.2	13±0	51±1	15±0.1	13±0.3	48±1.1	16±0.1	13±0.3
9	53±0.4	16±0.3	15±0.1	53±0.6	15±0.3	12±0.4	44±1.0	16±0	12±0.4
12	54±0	15±1.2	14±0.9	54±0.8	16±0.1	12±0.1	45±2.2	15±0.1	12±0.1

Estimación de la vida de anaquel

Para estimar la vida de anaquel se utilizó un modelo matemático basado en una ecuación de cinética que involucra las variables de respuesta y el tiempo de la evaluación de la vida de anaquel.

$$\text{Log}(V_R) = \mu (\text{tiempo}) + \beta$$

Como se mencionó anteriormente, el único parámetro establecido en la norma NOM-122-SSA1-1994 es la cantidad de mesófilos (600,000 UFC/g) en el punto de venta, para esto se utilizó la figura 15 y se realizó una regresión lineal para poder estimar la vida útil de las salchichas.

El almacenamiento de las muestras fue a 10 °C para favorecer el crecimiento de los microorganismos y las reacciones que se llevan a cabo. Se estima que los alimentos se conservan cuatro veces más tiempo a temperaturas de 0 a 4 °C que a 10 °C, por esta razón el tiempo estimado a 10 °C utilizando el modelo matemático, se multiplicó por cuatro para predecir la vida de anaquel a un almacenamiento de 4 °C (Veall, 1993).

En la tabla 3 se muestra el tiempo de vida útil estimado de cada muestra almacenada a 4 °C. Se observa que las muestras a las que se les aplicó el sobrenadante de *L. plantarum* tienen 21 días más de vida útil que el control, además de que las muestras con el sobrenadante de *E. faecium* tienen 15 días más de tiempo de vida útil que el control..

Tabla 3 Vida de anaquel estimada para cada muestra a 4 °C

	Pendiente (μ)	Ordenada al origen (β)	Límite de mesófilos (NMX-122-SSA1-1994) Log (UFC/g)	Vida de anaquel estimada. (días)
Control	0.5744	-0.6454	5.77	44
<i>L. plantarum</i>	0.3967	-0.7474		65
<i>E. faecium</i>	0.3602	2.7706		59

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) el cual es una técnica para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos y pueden hallarse las causas de la variabilidad de un conjunto de datos y ordenarlas por importancia. En la figura 25 se observa el PCA el cual involucra a todas las variables evaluadas, de acuerdo a estos resultados puede señalarse que el tratamiento más eficiente fue la aplicación del sobrenadante de *L. plantarum*.

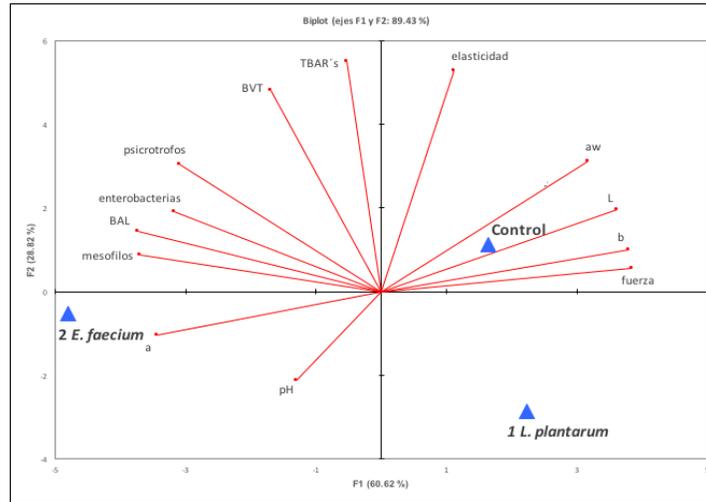


Figura 25 Análisis por componentes principales

Tabla 4 Análisis de varianza ANOVA para las respuestas por tratamiento aplicado a salchicha

MODELO	Mesófilos	BAL	Enterobacterias	Psicotróficos	L	a	B	pH	Aw	Fuerza	Elasticidad	BVT	TBARs
R ²	0.997	0.997	0.997	0.998	0.861	0.850	0.861	0.986	0.776	0.997	0.856	0.981	0.965
F	416.440	373.724	383.538	617.898	6.528	5.963	6.529	73.043	3.644	404.016	6.233	54.150	29.293
Pr > F	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.000	< 0.0001	< 0.0001	0.003	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Tratamiento	719.675	145.237	274.996	735.754	22.095	13.556	24.380	220.937	4.605	322.175	5.706	66.403	170.310
	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.013	< 0.0001	0.005	< 0.0001	< 0.0001
Día	1315.783	1548.253	790.573	2176.418	2.630	4.264	3.374	162.064	6.102	1232.394	17.538	186.413	7.520
	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.065	0.012	0.029	< 0.0001	0.002	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.001
Tratamiento*Día	40.851	39.337	274.996	68.927	3.935	4.631	3.119	6.395	2.584	148.350	2.597	6.999	1.296
	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.003	0.001	0.012	0.000	0.029	< 0.0001	0.029	< 0.0001	0.294

Tabla 5 Resumen de las comparaciones de medias por tratamiento (Tukey HSD)

	Mesófilos	BAL	Enterobacterias	Psicotróficos	L	a	B	pH	Aw	Fuerza	Elasticidad	BVT	TBARs
Control	2.916 c	1.988 b	0.000 a	4.253 b	51.974 b	15.479 a	13.855 b	6.337 a	0.992 b	26.611 c	0.913 b	5.408 b	1.201 b
<i>L. plantarum</i>	1.711 a	1.600 a	0.000 a	2.993 a	50.854 b	15.249 a	13.701 b	6.597 b	0.991 ab	26.134 bc	0.869 a	4.517 a	0.679 a
<i>E. faecium</i>	5.004 d	2.994 c	0.661 c	4.992 c	46.351 a	16.105 b	12.279 a	6.591 b	0.990 a	14.041 a	0.914 b	6.304 d	1.107 b
Pr > F	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.000	< 0.0001	< 0.0001	0.003	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Significativo	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí

En las tablas 4 y 5 se muestra el análisis estadístico realizado de acuerdo a los resultados de la evaluación de la vida de anaquel, en el resumen de medias se observa que si hubo diferencia significativa entre el control y los sobrenadantes aplicados. Para el caso del análisis microbiológico se esperaba que si hubiera diferencia ya que la adición de los sobrenadantes sí inhibió el crecimiento de los microorganismos. Para el caso del color se observa que no hubo diferencia significativa entre el control y las muestras con el sobrenadante de *L. plantarum*, y por último, en los parámetros pH, a_w , elasticidad, BVT-N y TBARS, sí hubo diferencia, pero como se mostró en la discusión de los resultados de cada determinación, estas variaciones son mínimas comparadas con el control y algunas como la oxidación de lípidos y BVT-N, fueron benéficas para el producto ya que se redujeron los valores.

ETAPA III: IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR ZIMOGRAMA.

Microorganismos aislados y amplificación del gen 16S

Las salchichas con el sobrenadante de *L. plantarum* presentaron un tiempo de vida útil mayor al control y a las que contenían el sobrenadante de *E. faecium*, a estas muestras se les realizó un análisis para identificar que microorganismos se encontraban al principio y al final de la evaluación de la vida de anaquel (día 1 y 12) y encontrar cuales son los microorganismos que se inhibieron.

Se aislaron las colonias, se les extrajo el DNA, se amplificó el gen 16S y se mandó a secuenciar a los laboratorios de MacroGen Inc en Corea del Sur. Para identificar género y especie se utilizó la base de datos Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI). En la tabla 4 se muestran los microorganismos que se identificaron, además del valor E el cual indica que tan significativo es el alineamiento de la secuencia problema y la de referencia y el porcentaje de identidad que indica el número de coincidencias por cada 100 posiciones. Se observa que en el día 1 se encontró *Staphylococcus epidermidis*, microorganismo que se presenta en la piel y en las mucosas de los seres humanos (Madigan *et. al.*, 2009) y *E. faecium* microorganismo que se encuentra en productos cárnicos y que también es indicador de contaminación

fecal. En el día 12 predominan los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* y un *Enterococcus*, el hecho de que al día 12 ya no se encontrara a *Staphylococcus epidermidis* puede deberse a los compuestos antimicrobianos presentes en el sobrenadante de *L. plantarum*.

Tabla 6 Identificación de microorganismos presentes al día 1 y día 12 del muestreo.

Día	Muestra	Nombre del microorganismo	Valor E	Porcentaje de Identidad
1	Control	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1e-64	100
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7e-31	96
	Sobrenadante 1	<i>Enterococcus faecium</i>	2e-40	100
12	Control	<i>Lactobacillus sakei</i>	6e-36	97
		<i>Lactobacillus curvatus</i>	3e-61	100
		<i>Lactobacillus sakei</i>	1e-53	99
		<i>Lactobacillus sakei</i>	6e-42	97
		<i>Lactobacillus curvatus</i>	4e-59	100
	Sobrenadante 1	<i>Lactococcus lactis</i>	9e-40	98
		<i>Enterococcus faecium</i>	3e-61	100
		<i>Lactococcus lactis</i>	1e-53	100
		<i>Lactococcus lactis</i>	2e-58	98

Actividad antimicrobiana en zimograma y SDS-PAGE al 10%

Se determinó la actividad lítica contra *M. lysodeikticus*, y en la figura 26 se observan las bandas de inhibición en los días 1, 6 y 12 alrededor de los 97 kDa y una más debajo de 66 kDa, lo que indica que las proteínas de inhibición se mantuvieron a lo largo de la evaluación de la vida de anaquel. Salas (2017) ha reportado la banda de 97 kDa con actividad antimicrobiana producida por *L. plantarum* y está en proceso la identificación de dicha proteína.

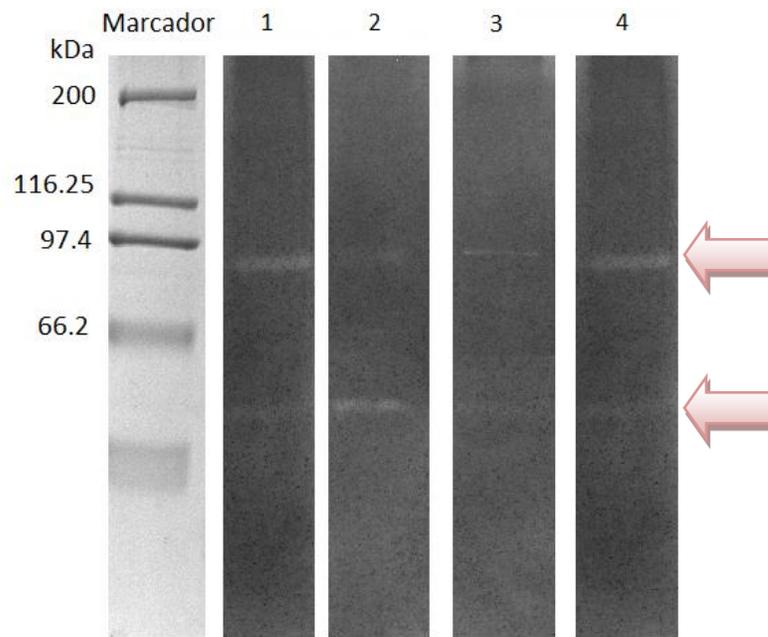


Figura 26 Zimograma contra *M. lysodeikticus*. 1) Sobrenadante de *L. plantarum* antes de ser aplicado a las salchichas; 2) muestra del día 1; 3) muestra del día 6; 4) muestra del día 12. Marcador de alto peso molecular.

En la figura 27 se observa el perfil proteínico de las 4 muestras analizadas, se utilizó el mismo marcador que en el zimograma, se observan las bandas a la misma altura que las que produjeron actividad lítica en el zimograma.

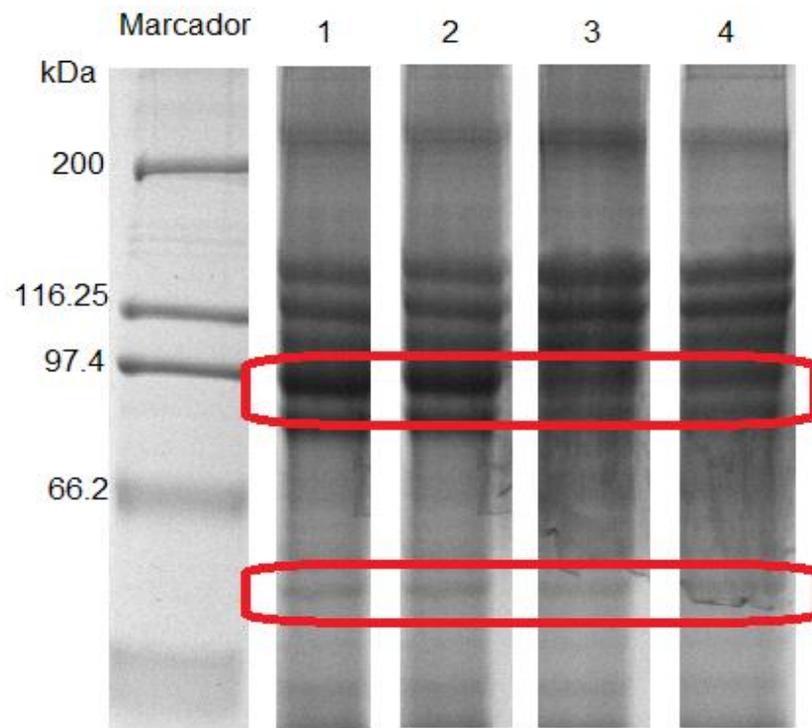


Figura 27 SDS-PAGE al 10%. 1) Sobrenadante de *L. plantarum* antes de ser aplicado a las salchichas; 2) muestra del día 1; 3) muestra del día 6; 4) muestra del día 12. Marcador de alto peso molecular.

CONCLUSIONES

- *L. plantarum* y *E. faecium* crecieron en el medio salchicha de pavo y presentaron actividad antimicrobiana.
- El sobrenadante de *L. plantarum* logró alargar la vida de anaquel de las salchichas tipo Viena por 21 días y el de *E. faecium* por 15 días, en comparación con el control.
- La actividad antimicrobiana del sobrenadante de *L. plantarum* aplicado a las salchichas tipo Viena, mantuvo la actividad antimicrobiana a lo largo de la evaluación de la vida de anaquel.

PERSPECTIVAS

- Identificación de la proteína responsable de la actividad antimicrobiana producida por *L. plantarum*.
- Evaluar sobrenadantes en otros productos cárnicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Sieiro, P., Montalban-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. CD.MX.: Pearson Educación.
- Barbosa, J., Borges, S., & Teixeira, P. (2014). Selection of potential probiotic *Enterococcus faecium* isolated from Portuguese fermented food. *International Journal of Food Microbiology*, 144-148.
- Bourne, M. (1978). Texture Profile Analysis . *Food Technology* , 62-66.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 248-254.
- Consejo Mexicano de la carne. (2016). Obtenido de <http://infocarne.comecarne.org/compendio/visualizar?comp=9&componente=477>
- Contreras-Cruz, M. (2013). Efecto del medio de cultivo en la producción de enzimas de interés biotecnológico por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Tesis de Licenciatura*.
- Erickson, M., & Hung, Y.-C. (1997). *Quality in Frozen Food*. Athens: Chapman & Hall.
- FAO. (1998). *El pescado fresco: su calidad y cambios de su calidad*. Roma: Huss, H.H.
- Franz, C., Stiles, M., Schleifer, K., Abriouel, H., & Gálvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *Federation of European Microbiological Societies*, 293-310.
- García Cano, I. (2013). Peptidoglucano hidrolasa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042: Detección, localización celular y evaluación de su potencial como antibacteriano. . *Tesis de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM*.
- García-Cano, I., Serrano-Maldonado, C., Olvera-García, M., Delgado-Arciniega, E., Peña-Montes, C., Mendoza-Herrera, G., & Quirasco, M. (2014). Antibacterial activity produced by *Enterococcus* spp. isolated from an

- artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese. *Food Science and Technology*, 26-34.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International journal of Food Microbiology*, 215-222.
- Girolami, A., Napolitano, F., Faraone, D., & Braghieri, A. (2013). Measurement of meat color using a computer vision system. *Meat Science*, 111-118.
- Gray, J., Gomma, E., & Buckley, D. (1996). Oxidative Quality and Shelf Life of Meats. *Meat Science*, 111-123.
- Hernández, I. (2016). Aprovechamiento de residuos de productos cárnicos para el cultivo de bacterias lácticas con actividad antimicrobiana.
- Herrero, A. M., de la Hoz, L., Ordóñez, J. A., Herranz, B., Romero de Ávila, M. D., & Cambero, M. I. (2008). Tensile properties of cooked meat sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) parameters and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 690-696.
- Herrero, A. M., Ordóñez, J. A., Romero de Avila, Herranz, B., de la Hoz, L., & Cambero, M. I. (2007). Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 331-338.
- Hu, Y., Xia, W., & Ge, C. (2008). Characterization of fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter culture. *LWT*, 730-738.
- Huang, W. H., & Greene, B. E. (1978). Effect of cooking method on TBA numbers of stored beef. *Journal of Food Science*, 1201-1203.
- Iturbe, F. A., & Sandoval, J. (2013). *Análisis de Alimentos. Fundamentos y técnicas*. CD.MX.: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Jay, J. M. (2005). *Modern Food Microbiology 7th ed.* USA: Springer Science and Business.
- Kirk, R. S., Sawyer, R., & Egan, H. (2006). *Composición y análisis de alimentos de Pearson. 2da ed.* México: CECSA.
- Konica Minolta Sensing Americas. (Septiembre de 2014). Obtenido de <http://sensing.konicaminolta.com.mx/2014/09/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab/>
- Kröckel, L. (2013). The Role of Lactic Acid Bacteria in Safety and Flavour Development of Meat, Lactic Acid Bacteria. En *R&D for Food, Health and Livestock Purposes* (págs. 129-152). En M. Kongo: InTech.

- Leroy , F., Verluoyten J, & De Vuyst, L. (2006). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 270-285.
- Lortal, S., & Chapot-Chartier, M. (2005). Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese. *International Dairy Journal*, 857-871.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2009). *Brock. Biología de los microorganismos*. Pearson Educación, S.A.
- Ospina, S. M., & Cartagena, J. R. (2008). La atmósfera modificada: una alternativa para la conservación de los alimentos. *Lasallista de investigación*, 112-123.
- Östling, C., & Lindgren, S. E. (1993). Inhibition of enterobacteria and Listeria growth by lactic, acetic and formic acids. *Journal of Applied Bacteriology*, 18-24.
- Palafox Berrios , M. C. (2015). Identificación molecular de microorganismos de descomposición en productos cárnicos. Informe de residencia profesional para titulación integral.
- Parada, J. L., Ricoy Caron, C., P. Medeiros, A. B., & Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives . *Brazilian Archives of Biology and Technology Journal*, 522-523.
- Pearson , A. M., & Tauber, F. W. (1984). *Processed meats*. AVI PUBLISHING COMPANY, INC.
- Pieniz, S., Martin de Moura, T., Vaz Cassenego, A. P., Andreazza, R., Guedes Frazzon, A. P., de Oliveira Camargo, F. A., & Brandelli, A. (2015). Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated. *Food Control*, 49-54.
- Puolanne, E. J., Ruusunen, M. H., & Vainionpää, J. I. (2001). Combined effects of NaCl and raw meat pH on water-holding in cooked sausage with and without added phosphate. *Meat Science*, 1-7.
- Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., & Penna A., L. B. (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: Characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, 124-140.
- Ruiz , F., Miguel, E., Blázquez, B., & Onega, E. (2005). A comparison between two methods (Warner-Bratzler and texture profile analysis) for testing either raw meat or cooked meat. *A comparison between two methods (Warner-*

Bratzler and texture profile analysis) for testing either raw meat or cooked meat, 527-536.

- Salas Villagrán, V. A. (2017). Identificación y caracterización de la actividad antibacteriana producida por dos bacterias ácido lácticas aisladas de un producto cárnico madurado tipo salami. Tesis de licenciatura en proceso.
- Salminen, S., Von Wrigth, A., & Ouwehand, A. (2004). *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects. 3rd edition.* E.U.A: Marcel Dekker.
- Samelis, J., Kakouri, A., & Rementzis, J. (2000). Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4 °C. *Food Microbiology, 329-340.*
- Seddik, H., Bendali, F., Gancel, F., Fliss, I., Spano, G., & Drider, D. (2017). Lactobacillus plantarum and Its Probiotic and Food Potentialities. *Probiotics & Antimicrobial Proteins, 1-12.*
- Szczesniak, A. (1963). Classification of Textural Characteristics. *Journal of Food Science, 385-389.*
- Thomsen, H. H., & Zeuthen, P. (1988). The Influence of Mechanically Deboned Meat and pH on the Water-Holding Capacity and Texture of Emulsion Type Meat Products . *Meat Science, 189-201.*
- Torres, J. D., González, K. J., & Acevedo, D. (2015). Análisis del perfil de textura en frutas, productos cárnicos y quesos. *ReCiTeIA, 64-72.*
- Veall, F. (1993). *Estructura y funcionamiento de mataderos medianos en países en desarrollo.* Roma: Food & Agriculture Org.
- Villaruel, R., Huizar, R., Corrales, M., Sánchez, T., & Islas, A. (2004). Péptidos naturales antimicrobianos: escudo esencial de la respuesta inmune. . *Investigacion en la Salud, 170-179.*
- Woraprayote, W., Malila, Y., Sorapukdee, S., Swetwivathana, A., Benjakul, S., & Visessanguan, W. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science, 118-132.*