



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

TESIS

**“BIOCONSERVACIÓN DE QUESO FRESCO MEDIANTE
Lactococcus lactis UQ2 Y UN RECUBRIMIENTO ACTIVO”**

PRESENTA

IBQ MAYRA MAYA PLAZA

DIRIGIDO POR

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

CENTRO UNIVERSITARIO
SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.

DICIEMBRE 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**“BIOCONSERVACIÓN DE QUESO FRESCO MEDIANTE *Lactococcus lactis*
UQ2 Y UN RECUBRIMIENTO ACTIVO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA

IBQ MAYRA MAYA PLAZA

DIRIGIDA POR

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ
PRESIDENTE

FIRMA

DR. PROSPERO DI PIERRO
CO-DIRECTOR

FIRMA

DR. SILVIA LORENA AMAYA LLANO
SECRETARIO

FIRMA

DRA. MONSERRAT ESCAMILLA GARCÍA
VOCAL

FIRMA

DRA. BLANCA ESTELA GARCÍA ALMENDÁREZ
SUPLENTE

FIRMA

**DRA. SILVIA LORENA AMAYA
LLANO**
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE
QUÍMICA

**DRA. MA. GUADALUPE FLAVIA
LOARCA PIÑA**
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN Y
POSGRADO

RESUMEN

El queso fresco es el de mayor consumo en México y América Latina, así como el más popular de estilo hispano que se consume en Estados Unidos. Tiene un alto contenido de humedad y es susceptible al deterioro fisicoquímico y microbiológico, lo que le confiere una corta vida de anaquel aún en condiciones de refrigeración. Este trabajo tuvo como objetivo microencapsular la cepa productora de nisina *Lactococcus lactis* UQ2, su incorporación a la matriz de queso fresco y utilizar un recubrimiento activo comestible (RAC) para aumentar la vida útil del queso fresco, manteniendo su calidad e inocuidad. *L. lactis* UQ2 se cultivó en un biorreactor utilizando suero de leche suplementado a 30°C y pH de 6.5 por 7 h. El RAC se basó en quitosano y caseinato de sodio en proporción 8:1 (p/p), respectivamente, incorporando arginato láurico y natamicina como agentes antimicrobianos naturales. Se evaluaron las propiedades mecánicas y antimicrobianas, así como permeabilidad al vapor de agua (WVP), de las suspensiones filmogénicas. En el queso fresco se realizó un diseño factorial 2² con el RAC y *L. lactis* UQ2 microencapsulado como factores, a dos niveles (presencia y ausencia), siendo las variables de respuesta color, pérdida de peso, pH, acidez, y análisis microbiológico almacenando a 4°C por 30 días, así como un reto antimicrobiano contra *L. monocytogenes*. La población de *L. lactis* UQ2 fue de 9.8±1.0 Log UFC/mL en el biorreactor y las células se microencapsularon mediante secado por aspersión. Se obtuvo una viabilidad de 12.6±0.1 Log UFC/g correspondiente al 90.2±8.7% de eficiencia de encapsulación. El RAC fue transparente e incoloro, con solubilidad de 38.9±2.1 %, permeabilidad al vapor de agua de 2.2x10⁻⁵±0.2x10⁻⁵ g/[día * m * Pa] y potencial ζ de 26.4±1.5 mV. Entre las propiedades mecánicas, la elongación fue de 64.2±5.3 %, el módulo de Young de 2240.9±237.6 MPa y la resistencia a la tensión de 130.3±1.1 MPa. Además, el RAC mostró actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Salmonella* Tiphymurium, *Listeria monocytogenes* y *Penicillium expansum*. Estos resultados indican una suspensión filmogénica estable que conduce a una película que ejerce una buena actividad antimicrobiana y que exhibe buenas propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua. El queso fresco con recubrimiento (QR) mostró una pérdida de humedad de hasta 2.1±0.5 % respecto al control, sin diferencia significativa en los valores de pH y acidez entre tratamientos y control. Se produjeron 0.12±0.01 µg/g de nisina en los quesos conteniendo las microcápsulas de *L. lactis* (QM) y con microcápsulas y recubierto (QRM). La población de mohos y levaduras fue hasta 10 veces menor en el queso con RAC que en el control. Se observó un efecto bacteriostático contra *L. monocytogenes* hasta el cuarto día en refrigeración para los tratamientos QM y QRM, desapareciendo este efecto a tiempos más largos, siendo QM el único que mostró diferencia significativa respecto al control hasta los 30 d. Se concluye que el uso de los tratamientos diseñados puede ser útil para la industria productora de queso fresco ya que su presencia aumentó la vida útil del queso fresco almacenado en refrigeración, en al menos 5 d, comparado con el control.

Palabras clave: bioconservación, queso fresco, *Lactococcus lactis*, recubrimiento activo comestible.

ABSTRACT

Fresh cheese is the most widely consumed in Mexico and Latin America, as well as the most popular Hispanic-style cheese consumed in the United States. It has a high moisture content and is susceptible to physicochemical and microbiological deterioration, which gives it a short shelf life even under refrigerated conditions. The aim of this work was to microencapsulate the nisin-producing strain *Lactococcus lactis* UQ2, its incorporation into the matrix of fresh cheese and to use an edible active coating (RAC) to increase the shelf life of fresh cheese, keeping its quality and safety. *L. lactis* UQ2 was cultured in a bioreactor using supplemented whey at 30 ° C and pH of 6.5 for 7 h. The RAC was based on chitosan and sodium caseinate in a ratio of 8: 1 (w / w), respectively, incorporating lauric arginate and natamycin as natural antimicrobial agents. The mechanical and antimicrobial properties, as well as water vapor permeability (WVP), of the filmogenic suspensions were evaluated. In fresh cheese, a 2² factorial design was conducted with the RAC and microencapsulated *L. lactis* UQ2 as factors, at two levels (presence and absence), the response variables being color, weight loss, pH, acidity, and microbiological analysis storing at 4 ° C for 30 days, as well as an antimicrobial challenge against *L. monocytogenes*. The *L. lactis* UQ2 population was 9.8 ± 1.0 Log CFU / mL in the bioreactor and the cells were microencapsulated by spray drying. A viability of 12.6 ± 0.1 Log CFU/g corresponding to $90.2 \pm 8.7\%$ of encapsulation efficiency was obtained. The RAC was transparent and colorless, with solubility of $38.9 \pm 2.1\%$, permeability to water vapor of $2.2 \times 10^{-5} \pm 0.2 \times 10^{-5}$ g/[day * m * Pa] and potential ζ of 26.4 ± 1.5 mV. Among the mechanical properties, the elongation was $64.2 \pm 5.3\%$, the Young's modulus of 2240.9 ± 237.6 MPa and the tensile strength of 130.3 ± 1.1 MPa. Furthermore, RAC showed antimicrobial activity in vitro against *Salmonella* Tiphymurium, *Listeria monocytogenes* and *Penicillium expansum*. These results show a stable filmogenic suspension leading to a film that exerts good antimicrobial activity and shows good mechanical and water vapor barrier properties. The fresh cheese with coating (QR) showed a moisture loss of up to $2.1 \pm 0.5\%$ compared to the control, without significant difference in the pH and acidity values between treatments and control. 0.12 ± 0.01 µg / g of nisin were produced in both cheeses, having *L. lactis* microcapsules (QM) and 5.0 ± 0.6 µg / g in microencapsulated and coated cheese (QRM). The mold and yeast population were up to 10 times lower in the RAC cheese than in the control. A bacteriostatic effect against *L. monocytogenes* was seen up to the fourth day in refrigeration for the QM and QRM treatments, this effect disappearing at longer times, with QM being the only one that showed a significant difference compared to the control up to 30 d. It is concluded that the use of the designed treatments can be useful for the fresh cheese production industry since their presence increased the shelf life of fresh cheese stored in refrigeration by at least 5 d, compared to the control.

Key words: biopreservation, fresh cheese, *Lactococcus lactis*, edible active coating.

Nota de no plagio, declaración del estudiante.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DEL ESTUDIANTE: Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

IBQ Mayra Maya Plaza

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
RESUMEN.....	I
Nota de no plagio.....	III
ÍNDICE GENERAL	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Queso.....	2
2.2 Bioconservación	4
2.3 Bacterias ácido-lácticas.....	5
2.3.1 <i>Lactococcus lactis</i>	6
2.4 Bacteriocinas de bacterias ácido-lácticas.....	7
2.5 Microencapsulación.....	10
2.6 Secado por aspersión.....	11
2.7 Recubrimientos comestibles.....	13
2.7.1 Caseinato de sodio	15
2.7.2 Quitosano	17
2.7.3 Agentes plastificantes	18
2.8 Recubrimientos activos	18
2.8.1 Natamicina.....	19

2.8.2 Arginato laúrico	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. OBJETIVOS.....	24
4.1 Objetivo general	24
4.2 Objetivos específicos.....	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
5.1 Material biológico.....	25
5.1.1 Cepas microbianas.	25
5.1.2 Enzima coagulante y antimicrobianos.....	25
5.2 Materiales	25
5.3 Medios de cultivo.....	26
5.4 Elaboración y caracterización de microcápsulas	29
5.4.1 Cultivo de <i>Lactococcus lactis</i> UQ2 a nivel biorreactor	29
5.4.2 Determinación de población de <i>L. lactis</i> UQ2 y actividad de nisina en suero.....	30
5.4.3 Microencapsulación de <i>L. lactis</i> UQ2.....	31
5.4.4 Viabilidad del microencápsulado de <i>L. lactis</i> UQ2.....	32
5.4.5 Microestructura de las microcápsulas de <i>L. lactis</i> UQ2	32
5.5 Elaboración y caracterización de las películas activas	32
5.5.1 Potencial ζ	33
5.5.2 Espesor.....	33
5.5.3 Propiedades ópticas	33
5.5.4 Propiedades mecánicas.....	35
5.5.5 Permeabilidad al vapor de agua y solubilidad.....	35
5.5.7 Estructura de las películas.....	36

5.5.8 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)	37
5.5.9 Actividad antimicrobiana	37
5.6 Elaboración de queso Fresco con la incorporación de microcápsulas de <i>L. lactis</i> UQ2	37
5.7 Aplicación del recubrimiento comestible	38
5.8 Evaluación de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en queso.	39
5.8.1 Evaluación de pérdida de peso y de color	39
5.8.2 Determinación de grasa butírica y proteína	39
5.8.3 Determinación del pH y de la acidez titulable	40
5.8.4 Determinación de Coliformes fecales	40
5.8.5 Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i>	40
5.8.6 Determinación de hongos y levaduras	41
5.8.7 Determinación de población de <i>L. lactis</i> UQ2 y actividad de nisina en queso	41
5.8.8 Determinación de <i>Salmonella</i> sp.	42
5.8.9 Determinación de <i>Listeria monocytogenes</i>	42
5.9 Análisis sensorial del queso tipo fresco adicionado con <i>L. lactis</i> UQ2 y recubierto	43
5.10 Diseño experimental	44
5.11 Análisis estadístico	45
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
6.1 Cultivo a nivel biorreactor de <i>L. lactis</i> UQ2.....	46
6.2 Microencapsulación de <i>L. lactis</i> UQ2 mediante secado por aspersión.....	48
6.3 Viabilidad de <i>L. lactis</i> UQ2 microencapsulado a través del tiempo	50
6.4 Microestructura de las microcápsulas de <i>L. lactis</i> UQ2	51

6.5 Elaboración y caracterización del recubrimiento activo	54
6.5.1 Potencial ζ	54
6.5.2 Propiedades ópticas	55
6.5.3 Propiedades mecánicas.....	57
6.5.4 Permeabilidad al vapor de agua (PVA).....	59
6.5.5 Solubilidad	61
6.5.6 Estructura de las películas comestibles	63
6.5.7 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).....	66
6.5.8 Actividad antimicrobiana	68
6.6 Bioconservación de queso fresco.....	70
6.6.1 Pérdida de peso.....	71
6.6.2 Color	73
6.6.3 Grasa y proteína	75
6.6.4 pH y acidez láctica	75
6.6.5 Microbiología del queso fresco	76
6.6.6 Análisis sensorial de queso fresco.....	83
8. CONCLUSIONES	86
9. BIBLIOGRAFÍA.....	87
ANEXOS.....	i
1. Formato de evaluación sensorial de queso fresco	i
2. Consentimiento informado.....	iii
3. Curva de calibración de nisina.....	ix
4. Imágenes de actividad antimicrobiana de las películas comestibles.	x

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.	Página
1. Estructura de la nisina (Chatterjee et al., 2005).	9
2. Modo de acción de la nisina (Breukink y de Kruijff, 2006).	10
3. Proceso de secado por aspersión (Adaptada de Martín et al., 2015)	12
4. Estructura del quitosano (adaptado de Porta et al., 2011).	17
5. Estructura de la natamicina (Yusuf, 2018).	20
6. Síntesis de arginato láurico (Adaptado de Infante et al., 1984).	22
7. Cinética de crecimiento en biorreactor de <i>L. lactis</i> UQ2 utilizando suero de leche como medio alternativo.	46
8. Cinética de crecimiento de <i>L. lactis</i> UQ2 en biorreactor.	47
9. Actividad de nisina obtenida por la fermentación de suero de leche por <i>L. lactis</i> UQ2 en biorreactor.	48
10. Viabilidad celular de las microcápsulas de <i>L. lactis</i> UQ2 a través del tiempo almacenadas a -70 °C.	50
11. Micrografías de las microcápsulas de <i>L. lactis</i> UQ2, almacenadas a -70 °C.	53
12. Películas comestibles obtenidas con distintos tratamientos.	56
13. Permeabilidad al vapor de agua de las películas.	60
14. Porcentaje de solubilidad de las películas en agua.	62
15. Microestructura de las películas.	64
16. Gráfico en 3D obtenido por AFM de las películas.	65
17. Espectros espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) de películas comestibles.	66
18. Evaluación de queso fresco al día 30 de almacenamiento en refrigeración.	71
19. Porcentaje de pérdida de peso de los quesos almacenados en refrigeración a través del tiempo.	72
20. Contenido de acidez titulable (% ácido láctico) y pH en queso fresco a través del tiempo en almacenamiento bajo condiciones de refrigeración.	76

- 21.** Población de mohos y levaduras presente en queso fresco a los 30 d de almacenamiento en condiciones de refrigeración. 78
- 22.** Población de *L. lactis* UQ2 (-) y producción de nisina in situ (--) en queso fresco. 79
- 23.** Reto antimicrobiano de inhibición in situ de los tratamientos contra *L. monocytogenes* en queso fresco almacenados en refrigeración. 81
- 24.** Evaluación sensorial de queso fresco posterior a 5 d de almacenamiento en condiciones de refrigeración. 84
- 25.** Agrupamiento sensorial de queso por Flash Profiling 85

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.	Página
1. Beneficios y posibles usos para materiales de empaque elaborados con biopolímeros naturales (Adaptada de Rhim & Ng., 2007).	14
2. Diseño experimental	44
3. Viabilidad, eficiencia y rendimiento de encapsulación de <i>L. lactis</i> UQ2 durante el proceso de secado por aspersion utilizando un volumen de 200 mL con 15 % de sólidos totales.	49
4. Caracterización de la solución filmogénica.	55
5. Propiedades ópticas de las películas.	57
6. Propiedades mecánicas de las películas.	58
7. Parámetros de rugosidad de las películas de CS:QT con y sin adición de antimicrobianos	65
8. Diámetros de inhibición correspondientes a la actividad antimicrobiana de las películas de biopolímeros realizadas en este trabajo y su mezcla con agentes antimicrobianos.	69
9. Cambios en parámetros de color (L^* , a^* , b^*) de superficie de queso fresco.	74
10. Contenido de grasa y proteína de queso fresco.	75
11. Microbiología de queso fresco durante almacenamiento por 30 d a 4 °C.	77
12. Inhibición de <i>L. monocytogenes</i> en queso fresco.	83

1. INTRODUCCIÓN

Dentro de los quesos, el tipo fresco es el más popular y consumido en México y América Latina. En el año 2019 la industria de quesos en México produjo 476 927 toneladas con un valor en el mercado de 18 mil 916 millones de pesos, siendo el queso fresco el de mayor participación con un 16 % (SIAP, 2019).

Al ser el queso fresco un producto lácteo versátil rico en nutrientes y con alto contenido de humedad y grasa es susceptible al deterioro microbiológico y contaminación por patógenos por lo que la aplicación de tecnologías que puedan garantizar su calidad e inocuidad se vuelven prioridad.

Dentro de estas tecnologías, el desarrollo de recubrimientos comestibles activos con base en mezclas de proteínas y polisacáridos adicionadas con distintos agentes antimicrobianos, además de ser una excelente barrera antimicrobiana son amigables con el medio ambiente. Por otro lado, la bioconservación con base en microorganismos productores de bacteriocinas como la nisina producida por cepas de *Lactococcus lactis* han sido utilizados de manera individual en distintos tipos de queso, más no en queso fresco.

Por lo que el presente trabajo pretende aplicar un sistema combinado: la bioconservación utilizando la cepa productora de nisina *Lactococcus lactis* UQ2 microencapsulada dentro de la matriz de queso fresco y utilizar un recubrimiento comestible activo con base en caseinato de sodio y quitosano adicionado con natamicina y arginato laúrico como agentes antimicrobianos para evitar el deterioro del queso fresco a causa de la pérdida de humedad y la proliferación microbiana que a su vez promueve la contaminación de patógenos, con lo cual se podrá alargar la vida de anaquel de este tipo de queso.

2. ANTECEDENTES

Los alimentos son productos vitales para la supervivencia de los seres humanos y con el paso del tiempo las preocupaciones de los consumidores en cuanto a su calidad están aumentando (Hassan et al., 2018). Esto lleva a los investigadores a buscar nuevas tecnologías que contribuyan a mantener las características de calidad e inocuidad en los alimentos sin afectar al medio ambiente.

2.1 Queso

Queso es el nombre genérico de un grupo de productos alimenticios a base del cuajado de la leche, producidos en todo el mundo en una gran diversidad de sabores, texturas y formas (Fox et al., 2017). Sandine y Elliker (1970) sugieren que hay más de 1000 variedades de queso.

La norma mexicana NOM-121-SSA1-1994, define al queso como un producto elaborado con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales. Además, se han clasificado diferentes variedades de quesos de acuerdo con su proceso: fresco, madurado o procesado.

De la misma norma se obtiene que los quesos frescos son productos que cumplen en lo general con lo señalado en el punto anterior y se caracterizan por ser productos de alto contenido de humedad, sabor suave y no tener corteza, pudiendo o no adicionarle ingredientes opcionales y tener un periodo de vida de anaquel corto, requiriendo condiciones de refrigeración.

Listeria monocytogenes es un patógeno bacteriano transmitido por alimentos. Produce una infección, listeriosis, que puede causar desde gastroenteritis leve en personas inmunocompetentes hasta enfermedades invasivas en grupos de alto riesgo, incluidos ancianos, niños, personas inmunocomprometidas y mujeres embarazadas (Ferreira et al., 2014). Se estima que alrededor de 1600 personas al año sufren de listeriosis y 260 de ellas muere. Actualmente, los brotes de *L. monocytogenes* a menudo están relacionados con productos lácteos como quesos suaves, entre ellos el queso fresco (CDC, 2019).

Handerson et al., (2020) evaluaron los efectos de la temperatura y el pH sobre un tratamiento de nisina contra *Listeria monocytogenes* en una matriz de queso fresco. Sus datos sugieren que las estrategias de control basadas en el uso de nisina pueden ser efectivas cuando el queso es formulado a un pH neutro y almacenado a bajas temperaturas (6°C).

En el año 2019 la industria de quesos en México produjo 476,927 toneladas con un valor en el mercado de 25,553 millones de pesos, siendo el queso fresco el de mayor participación con un 18.8 %; estos datos son congruentes con los datos del año 2018 para industria de quesos que produjo 418,650 toneladas con un valor en el mercado de 21,930 millones de pesos encontrándose el queso fresco como el más consumido y con mayor valor en el mercado con una participación del 19 % y 17 % respectivamente (SIAP, 2020).

El queso es un producto lácteo versátil rico en nutrientes y susceptible al deterioro físico, químico y bioquímico. Como un producto lácteo rico en nutrientes, el queso es una buena fuente de proteínas y minerales, particularmente calcio y fósforo. Por lo tanto, la extensión de la vida útil de este producto lácteo es de suma importancia (Jalilzadeh et al., 2015). La adición de agentes antimicrobianos en queso se basa en varios criterios que incluyen no solo la efectividad, sino también el costo y el impacto en los atributos sensoriales (Lourenço et al., 2017).

Entre las alternativas de las tecnologías de conservación de alimentos, entre ellos el queso, se ha puesto particular atención a la bioconservación para extender la vida de anaquel y para mejorar la calidad microbiológica, minimizando el impacto en las propiedades nutricionales y organolépticas de los alimentos (Patiño, 2014).

2.2 Bioconservación

La conservación de alimentos se define como los procesos o técnicas llevados a cabo para mantener controlados los factores internos y externos que pueden causar el deterioro de los alimentos. Su objetivo principal es aumentar su vida útil conservando los valores nutricionales originales, el color, la textura y el sabor (Amit et al., 2017).

La bioconservación es una herramienta, poderosa y natural, para extender la vida útil y mejorar la seguridad de los alimentos mediante la aplicación de microorganismos y/o sus compuestos antibacterianos en ciertas cantidades (Ghanbari et al., 2013).

Lücke (2014), describe que el interés en la bioconservación se desencadena por los siguientes factores:

- Mayor conciencia de las autoridades reguladoras y los consumidores sobre la importancia de la seguridad alimentaria.
- Mayor reconocimiento de la responsabilidad de la industria alimentaria para garantizar la seguridad de sus productos.
- Aumento en el número de individuos en la población, especialmente en países industrializados, y por lo tanto la necesidad de estándares de higiene más estrictos.
- La necesidad de una mayor estabilidad en la calidad de los alimentos para evitar la pérdida de alimentos debido al deterioro.

- La demanda de los consumidores de mayor comodidad, por ejemplo, compras menos frecuentes, mientras se esperan alimentos "frescos" y "naturales" sin aditivos químicos. Por lo tanto, los minoristas instan a sus proveedores a extender su vida útil y a recortar la lista de aditivos en la etiqueta ("etiquetado limpio").

Las bacterias ácido-lácticas poseen un gran potencial para su uso en la bioconservación porque la mayoría son generalmente reconocidas como seguras y dominan naturalmente la microflora de muchos alimentos (Ghanbari et al., 2013).

2.3 Bacterias ácido-lácticas

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) están compuestas por géneros heterogéneos que consisten en varias especies. En general, se caracterizan por ser bacterias Gram-positivas, catalasa negativas, no formar esporas, carecer de citocromos, gelatinasa negativas, bencidina negativa, incapaces de reducir el nitrato y no utilizan lactato. Son microorganismos anaeróbicos o microaerófilos, mientras que algunos son aeróbicos o anaerobios facultativos (Sharma et al., 2020)

Las BAL se han aplicado como cultivo iniciador y microbiota competitiva en productos lácteos durante siglos. Debido a sus propiedades metabólicas, las BAL generalmente se emplean debido a su contribución esencial al sabor, textura y valor nutricional en los productos alimenticios, además de sus propiedades antimicrobianas naturales que extienden la vida útil del producto. Con frecuencia, los roles funcionales de BAL en las fermentaciones de leche están relacionados con muchos efectos beneficiosos (Favaro et al., 2015):

- Pueden usarse para bioconservar el producto debido a la fermentación y la reducción del pH, dando como resultado una mayor vida útil y una mayor seguridad alimentaria.

- Producen ácidos orgánicos, compuestos de carbonilo e hidrólisis parcial de las proteínas y/o grasas mejorando la calidad sensorial del producto.
- La proliferación de BAL en el queso a menudo se acompaña de la producción de compuestos de textura, como los exopolisacáridos, que mejoran las propiedades reológicas de los productos lácteos fermentados.
- Las cepas BAL pueden producir compuestos antimicrobianos, como las bacteriocinas con aplicación en la conservación de alimentos y diversos compuestos que promueven la salud, como vitaminas, antioxidantes y péptidos bioactivos.
- Pueden actuar como microorganismos probióticos que contribuyen con propiedades terapéuticas y organolépticas a las leches fermentadas.

En una amplia variedad de quesos, las BAL contribuyen al sabor a través de su metabolismo, y cuando experimentan lisis, liberan material intracelular que incluye enzimas como peptidasas y lipasas a la matriz del queso (Patiño et al., 2014).

Las propiedades antagonistas e inhibitorias de BAL se deben a diferentes factores, como la competencia por los nutrientes y la producción de uno o más metabolitos antimicrobianos activos como los ácidos orgánicos (predominantemente ácido láctico y acético), peróxido de hidrógeno y péptidos antimicrobianos. Algunas cepas de BAL, como *Lactococcus lactis*, son productoras de bacteriocinas. Las bacteriocinas permiten la posibilidad de manipular el ecosistema microbiano de un producto alimenticio, protegerlo de la contaminación o prevenir el crecimiento de bacterias patógenas específicas (González-Toledo, 2010).

2.3.1 *Lactococcus lactis*

Originario del género *Streptococcus* y reclasificado en el género *Lactococcus* en 1985, *L. lactis* se divide en tres subespecies, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* y *L. lactis* subsp. *hordniae*. Fenotípicamente, se clasifica como una bacteria intestinal Gram-positiva, esférica, homoláctica, no esporulada y anaeróbica

facultativa, con cientos de cepas y biovariantes publicadas hasta la fecha (Song et al., 2017).

Las cepas de *Lactococcus lactis* son las principales BAL que constituyen los cultivos iniciadores utilizados en la industria láctea para la manufactura y maduración de quesos (Alegría et al., 2010). *L. lactis* se encuentra en una amplia variedad de ambientes de plantas y animales y está presente en la leche cruda de diferentes especies animales, incluidas las vacas, ovejas y cabras. También se puede encontrar en nichos de plantas, como pastos y ensilajes, por lo cual es muy común su presencia en el microbiota de la leche cruda y sus productos, como los quesos (Freitas Martins et al., 2020).

L. lactis es una BAL con propiedades bioconservadoras, ya que algunas cepas son capaces de producir bacteriocinas, entre las cuales la nisina es la más notoria y ampliamente usada en la industria alimentaria. Además, es la única bacteriocina que ha sido reconocida generalmente como segura (GRAS) por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA 1988) y más de 50 países entre ellos México (González-Toledo, 2010). *Lactococcus lactis* UQ2, es una cepa aislada de un queso mexicano, capaz de producir una bacteriocina genéticamente identificada como nisina A (García-Almendárez et al., 2008).

2.4 Bacteriocinas de bacterias ácido-lácticas

Las bacteriocinas son péptidos sintetizados a nivel ribosomal con actividad dirigida contra bacterias relacionadas taxonómicamente (Gram-positivas) mientras que las células productoras son inmunes a sus propias bacteriocinas (Collins et al., 2009). Este término se usa principalmente para describir los péptidos catiónicos pequeños, que exhiben un amplio espectro de efectos inhibitorios hacia varios aislados bacterianos patógenos (Grumezescu & Holban, 2018).

Las bacteriocinas se sintetizan durante la fase primaria de crecimiento, generalmente tienen bajo peso molecular (rara vez más de 10 kDa), se someten a modificaciones postraduccionales y pueden degradarse por enzimas proteolíticas, especialmente por las proteasas del tracto gastrointestinal de los mamíferos, lo que las hace seguras para el consumo humano. Las bacteriocinas son en general moléculas catiónicas, anfipáticas, ya que contienen un exceso de residuos de lisina y arginina (Zacharof & Lovitt, 2012).

Las bacteriocinas se agrupan en cuatro clases principales: Clase I o lantibióticos; Clase II, péptidos no modificados; Clase III, grandes proteínas termolábiles; Clase IV, péptidos complejos. Las bacteriocinas de clase I, o lantibióticos, incorporan péptidos modificados postraduccionamente caracterizados por anillos intramoleculares basados en tioéter de lantionina y β -metilantionina dentro de esta clase podemos encontrar a la nisina (Grumezescu & Holban, 2018).

2.4.1 Nisina

La nisina (Figura 1) es una bacteriocina ampliamente utilizada como conservador de alimentos, en particular en el queso (Jalilzadeh, 2015). Es un péptido antibacteriano con 5 anillos tioéter sintetizados por un operón de la bacteria *Lactococcus lactis* ssp *lactis*. Contiene 34 residuos de aminoácidos, incluidos los aminoácidos poco comunes como lantionina, beta-metilantionina, deshidroalanina y ácido deshidroaminobutírico, por lo cual se le conoce como lantibiótico (Yusuf, 2018).

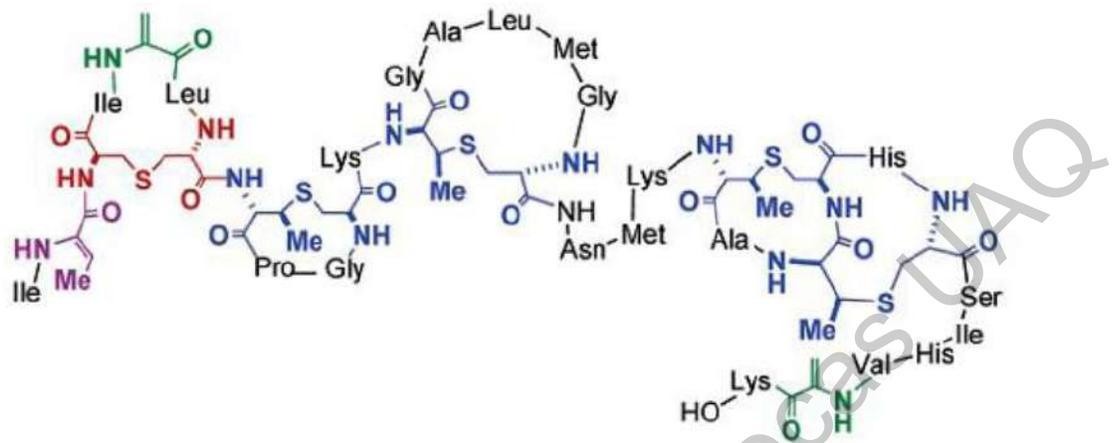


Figura 1. Estructura de la nisina (Chatterjee et al., 2005).

La nisina ha demostrado ser eficaz contra una amplia gama de bacterias Gram-positivas, incluidos muchos patógenos importantes transmitidos por los alimentos, como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Clostridium botulinum*. Además, inhibe el crecimiento de esporas de varias especies de *Bacillus* y *Clostridium*. Sin embargo, muestra poca o ninguna actividad contra las bacterias Gram-negativas (Karam et al., 2013).

En uno de sus mecanismos de acción, la nisina se une al lípido II, una molécula precursora en la síntesis de la pared celular, evitando así la síntesis del componente peptidoglicano de la pared celular. Mientras que el segundo mecanismo de acción depende del enlazamiento al precursor del peptidoglicano, el lípido II, con la consecuente formación de poros híbridos, compuesto de ocho moléculas de nisina y cuatro de lípido II (Figura 2), lo cual causa pérdida de pequeños componentes citoplasmáticos como aminoácidos y ATP ocasionando pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana provocando la disrupción de la fuerza protón motriz (PMF) causando muerte celular (Moll et al., 1999; Breukink y de Kruijff, 2006, Lubelski et al., 2008).

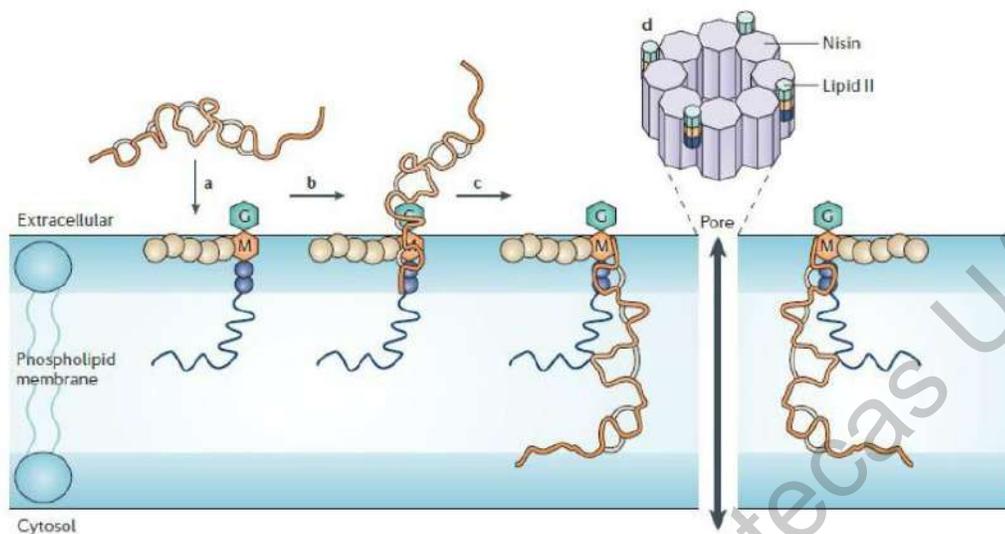


Figura 2. Modo de acción de la nisina (Breukink y de Kruijff, 2006).

La NOM-121-SSA1-1994 establece el límite máximo permitido de nisina en quesos en 12.5 mg/kg (0.00125% en peso). A pesar del gran uso de nisina en la industria alimentaria, se ha demostrado una pérdida de eficacia antimicrobiana cuando se incorpora en matrices alimentarias. Su ineficacia en los productos alimenticios se ha atribuido a una baja solubilidad, altas cargas bacterianas, interacción con fosfolípidos y distribución no homogénea en todo el producto, por lo cual la encapsulación del microorganismo y producción *in situ* de la nisina es una tecnología prometedora (Maresca et al., 2016).

2.5 Microencapsulación

La microencapsulación implica el atrapamiento de un metabolito en el interior de un material polimérico para generar microesferas en el rango de tamaño de 1–1000 μm . Esta es una tecnología versátil que se ha utilizado para encapsular una amplia gama de productos como farmacéuticos, sabores, aceites volátiles, extractos de plantas, enzimas y otros (Rathore et al., 2013).

La microencapsulación permite proteger el ingrediente activo del ambiente externo, enmascarar sabores no deseados, así como una posible liberación controlada de compuestos (Paulo & Santos, 2017). Además, no presenta efectos negativos en la apariencia de los quesos. Entre los agentes encapsulantes que se utilizan destacan las proteínas aisladas de suero de leche utilizadas como cobertura en secado de aspersión (Patiño, 2014).

En las últimas décadas, esta tecnología también se ha aplicado al área de la inmovilización de células microbianas dentro de una matriz polimérica semipermeable, manteniendo la viabilidad microbiana dentro de un microambiente interno hospitalario (Rathore et al., 2013). Salazar-Montoya et al. (2018), evaluaron el efecto de la microencapsulación de *L. lactis* sobre la composición y las propiedades reológicas del queso manchego durante su almacenamiento por 60 d, observando que la microencapsulación tuvo una mayor influencia que el período de maduración ya que las discrepancias con el queso control fueron significativas ($p < 0.05$) en cuanto a los niveles de proteína, humedad, sólidos totales y pH, tanto al comienzo como al final de la maduración.

2.6 Secado por aspersión

El secado por aspersión es ampliamente usado en la industria alimenticia como un método para microencapsular debido a que es económico y efectivo en la protección de materiales como sabores, vitaminas, aceites esenciales, colorantes y lípidos (Patiño, 2014; González-Toledo, 2010).

El consumo de energía del secado por aspersión es de 6 a 10 veces menor en comparación con la liofilización y produce un producto de buena calidad. El proceso implica la dispersión del material que estará en el centro de la microcápsula, formando una emulsión, seguido de la homogeneización de la emulsión y luego la atomización de la mezcla en la cámara de secado (Figura 3) para la evaporación del

disolvente. En esta técnica se debe controlar la alimentación del producto, el flujo de aire y la temperatura (Martín, et al., 2015).

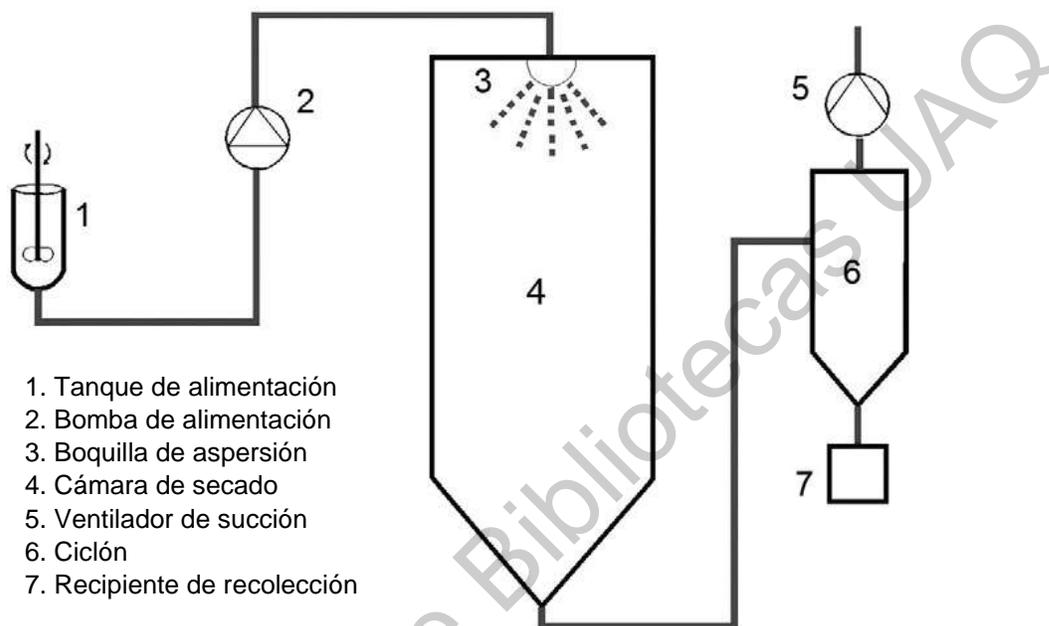


Figura 3. Proceso de secado por aspersión (Adaptada de Martín et al., 2015)

La solución o dispersión, se atomiza para formar microgotas que entran en contacto con el aire caliente, causando una rápida evaporación del disolvente y formación de microcápsulas (Castro-Rosas et al., 2017).

La ventaja del proceso es que se puede operar de forma continua mientras que la alta temperatura utilizada puede no ser adecuada para encapsular cultivos bacterianos y que el número de materiales encapsulantes disponibles es limitado. La supervivencia celular depende principalmente de las temperaturas de salida. El daño por calor de la membrana celular es uno de los daños que más ocurren durante el secado por aspersión ya que las altas temperaturas durante el proceso hacen que por los poros celulares se pierdan las sustancias intracelulares (Martín et al., 2015).

Los procesos de secado por aspersión en la industria alimentaria se llevan a cabo a partir de formulaciones acuosas, el material de pared debe ser soluble en agua a un nivel aceptable. Los materiales de pared típicos incluyen goma arábica, maltodextrinas, almidón modificado para aumentar su hidrofobicidad y sus mezclas (Gouin, 2004).

2.7 Recubrimientos comestibles

Los recubrimientos comestibles se han utilizado en China desde el siglo XII y desde principios hasta mediados del siglo XX se han utilizado para evitar la pérdida de agua y agregar brillo a las frutas y verduras; las películas y recubrimientos comestibles forman una barrera para los cambios químicos, corporales y biológicos (Rhim & Ng, 2007).

Son capas delgadas que se aplican sobre productos alimenticios para protegerlos y mejorar su calidad. Se preparan a partir de fuentes renovables naturales (polisacáridos, proteínas, lípidos y combinaciones de éstos) que podemos comer sin removerlos, siendo amigables con el ambiente (Krochta, 2002). Son importante para la conservación, distribución y mercadotecnia de los alimentos (Falguera et al., 2011) y pueden formar una barrera contra la humedad, el oxígeno, la luz ultravioleta y el movimiento de solutos en los alimentos (Kurek et al., 2017).

Pueden actuar como portadores de agentes antimicrobianos y mejorar la difusión y solubilidad, respecto a los recubrimientos convencionales (Ramos et al., 2012). Las ventajas de los recubrimientos a base de biopolímeros naturales sobre los materiales plásticos tradicionales se resumen en la Tabla 1. Aunque muchas funciones de las películas comestibles son idénticas a las de las películas de plástico, su uso requiere estrictamente un sobreenvasado por razones de manipulación e higiene (Debeaufort *et al*, 1998).

Tabla 1. Beneficios y posibles usos para materiales de empaque elaborados con biopolímeros naturales (Adaptada de Rhim & Ng., 2007).

-
- Comestibles y biodegradables
 - Mejoran las características organolépticas de los alimentos, como apariencia, olor y sabor; además de complementar su valor nutricional
 - Reducen el volumen, peso y desperdicio del empaque
 - Incorporan y funcionan como acarreadores de agentes antimicrobianos y antioxidantes microencapsulados, pudiendo mostrar una liberación controlada de estas sustancias activas.
 - Mayor vida útil y mejor calidad de productos generalmente no empacados
 - Control sobre la migración de humedad, gases, lípidos y solutos entre capas del alimento
 - Envasado individual de alimentos pequeños en particular, como nueces y pasas
 - Recursos renovables, de bajo costo y abundantes
-

Los materiales de película y recubrimientos deben seleccionarse de acuerdo con el tipo de queso (contenido de humedad, maduro o fresco) y las condiciones de almacenamiento (temperatura y humedad relativa) (Costa et al., 2018).

Las películas comestibles con biopolímeros se han formulado a partir de varias fuentes de proteína vegetal como la zeína de maíz, gluten de trigo, soya, proteína de chícharo, frijol, quinua y cacahuate. Las principales proteínas de origen animal que se han usado son el colágeno, la gelatina, la proteína miofibrilar de pescado, la queratina, la clara de huevo, la caseína y la proteína de suero (Chevalier et al., 2018). Los biopolímeros a base de carbohidratos más comúnmente usados son almidón

nativo, almidón ceroso, quitosano e hidrocoloides como goma guar, algarrobo, alginato, etc. Los plastificantes y otros aditivos se combinan con los biopolímeros formadores de película para modificar las propiedades físicas u otra funcionalidad de las películas comestibles (Jalilzadeh et al., 2015).

Las proteínas generalmente se pueden encontrar como fibrosas o globulares; las proteínas fibrosas se asocian intensamente entre sí a través de puentes de hidrógeno para obtener fibras. En las proteínas globulares, los enlaces iónicos, covalentes y puentes de hidrógeno están presentes y se pliegan en estructuras complejas (Scopes, 1994).

Las películas de proteínas se forman a través de la desnaturalización parcial de las cadenas polipeptídicas mediante la adición de un solvente, la alteración del pH, la adición de un electrolito y/o la aplicación de calor para causar la reticulación. Las películas se forman cuando las cadenas peptídicas parcialmente desnaturalizadas se unen principalmente a través de enlaces hidrófilos y puentes de hidrógeno, lo que da como resultado la formación de una matriz proteica (Rhim & Ng, 2007). Las proteínas muestran propiedades útiles para la elaboración de biomateriales de empaque, por ejemplo, su capacidad para formar redes, su plasticidad y elasticidad (Cuq et al., 1998).

2.7.1 Caseinato de sodio

La caseína es la proteína principal extraída de la leche (~80%) que comprende 4 componentes diferentes, α_{S1} -, α_{S2} -, β - y κ -caseína, que juntos en la leche forman micelas coloidales estabilizadas por arreglos de caseína y puentes de fosfato de calcio (Swaisgood, 1993). El método de coagulación de la caseína puede ser a través del uso de la quimosina bovina (cuajo) o bien por acidificación hasta su punto isoeléctrico (pH=4.6), por lo cual se obtienen diferentes tipos de caseína con características específicas (Kinsell & Morr, 1984). La fracción sobrenadante es la

proteína de suero. La caseína también se puede separar de otras proteínas mediante un proceso de membrana, por electroforesis, o por cromatografía, (Kern et al., 2019).

Aunque el caseinato se puede producir en forma de sodio o potasio, el caseinato de sodio (CS) está más disponible comercialmente. El CS se prepara disolviendo la caseína ácida en una solución de hidróxido de sodio hasta lograr un pH neutro, posteriormente se seca por aspersion para obtenerlo en forma de polvo. De acuerdo con los estándares CODEX STAN A-18-1995, el CS debe contener un mínimo de 88.0% de proteína total y 95% de esta proteína debe ser caseína. Sin embargo, los CS comerciales tienen una composición variable y un estado de agregación que depende de sus fuentes, método de fabricación y condiciones de almacenamiento (Abd El-Salam & El-Shibiny, 2020).

El CS presenta propiedades termoplásticas y formadoras de película debido a su naturaleza y su capacidad para formar interacciones intermoleculares débiles, es decir, las cadenas peptídicas parcialmente desnaturalizadas se unen principalmente a través de enlaces hidrófilos y de hidrógeno que dan como resultado la formación de la matriz proteica (Rhim & Ng., 2007).

Las películas basadas en caseinatos muestran propiedades hidrofílicas debido a su gran cantidad de grupos polares que proporcionan excelentes barreras a sustancias no polares como el oxígeno, el dióxido de carbono y los aromas (Audic et al., 2003). Sin embargo, estas películas han mostrado ser una barrera ineficaz contra la humedad (Guilbert et al., 1995) y tener propiedades antimicrobianas limitadas (Ponce et al., 2008; Moreira et al., 2011).

Algunos autores han estudiado los efectos de las variables de procesamiento, como el tipo y contenido de plastificantes, y las condiciones de almacenamiento (humedad relativa y temperatura) sobre las propiedades reológicas, mecánicas, térmicas y funcionales de las películas de caseinato de sodio. Otras publicaciones se han centrado en la adición de diferentes polímeros como el almidón, el aislado de proteína de suero (WPI), el aislado de proteína de soya (SPI), el quitosano (QS) o la

gelatina a las películas de caseinato para mejorar sus propiedades de barrera física y solubilidad (Pereda et al., 2007).

2.7.2 Quitosano

El quitosano es un derivado parcialmente desacetilado de la quitina, que es el segundo biopolímero natural más abundante después de la celulosa, se obtiene como subproducto del procesamiento de camarón y crustáceos. Estructuralmente, el quitosano se compone de unidades de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina unidas por el enlace glucosídico β -1-4 (Figura 4) (Rhim & Ng., 2007).

Debido a que el quitosano es biodegradable, no tóxico, fácilmente biocompatible y tiene actividad antimicrobiana contra mohos, levaduras y algunas bacterias como *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *P. fluorescens* y *E. coli* (Costa et al., 2018); por esta razón se ha estudiado ampliamente para diversas aplicaciones industriales y de empaque (Rabea et al., 2003; Rhim & Ng, 2007). El quitosano se describe en términos del grado de desacetilación, el peso molecular, la viscosidad y la solubilidad, además de una afinidad notable a las proteínas (Priyadarshi et al., 2018).

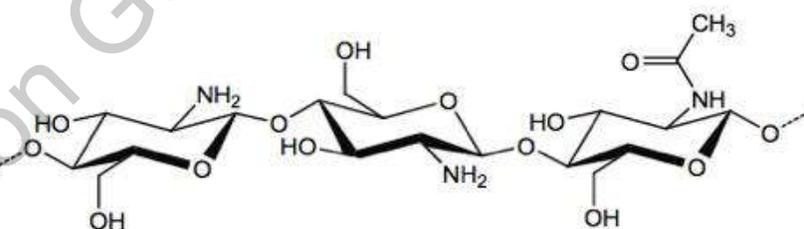


Figura 4. Estructura del quitosano (adaptado de Porta et al., 2011).

Los recubrimientos y películas a base de quitosano se han probado en varios tipos de quesos con el objetivo de disminuir el crecimiento microbiano y, por lo tanto, prolongar su vida útil. También se ha utilizado como portador de otros compuestos con capacidad antimicrobiana (Lotfi et al., 2018). Moreira et al. (2010) evaluaron la

efectividad antimicrobiana de recubrimientos con base en de CS y CH y utilizaron el glicerol como plastificante para obtener películas flexibles que pudieran plegarse y manipularse sin romperse.

2.7.3 Agentes plastificantes

Los plastificantes son compuestos no volátiles de bajo peso molecular que se incrustan en el polímero para reducir su cohesión y fragilidad, impartir flexibilidad y mejorar la tenacidad y las características termoplásticas de los biopolímeros. Los plastificantes debilitan las fuerzas interactivas de cadena a cadena, con un aumento significativo en la movilidad de las cadenas de polímero (Vieira et al., 2011; Han, 2014).

Las películas incorporadas con plastificantes producen estructuras voluminosas debido al espacio suficiente para el movimiento de las moléculas de polímero, lo que da como resultado una reducción en la temperatura de transición vítrea y en el módulo elástico, ablandando así los polímeros (Esposito et al., 2016). Para la formación de recubrimientos comestibles en alimentos, se han usado plastificantes como glicerol, xilitol, sacarosa, etilenglicol y sorbitol (Chaudhary et al., 2020).

2.8 Recubrimientos activos

Los recubrimientos comestibles activos comprenden sistemas de envasado que interactúan con los alimentos de tal manera que incorporan deliberadamente componentes que liberarían o absorberían sustancias en el alimento envasado o en el medio ambiente que lo rodea (Yildirim et al., 2018).

Los recubrimientos a base de biopolímeros con propiedades activas se pueden clasificar en dos grupos (Valencia et al., 2019):

- **Recubrimientos comestibles activos con propiedades antimicrobianas/antioxidantes:** Los recubrimientos comestibles con propiedades antimicrobianas se utilizan para prolongar la fase de retraso del microorganismo, mientras que los que exhiben propiedades antioxidantes se utilizan para controlar el nivel de oxígeno en los alimentos a fin de minimizar la oxidación de lípidos. La suma de estas propiedades resulta en recubrimientos que retrasan el crecimiento microbiano, la decoloración, los cambios de textura y la producción de sabores desagradables y compuestos tóxicos.
- **Recubrimientos comestibles activos con propiedades de eliminación:** Estos recubrimientos comestibles pueden usarse para absorber oxígeno y exceso de dióxido de carbono, así como para suprimir los efectos negativos del etileno en los alimentos.

Los problemas toxicológicos de los aditivos convencionales causan un gran interés en el uso de agentes bioactivos naturales en recubrimientos comestibles. Por lo tanto, aditivos naturales con propiedades antimicrobianas / antioxidantes obtenidas de fuentes vegetales o por metabolismo microbiano como nisina y otras bacteriocinas han sido ampliamente estudiados en películas y recubrimientos aplicados en alimentos (Valencia et al., 2019).

2.8.1 Natamicina

Las superficies de queso pueden ser colonizadas por microorganismos indeseables durante las diferentes etapas de procesamiento, siendo la maduración la más afectada. La demanda de los consumidores ha aumentado el interés en el uso de antimicrobianos naturales como la natamicina y la nisina, así como en los recubrimientos comestibles que ayudan en la conservación de los alimentos (Berti et al., 2019).

hiperpermeabilidad de la membrana, fuga rápida de iones y péptidos esenciales y, en última instancia, lisis celular (Van Long et al. , 2016).

Las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de natamicina para hongos varían de 0.5 a 6 µg/mL, pero algunas especies requieren de 10 a 25 µg/mL, y la mayoría de las levaduras se inhiben en concentraciones de 1 a 5 µg/mL (Van Long et al., 2016). La concentración máxima permitida por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) y las autoridades canadienses es de 20 ppm, mientras que en Europa es de 1 mg/dm² para la superficie del queso (no presente a una profundidad de 5 mm) (Costa et al., 2018).

2.8.2 Arginato láurico

El arginato láurico (LAE, hidrocloreto de etil-N α -lauroil-L-arginato, C₂₀H₄₀N₄O₃·HCl) fue patentado en España en 1983 (García Domínguez et al., 1983). Se aprobó como un conservante antimicrobiano generalmente reconocido como seguro (GRAS) por la FDA en 2005 para su uso a un nivel de hasta 200 mg/kg (ppm) en productos alimenticios como carne, aves, y queso (FDA, 2005).

La estructura molecular de LAE (Figura 6) tiene restos hidrofóbicos e hidrofílicos distintos que confieren propiedades tensoactivas a la molécula. El LAE también tiene una carga positiva que influye tanto en su actividad antimicrobiana como en su capacidad para unirse a los componentes aniónicos de los alimentos que afectan sus propiedades antimicrobianas cuando se aplican en los sistemas alimentarios. Muchos estudios han informado sobre la actividad antimicrobiana de LAE contra diversos microorganismos en medios de crecimiento microbiano y matrices de alimentos cuando se usan solos o en combinación con otros antimicrobianos (Ma et al., 2020).

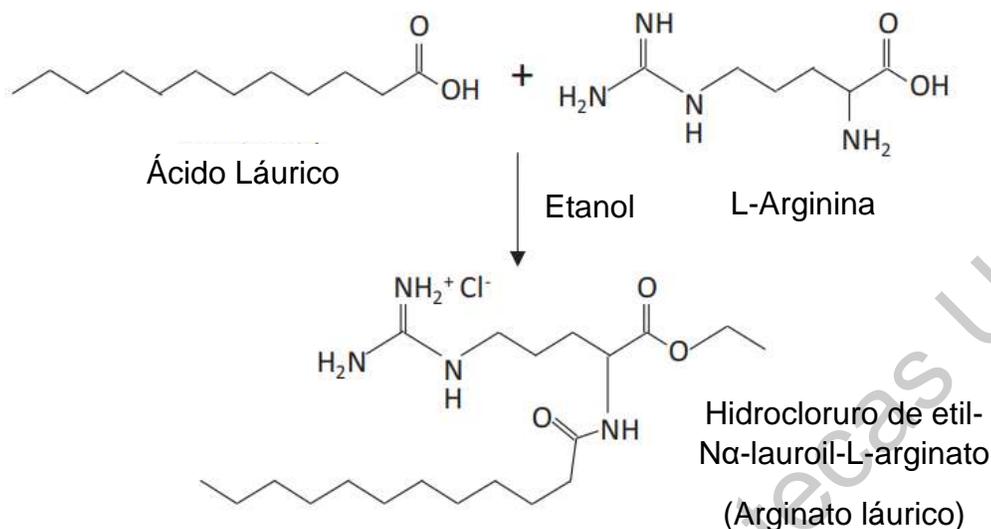


Figura 6. Síntesis de arginato láurico (Adaptado de Infante et al., 1984)

Se ha encontrado que, en medios de cultivo, LAE inhibe un amplio espectro de microorganismos entre los que encontramos a *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* Enteritidis. La actividad antimicrobiana de LAE está directamente asociada con la presencia de carga positiva en su grupo de guanidina protonada. Sin embargo, el mecanismo antimicrobiano de LAE no se ha caracterizado completamente. Estudios actuales sugieren que los mecanismos antimicrobianos principales de LAE incluyen la alteración de las membranas celulares de las bacterias sin causar lisis celular, pero también puede actuar sobre otros objetivos intracelulares que causan la letalidad de las bacterias (Ma et al., 2020).

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, el queso fresco es el tipo de queso más producido en México alcanzando un volumen de producción de 89,557 toneladas en 2019 y una derrama económica de 4 mil 025 millones de pesos en el mismo año ubicándose como el queso con mayor derrama económica en el país. Sin embargo, al ser un alimento rico en nutrientes y con alta actividad de agua, su vida de anaquel es corta aún en condiciones de refrigeración. El queso fresco se ha visto involucrado con brotes de enfermedades provocadas principalmente por *Salmonella* Tiphymurium y *Listeria monocytogenes*. Su importancia económica para el país, su corta vida de anaquel y su alta susceptibilidad a la contaminación microbiológica, tanto por microorganismos deterioradores como patógenos, lo convierten en un producto que necesita el desarrollo de nuevas tecnologías.

Dentro de estas alternativas se plantea el uso de dos tecnologías: la bioconservación que implica el uso de microorganismos y/o sus metabolitos como medio de protección del queso y la utilización de recubrimientos comestibles activos como medio de empaque para garantizar su calidad e inocuidad.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de bioconservación de queso fresco al incorporar *Lactococcus lactis* UQ2 y uso de un recubrimiento activo con base en caseinato, quitosano y antimicrobianos naturales.

4.2 Objetivos específicos

- Cultivar a nivel biorreactor *Lactococcus lactis* UQ2 utilizando suero de leche como medio alternativo.
- Microencapsular *Lactococcus lactis* UQ2 mediante secado por aspersión.
- Elaborar y caracterizar un recubrimiento activo con base en caseinato y quitosano adicionado con natamicina y arginato láurico.
- Evaluar el efecto bioconservador en queso fresco por la incorporación de las microcápsulas de *L. lactis* y del recubrimiento activo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

5.1.1 Cepas microbianas.

Lactococcus lactis UQ2, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Penicillium expansum* y *Micrococcus luteus* NCBI 8166, fueron proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química.

5.1.2 Enzima coagulante y antimicrobianos

Se utilizó cuajo enzimático [Bixa de México, potencia 350 Unidades Internacionales de Coagulación de la Leche (IMCU)/mL] que utiliza proteasa ácida para la coagulación de la caseína de la leche. Se utilizó nisina de *Lactococcus lactis* al 2.5% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) para la elaboración de la curva estándar. Los antimicrobianos a utilizar en la elaboración de la película serán natamicina ultra-pura (Handary, Bruselas, Bélgica) y arginato láurico (Vedeqsa, Barcelona, España).

5.2 Materiales

El caseinato de sodio (CS) con 91.4% (p/p) de proteína, suero lácteo en polvo y el concentrado de proteína de suero de leche (80% en peso de proteína, CPS) se adquirieron de New Zealand Dairy Board (Wellington, Nueva Zelanda). El quitosano (desacetilación $\geq 90\%$) (Chemsavers, Virginia, US), el glicerol, sulfato de magnesio,

sulfato de manganeso, α lactosa y rifampicina (10,000 $\mu\text{g/L}$) se adquirieron de Merck KGaA (Darmstadt, Germany). El fosfato dibásico de sodio, sulfito de bismuto, verde brillante, sacarosa, tiosulfato, azul de bromotimol, púrpura de bromocresol se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania). El Tween 80, Tween 20, alcohol etílico (96% v/v), ácido clorhídrico (36% p/p), cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio anhidro, bicarbonato de sodio, perlas de hidróxido de sodio (reactivo analítico), se obtuvieron de J.T. Baker (Center Valley, PA, EUA). El almidón de maíz modificado con alta capacidad emulsionante se obtuvo de Ingredion (SJR, Querétaro, México).

5.3 Medios de cultivo

Caldo M17: Se pesaron 37.25 g de polvo para caldo M17 (Difco) y se disolvieron en 950 ml de agua destilada, se esterizaron por calor húmedo a 121 °C por 15 min, se enfrió a 50 °C y se agregaron 50 ml de solución de α -lactosa estéril al 10% (p/p).

Agar assay; Para 1000 mL se disolvieron 10 g de peptona bacteriológica (Oxoid), 3 g de extracto de carne (Bioxon), 3 g de cloruro de sodio, 1.5 g de extracto de levadura (Bioxon), 1 g de azúcar mascabado (Dillis, Técnica Mexicana de alimentación, México) y 10 g de agar bacteriológico (Bioxon). Se mezclaron y se ajustaron a un pH final de 7.5 ± 0.2 posteriormente se calentó hasta disolver y se esterilizó en autoclave.

Agar soya tripticaseina: Para 1000 mL de agua destilada se agregaron 40 g del agar soya tripticaseina (Bioxon), el pH se ajustó a 7.3 ± 0.2 y posteriormente se llevó a ebullición por 1 minuto o hasta obtener la disolución total de los sólidos, por último, se esterilizó por 20 min a 121 °C.

Agar Sulfito Bismuto (ABS): Se disolvieron 52 g de agar sulfito bismuto (Bioxon) en 1000 mL de agua destilada estéril, la solución se llevó a ebullición por 1 minuto o hasta obtener la disolución total de los sólidos, el agar se utilizó el mismo día de preparación.

Agar XLD: Se disolvieron 55 g de agar XLD (Bioxon) en 1000 mL de agua destilada estéril, la solución se llevó a ebullición por 1 minuto o hasta obtener la disolución total de los sólidos, el agar se utilizó el mismo día de preparación.

Agar Verde Brillante: Para 1000 mL de agua destilada se agregaron 58 g del agar verde brillante (Bioxon), se llevó a ebullición por 1 minuto o hasta obtener la disolución total de los sólidos y por último se esterilizó por 20 min a 121 °C.

Agar Baird Parker: Para 900 mL de agua destilada se agregaron 63 g del agar base Baird Parker (Bioxon), se llevó a ebullición por 1 minuto o hasta obtener la disolución total de los sólidos y por último se esterilizó por 15 min a 121 °C. Una vez esterilizado se llevó a 50 °C y se le agregaron 10 mL de solución de telurito de potasio al 1% y 50 mL de emulsión de yema de huevo estéril según lo descrito en la NOM-243-SSA1-2010.

Agar lactosa púrpura de bromocresol con rifampicina (PBC): Se disolvieron 5 g de peptona de caseína (Merck), 3 g de extracto de carne (Bioxon), 10 g de lactosa (Merck), 0.04 g de purpura bromocresol (Merck) y 15 g de agar (Bioxon) en 1000 mL de agua destilada. Se esterilizó a 121 °C por 15 min. Se agregaron 200 µg/mL de rifampicina cuando alcanzó una temperatura de 45 °C.

Agar papa dextrosa (PDA): Por cada 1000 mL de agua destilada se colocaron 39 g de agar papa dextrosa (Bioxon), se disolvió con calentamiento y se esterilizó a 121 °C por 15 min. Una vez esterilizado se llevó a 50 °C y se agregaron 14 mL de ácido tartárico al 10 % (p/p) para ajustar pH a 3.5.

Caldo soya tripticaseina: Se pesaron 30 g de caldo soya tripticaseina (Bioxon) por cada 1000 mL de agua destilada, se distribuyó en frascos de vidrio según las necesidades y se esterilizó a 121 °C por 15 min.

Caldo Fraser ½: Se disolvieron 12.9 g de base de caldo Fraser (Oxoid) en 225 mL de agua destilada, se esterilizó en autoclave por 15 min a 121 °C, se llevó a 50 °C y

se le agregó un vial de suplemento selectivo Fraser ½ (SR0166E) (Oxoid) reconstituido en 5 mL de etanol al 50%.

Caldo Fraser: Se disolvieron 28.7 g de base de caldo Fraser (Oxoid) en 500 mL de agua destilada, se esterilizó en autoclave por 15 min a 121 °C, se llevó a 50 °C y se le agregó un vial de suplemento SR0156E, Oxoid, selectivo Fraser, reconstituido en 5 mL de etanol al 50%.

Agar Oxford: Para 500 mL de agua destilada se disolvieron 27.75 g de agar base Oxford (Oxoid), se esterilizó en autoclave por 15 min a 121 °C, se llevó a 50 °C y se le agregó un vial de suplemento SR0206, Oxoid, selectivo de *Listeria* reconstituido en 5 mL de etanol al 70%.

Agua peptonada amortiguada: Para 1000 mL de agua destilada se adicionaron 10 g de peptona de caseína, 5 g de cloruro de sodio, 9 g de fosfato de sodio y 1.5 g de fosfato de potasio, se disolvieron con calentamiento, se distribuyó en frascos de vidrio según las necesidades y se esterilizó en autoclave.

Diluyente de peptona al 0.1 %: Se pesó 1 g de peptona bacteriológica (Bioxon), por cada 1 L de agua destilada, se distribuyó en frascos de vidrio según las necesidades y se esterilizó en autoclave.

Solución Ringer: Se pesarán 9 g de cloruro de sodio, 0.42 g de cloruro de potasio, 0.24 g de cloruro de calcio anhidro, 0.2 g de bicarbonato de sodio. Se aforó a 1 L y se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min.

Caldo Rappaport-Vassiliadis (RVS): Se agregaron 26.6 g de caldo Rappaport-Vassiliadis (Bioxon) por cada 1000 mL de agua destilada, se distribuyó en tubos de 10 mL y se esterilizó a 116 °C durante 15 min.

Caldo de tetrionato (MKTTn): Se agregaron 4.6 g de caldo Rappaport-Vassiliadis (Bioxon) por cada 100 mL de agua destilada, se calentó hasta ebullición y se agregaron 2 mL de solución de yodo-yoduro (6 g de cristales de yodo y 5 g de yoduro

de potasio en 20 mL de agua) y se distribuyó en tubos estériles de 10 mL de manera aséptica.

Caldo lauril triptosa: Se suspendieron 35.6 g de caldo lauril triptosa (Difco) en 1000 mL de agua destilada, se disolvió por calentamiento y se distribuyó en tubos que contenían viales de fermentación invertidos, por último, se esterilizaron a 121 °C por 15 min.

Medio EC: Se suspendieron 37 g de polvo para medio EC (Difco) en 1000 mL de agua destilada, se disolvió por calentamiento y se distribuyó en tubos que contenían viales de fermentación invertidos, por último, se esterilizaron a 121 °C por 15 min.

5.4 Elaboración y caracterización de microcápsulas

5.4.1 Cultivo de *Lactococcus lactis* UQ2 a nivel biorreactor

Para lograr una máxima población de *L. Lactis* UQ2 fue necesario realizar 3 activaciones. Para la primera activación se colocaron las chaquiras provenientes de una conserva a -70°C en un tubo con 10 mL de caldo M17 y se incubó durante 24 h a 30°C. Para la segunda activación, el cultivo se inoculó al 1% (v/v) en 20 mL de caldo M17 y se incubó a 30°C durante 12 h. La tercera activación se realizó en 50 mL de caldo M17 suplementado con soluciones estériles de sulfato de magnesio 0.5 g/L y sulfato de manganeso 0.1 g/L, posteriormente se incubó a 30°C por 8 h. Finalizado el periodo de incubación se tomó una muestra para determinar la población final del cultivo.

De la tercera activación de la cepa en caldo M17, se inocularon (1%, v/v) 20 mL de suero de leche a 14.9 g/L suplementado con soluciones estériles de sulfato de magnesio 0.5 g/L, sulfato de manganeso 0.1 g/L, peptona de soya 13.8 g/L y Tween 20 a 0.02 g/L. Se incubaron a 30°C durante 24 h y este cultivo se utilizó como inóculo (1%, v/v) en 50 mL de otra solución de suero de leche suplementado que se

incubó a 30°C por 10 h, de este último cultivo se tomó un inóculo (1% v/v) que se adicionó a 2 L de medio suplementado y se procedió a realizar la fermentación por 12 h en el biorreactor.

La nisina como inductor de la producción de nisina (1.87 µg/L), se suministró a las 2 h de iniciada la fermentación. Las condiciones de fermentación en el biorreactor fueron: agitación de 200 rpm, flujo de aire de 2 L/min, temperatura 30 °C, el pH se controló a 6.5 con soluciones de HCl 1 M y NaOH 1 M. Se tomaron muestras de 10 mL cada hora para realizar análisis posteriores hasta 7 h de fermentación.

5.4.2 Determinación de población de *L. lactis* UQ2 y actividad de nisina en suero

La determinación de la población se llevó a cabo por el método de Miles-Misra (Roberts & Greenwood, 2008). Al finalizar la fermentación se tomó una muestra de 1 mL y se adicionó en un tubo con 9 mL de agua peptonada 0.1%, se homogeneizó, este paso se repitió hasta obtener las diluciones necesarias (Vanderzant & Spittstoesser, 1992). Para realizar el conteo, se colocaron tres gotas de 20 µl de las diluciones correspondientes en un cuadrante de las placas de agar PBC adicionado con rifampicina y se dejaron secar a temperatura ambiente en la campana de flujo laminar, se incubaron a 30°C por 24 h y se procedió a contar las colonias en las placas.

Para realizar los ensayos de actividad de nisina se tomó el cultivo de *Micrococcus luteus* activado en tubos inclinados de agar assay, diluyendo con 1 ml de solución Ringer ¼ se recolectaron las colonias de la superficie y la solución recuperó en un frasco estéril; de esta solución concentrada se ajustó la concentración de a una absorbancia de 0.30 ± 0.01 con solución Ringer ¼, leyendo a una longitud de onda (λ) de 650 nm, la solución obtenida se denominó solución de trabajo (BS 4020, 1974).

A cada caja Petri de plástico de 15 mm se le agregaron 25 mL de agar soya tripticaseina adicionado con 2% (v / v) de solución de trabajo de *M. luteus* ($A_{650} =$

0.30) y Tween 20 (0.05% p / v). Una vez solidificado el agar se mantuvo por 2 h a 4 °C y se realizaron pozos con un diámetro de entre 6 y 7 mm. En cada pozo se agregaron 50 µL de muestra o dilución estándar según corresponda, y las placas se incubaron durante 48 h a 30 °C antes de medir el diámetro de inhibición con un vernier. Las mediciones de actividad se realizaron por triplicado y se registró el promedio \pm la desviación estándar. La concentración obtenida de nisina fue calculada mediante una curva estándar de nisina (µg/mL de nisina comercial) (Oros-Flores, 2019).

La curva estándar de nisina se realizó preparando una solución de 1,000 Unidades Internacionales/mL de nisina, equivalente a 1000 µg/mL de nisina comercial. Para lo cual se pesaron 0.1 g de nisina y se aforaron a 100 mL con una solución de ácido clorhídrico al 0.02 N. De esta solución se hicieron diluciones decimales en ácido clorhídrico al 0.02 N hasta obtener una concentración de 10 µg/mL. De la última solución se tomaron diferentes volúmenes y se diluyeron con ácido clorhídrico al 0.02 N para tener soluciones de 1, 2.5, 5, y 7.5 µg/mL (soluciones estándar) (BS 4020, 1974).

5.4.3 Microencapsulación de *Lactococcus lactis* UQ2

La microencapsulación de *L. lactis* UQ2 se llevó a cabo usando el secador por aspersión B-191 (Buchi Technik, AG, Suiza), utilizando almidones modificados como materiales de pared. Una vez concluida la fermentación se agregó el almidón modificado hasta 15 % de sólidos, se calentó la solución a 80 °C con agitación a máxima velocidad durante 10 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente continuando la agitación, para finalmente mantener en refrigeración de 6 a 8 h en agitación constante.

Para la microencapsulación se mantuvo la temperatura de entrada a 90 °C, con una velocidad de alimentación de la bomba de 5 mL/min, el porcentaje de aspiración fue de 90 % y el diámetro de boquilla fue de 0.7 mm. Las cápsulas obtenidas se retiraron del recipiente recolector de la muestra y fueron almacenadas

en un frasco de vidrio estéril con sello hermético a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Para el aseguramiento de la inocuidad del equipo se tomaron las medidas de higiene correspondientes. Se realizaron conteos tanto en el caldo de la última activación, como en la suspensión de almidón y en las microcápsulas para poder realizar los cálculos de rendimiento en la recuperación de sólidos y de la viabilidad celular.

5.4.4 Viabilidad del microencapsulado de *L. lactis* UQ2

La viabilidad de *L. lactis* UQ2 microencapsulado se realizó durante el almacenamiento por seis meses a $-70 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (congelación), para la dilución de las microcápsulas, se colocó 0.1 g del polvo en 1 mL de peptona al 0.1% utilizando un agitador tipo vórtex para lograr la disolución. Se recolectaron y analizaron alícuotas para evaluar el recuento de viables se siguieron las instrucciones descritas en la sección 5.4.3.

5.4.5 Microestructura de las microcápsulas de *L. lactis* UQ2

La morfología de las microcápsulas se realizó mediante microscopía electrónica de barrido de acuerdo con la metodología descrita por Gunning et al. (1999) con algunas modificaciones. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (ESEM Phillips, modelo XL30, Holanda), en condiciones de bajo vacío (0.7 mbar) con un voltaje de aceleración de 15.0-20.0 kV, aproximadamente 50 μA de corriente, un detector "Gaseus Secondary Electron" (GSE) y un spotsize del láser de 3.8-4.6 mm de diámetro. Las muestras de las bacterias microencapsuladas fueron fijadas en un portamuestras de aluminio con semicírculos de cinta adhesiva doble cara de grafito, expandidas por medio de aire comprimido y observadas a un aumento de 1 000X a 10 000X (Patiño 2014; Arredondo-Ochoa et al., 2016).

5.5 Elaboración y caracterización de las películas activas

Se elaboró una suspensión de caseinato (CS) y quitosano (QT) en proporción 8:1 (CS-QT, p/p). Primero se preparó una solución de CS en agua destilada (0.875 %, p/p) ajustando el pH a 5.3, para lograr la solubilización de la proteína. Al mismo tiempo se preparó una solución de QT (1 %, p/p) dispersando el quitosano en una solución de ácido láctico (0.1 M), ajustando el pH a 5.8. Se mezclaron y agitaron continuamente durante 3 h, a temperatura ambiente. Se adicionaron los agentes antimicrobianos: 400 mg/L de arginato láurico (LAE) y 40 mg/L de natamicina (NAT) y por último se agregó el glicerol para lograr una relación glicerol:CS (p/p) de 0.3 (Arredondo-Ochoa et al., 2016; Ríos de Benito, 2020).

5.5.1 Potencial ζ

Con el fin de determinar la estabilidad de la suspensión de los biopolímeros, se midió el potencial ζ con un equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Se realizaron tres mediciones de potencial ζ en cada muestra de solución filmogénica (1mL). El análisis se realizó a una temperatura de 25 °C y 200 mV de voltaje. El potencial ζ se calculó por medio de la movilidad electroforética utilizando la ecuación de Henry y la aproximación de Smoluchowski (Porta et al., 2016).

5.5.2 Espesor

Se elaboró una película con la solución filmogénica y se hizo una medición con un micrómetro con sensibilidad de 1 μm (Mod. IP65 Mitutoyo, Japón). Se realizó el cálculo de el grosor promedio a partir de cinco mediciones en posiciones aleatorias de la película (Giosafatto et al., 2014).

5.5.3 Propiedades ópticas

Transparencia, color y opacidad

La transparencia de la película fue estimada utilizando el método ASTM D1746-97 (2000), con un espectrofotómetro GENESYS 10 UV-Visible (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Las películas fueron cortadas en tiras rectangulares (1x4 cm) y se colocaron dentro de las celdas para espectrofotómetro (Cecchini et al., 2017). La transparencia se calculó de acuerdo con la ecuación (1) descrita por Han y Floros (1997):

$$\text{Transparencia} = \frac{\log \%T_{600}}{e} \quad (1)$$

Donde:

$\%T_{600}$ = Transmitancia a 600 nm (%)

e = Espesor de la película (mm)

En el caso del color, los valores de la escala CIELAB (L^* , a^* , b^*) se midieron en tres puntos distintos de cada película colocada sobre un fondo blanco, utilizando un espectrofotómetro CM-600D (Konica Minolta, Japón) con una iluminación D65 y con 10° de ángulo de observación (Cecchini et al., 2017).

El valor de opacidad de las películas se calculó de acuerdo con la ecuación (2) descrita por Spotti et al., (2012).

$$\text{Opacidad} = \frac{L_b^*}{L_w^*} \times 100 \quad (2)$$

Donde:

L_b^* = parámetro L^* medido sobre un fondo negro

L_w^* = parámetro L^* medido sobre un fondo blanco

5.5.4 Propiedades mecánicas

La resistencia a la tensión (TS), porcentaje de elongación al punto de ruptura (EF), y el módulo de Young (EM), se midieron usando un equipo Instron Universal (Mod. 5543A, Norwood, MA, EUA), de acuerdo con el método ASTM D882-10 (2010) con modificaciones utilizando el método de ensayo A, peso estático, velocidad de separación constante. Se elaboró una película con la solución filmogénica y se cortaron tiras de película de 1 cm de ancho x 9 cm de largo, estas tiras se equilibraron colocándolas a 50% de humedad relativa (HR) y 25°C en un desecador.

5.5.5 Permeabilidad al vapor de agua y solubilidad

La permeabilidad al vapor de agua se midió usando la técnica gravimétrica ASTM D3985 (1981) con modificaciones usando un permeabilímetro diferencial (CICATA, Querétaro, México). Antes de la medición las muestras se acondicionarán a 56 % HR durante 2 h. La prueba se realizó a 25 °C y 100 % HR (Fernández-Bats et al., 2018).

La solubilidad de las películas se determinó con el método descrito previamente por Cecchini et al. (2017). La materia seca inicial de las muestras se determinó secando las películas a 70 °C por 24 horas hasta peso constante posteriormente se sumergieron las películas en 100 mL de agua destilada durante 24 h a 32 °C con agitación constante. Finalmente, las películas se removieron del agua filtrándolas en un papel filtro con poro de 2.5 µm y llevándolas a 70 °C por 24 h hasta obtener un peso constante. La solubilidad en agua (%) se calculó usando la ecuación (3):

$$\% \text{ Solubilidad} = \left(\frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \right) \times 100 \quad (3)$$

5.5.6 Estructura de las películas

Microestructura

La microestructura de las películas se realizó mediante microscopía electrónica de barrido de acuerdo con la metodología descrita por Gunning et al. (1999) con algunas modificaciones como se describió en la sección 5.4.5.

Rugosidad superficial

La rugosidad de la superficie de las películas comestibles se evaluó mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) (di Multimode V, Veeco, Plainview, NY, EE. UU.). La rugosidad se calculó a partir de las imágenes de la superficie de la película comestible usando el método de contacto y puntas de silicón (Bruker RTESP Cantilever, Karlsruhe, Alemania), aplicando una frecuencia de resonancia de 286 a 362 kHz, una constante de resorte de 20 a 80 N/m y una velocidad de exploración de 1 Hz con una resolución de 256 píxeles. Con los datos obtenidos se calculó la raíz cuadrada de la desviación de un plano medio de los picos y valles superficiales (Rq) como se describe en la ecuación (4) (Escamilla-García et al., 2017):

$$Rq = \sqrt{\frac{\sum zi^2}{N}} \quad (4)$$

El promedio de los valores absolutos de las desviaciones de la altura de la superficie medidas desde el plano medio (Ra), se calculó mediante la ecuación (5), del software Nano Scope Analysis 1.2 (Veeco, Plainview, NY, EE. UU.) (Escamilla-García et al., 2017):

$$Ra = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N Zj \quad (5)$$

Donde:

Ra y Rq son los valores de rugosidad (nm)

$Z_{i,j}$ es la desviación de la altura promedio relativa a un plano medio

N es el número de puntos en la imagen.

5.5.7 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

La interacción química entre los componentes de las películas se analizó por medio de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) (LabRAM IR², HORIBA Jobin Yvon, Kioto, Japón). La frecuencia de barrido cubrió un rango de 600 a 4000 cm⁻¹ con una resolución de 4 cm⁻¹ (Arrieta et al., 2013).

5.5.8 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se evaluó por el método de difusión en placa frente a tres microorganismos *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium y *Penicillium expansum* en representación de los géneros Gram+, Gram- y mohos respectivamente. Se cortaron discos de 25 mm de diámetro de cada película y se esterilizaron bajo luz ultravioleta por 30 min. Para las bacterias, los discos se colocaron sobre agar suave de soya tripticaseína (0.85 %) previamente inoculado con 1x10⁵ UFC/mL del microorganismo evaluado, las placas se incubaron a 37 °C por 24 h para *S. Typhimurium* y por 48 h para *L. monocytogenes*. Para *P. expansum* el disco se colocó sobre agar PDA suplementado con Tween 80 (665 µL/100 mL) inoculado por extensión en superficie con 100 µL de solución de esporas al 1x10⁵ seguido de una incubación a 25 °C durante 5 d. El efecto antimicrobiano se determinó midiendo el diámetro de la zona de inhibición con un vernier incluyendo el diámetro del disco de la película (Hernández-Hernández et al., 2017; De Jesús 2019).

5.6 Elaboración de queso Fresco con la incorporación de microcápsulas de *L. lactis* UQ2

Para elaborar el queso tipo fresco para evaluación sensorial se utilizó leche entera pasteurizada (LALA, CdM, México), se llevó a una temperatura de 35 °C y se

le agregó cloruro de calcio (0.05 mg/mL). Posteriormente, se adicionó el cuajo enzimático (0.17 mL/L), se agitó hasta su completa incorporación. Se dejó reposar por 30 min manteniendo la temperatura para favorecer la formación de la cuajada, se realizó el corte de la cuajada y se aumentó gradualmente la temperatura (1 °C cada 6 min) hasta alcanzar 40 °C para favorecer el desuerado (Patiño, 2014; Henderson et al., 2019).

Se procedió a la eliminación total del suero, posterior a lo cual se realizó la molienda del queso utilizando un molino (Lactogandolfo, molino 1 hp, Guanajuato, México) para cuajada. Se saló la cuajada molida, empleando NaCl 1.5 % (p/p) y se agregaron las microcápsulas (0.05 g/100 g de cuajada), en los tratamientos que las contenían. Una vez homogeneizada la cuajada se procedió a la formación de los quesos; todo esto utilizando buenas prácticas de manufactura (Patiño 2014).

Para evaluar el efecto de *L. lactis* y su crecimiento en el queso, se utilizó la metodología descrita con anterioridad solo adicionando *Listeria monocytogenes* (1×10^7 UFC/g) al momento de agregar la sal y las microcápsulas (3 g/ 100 g de cuajada). Una vez homogeneizada la cuajada se procedió a formar los quesos (10 g) (Patiño, 2014; Van Hassel et al., 2015; Henderson et al., 2019).

5.7 Aplicación del recubrimiento comestible

La mitad de los quesos obtenidos en el paso anterior se recubrieron con la solución filmogénica (0.06 mL/cm²) mediante la técnica de barnizado con ayuda de una brocha de silicón estéril de manera aséptica. Todos los quesos se almacenarán en refrigeración (4 °C) en bolsas plásticas transparentes selladas (OSTER, Food Saver FSFSBF0634-FFP, EE. UU.) hasta su análisis (Hernández-Hernández et al., 2017).

5.8 Evaluación de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en queso.

5.8.1 Evaluación de pérdida de peso y de color

Se tomó la medida del peso de cada unidad experimental en el tiempo 0 y en cada tiempo de almacenamiento establecido en el diseño experimental, utilizando una balanza de precisión BJ 410C (Precisa, Livingston, Reino Unido). El resultado se reportó como porcentaje de pérdida de peso con respecto al peso inicial de cada muestra a través del tiempo (Lerdthanangkul & Krochta, 1996; Xing et al., 2011).

El color de los quesos se evaluó utilizando un colorímetro (CM-600d, Konica Minolta, Japón) en cada tiempo de almacenamiento establecido en el diseño experimental, obteniendo los valores CIELAB (L^* , a^* , b^*) a una temperatura de 25 °C. El equipo se calibró en cero en el ambiente y se utilizó un capuchón (CM-A177 Konica Minolta, Japón) para calibración del blanco. El ángulo de matiz (hue) fue calculado siguiendo la ecuación $\text{hue} = (\tan^{-1} b/a)$ descrita por Shewfelt et al. (1988) y se reportó junto con el parámetro L^* .

5.8.2 Determinación de grasa butírica y proteína

La grasa butírica se determinó de acuerdo con la metodología descrita en NMX-F-100-1984 al tiempo 0. Se pesó directamente en una copa fijada en el tapón de un butirómetro Gerber 3 $g \pm 0.001$ g de queso. La lectura observada en la escala indicó directamente la cantidad en porcentaje (p/p) de la grasa contenida en el queso.

El porcentaje de proteína se determinó de acuerdo con la metodología descrita en NMX-F-098-1976 al tiempo 0. Se pesó exactamente 1.0 g de muestra y se transfirió a un matraz Kjeldahl. Se calculó el % de proteínas multiplicando el % de nitrógeno por el factor 6.38.

5.8.3 Determinación del pH y de la acidez titulable

Los valores de pH del queso se midieron mediante el uso de un potenciómetro Orion Star A211 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) en cada tiempo de almacenamiento establecido en el diseño experimental siguiendo la metodología descrita en la NMX-F-099-1970.

La acidez titulable se determinó de acuerdo con la metodología descrita en la NOM-243-SSA1-2010 en cada tiempo de almacenamiento descrito en la Tabla 2. Los resultados se reportaron como % acidez titulable expresada como ácido láctico.

5.8.4 Determinación de Coliformes fecales

Los coliformes fecales (NMP) se determinaron de acuerdo con lo descrito en la NOM-210-SSA1-2014 en cada tiempo de almacenamiento establecido en el diseño experimental. Se tomaron 25 g de queso y se colocaron en 225 mL de agua peptonada, se homogeneizaron y se realizaron las diluciones decimales correspondientes, se utilizó una serie de 9 tubos con 10 mL de caldo lauril triptosa cada uno, cada tubo contenía una campana Durham (vial de fermentación), de cada una de las últimas tres diluciones se inocularon 3 tubos agregando 1 mL de la dilución a cada uno, se incubaron a 36 °C por 48 h \pm 2 h. Una asada de los tubos positivos con formación de gas fue transferida a tubos de medio EC que se incubaron a 45.5 °C en baño María por 48 \pm 2 h verificando la formación de gas que indica su presencia.

5.8.5 Determinación de *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus se determinó según la NOM-210-SSA1-2014 en el tiempo 0. Se tomaron 25 g de queso y se colocaron en 225 mL de agua peptonada, se homogeneizó y se inoculó 0.1 mL de la dilución sobre una placa de agar Baird Parker distribuyendo el inóculo con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, las placas se incubaron 48 h a 35 °C y se realizó el conteo.

5.8.6 Determinación de hongos y levaduras

La presencia de hongos y levaduras se determinó según la NOM-243-SSA1-2010 en cada tiempo de almacenamiento establecido en el diseño experimental. Se tomaron 25 g de queso y se colocaron en 225 mL de agua peptonada, se homogeneizó y se realizaron las diluciones decimales correspondientes, se inoculó 1 mL de cada dilución sobre una placa Petri y se le adicionaron 20 mL de agar papa dextrosa acidificado con ácido tartárico (10 %) hasta un pH de 5.3, se homogeneizó y dejó solidificar, se incubaron a 25 ± 1 °C tomando lectura a los 3, 4 y 5 d de incubación.

5.8.7 Determinación de población de *L. lactis* UQ2 y actividad de nisina en queso

La determinación de la población de *L. lactis* UQ2 se llevó a cabo por el método de Miles-Misra en cada uno de los tiempos establecidos en el diseño experimental. De cada una de las muestras de queso se prepararon una serie de diluciones decimales seriadas (Vanderzant & Spittstoesser, 1992). Para realizar el conteo, se siguieron los pasos descritos en la sección (5.4.3).

Se prepararon las muestras en cada uno de los tiempos establecidos en el diseño experimental. El queso se molió en un mortero hasta obtener un puré uniforme, se agregaron 0.2 g de la muestra de queso con 1.0 mL de ácido cítrico 50 mM a un tubo cónico de microcentrífuga y se homogeneizaron cuidadosamente hasta obtener una suspensión uniforme. Cada muestra se centrifugó ($14\ 500 \times g$ en una centrífuga Eppendorf 5415-C) durante 3 min y se recuperaron ~ 200 μ L de la fase intermedia, evitando el sobrenadante graso (Oros-Flores, 2019). Para determinar la actividad de nisina en queso, las muestras fueron procesadas como se indica en la sección 5.4.2.

5.8.8 Determinación de *Salmonella* sp.

La presencia de *Salmonella* se determinó de acuerdo con la NOM-210-SSA1-2014 en el tiempo 0. Se tomaron 25 g de queso y se colocaron en 225 mL de medio de pre-enriquecimiento se incubaron a $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $18\text{ h}\pm 2\text{ h}$; una vez concluida la incubación se inocularon tubos de caldos RVS y MKTTn los cuales se incubaron durante $24\text{ h}\pm 3\text{ h}$ a $41.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ respectivamente. De cada tubo se inocularon por estriado, placas de agar XLD, agar sulfito bismuto y agar verde brillante que se incubaron a $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{ h}\pm 3\text{ h}$ para identificar la presencia o ausencia del género.

5.8.9 Determinación de *Listeria monocytogenes*

La presencia de *Listeria monocytogenes* se determinó de acuerdo con la NOM-210-SSA1-2014 al tiempo 0. Se tomaron 25 g de queso y se colocaron en 225 mL de caldo Fraser $\frac{1}{2}$ y se incubó a $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $24\text{ h}\pm 2\text{ h}$ (enriquecimiento primario), una vez concluida la incubación, se transfirió 0.1 mL a un tubo con 10 mL de caldo Fraser y se incubó por $48\text{ h}\pm 2\text{ h}$ a $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ (enriquecimiento secundario). De ambos enriquecimientos se inocularon 2 placas de agar Oxford por estriado, una placa se incubó a $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la otra a $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ de 24 h a 48 h, se observó morfología para determinar presencia o ausencia.

Para el reto antimicrobiano, se hizo un recuento de la población de *Listeria monocytogenes* inoculada en los quesos, para cada tratamiento y tiempo establecidos en el diseño experimental, usando el método de Miles-Misra. De cada queso se preparó una serie de diluciones decimales seriadas; para ello se tomaron 10 g de queso y se colocaron en una bolsa (Whirl-Pak®, Nasco) con 90 mL de solución salina 0.85 %. Se homogenizaron (Stomacher 400 circulator, Seward, Inglaterra) y se repitió el procedimiento hasta obtener las diluciones necesarias dependiendo de la población esperada (Vanderzant & Spittstoesser, 1992). Las diluciones se sembraron en cajas con medio Oxford colocando 3 gotas de 20 μL en

un cuadrante, se incubaron a 36 °C por 24 h para posteriormente contar las colonias (Patiño 2014).

5.9 Análisis sensorial del queso tipo fresco adicionado con *L. lactis* UQ2 y recubierto

A los 5 d de elaborado, se llevó a cabo el análisis sensorial del queso. Se usó un panel no entrenado de 50 consumidores (Hough, 2010), a los cuales se les pidió que evaluaran las siguientes características del queso: aroma, color, sabor y aceptación global utilizando una escala hedónica de diez puntos (anexo 1).

El reclutamiento se realizó a través de difusión por redes sociales, por lo que los participantes fueron estudiantes de licenciatura y maestría de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ). Por tema de la contingencia sanitaria derivada de la pandemia de COVID-19, el estudio se realizó en el comedor de Posgrado ubicado en la parte posterior del edificio de posgrado de química de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ). Se consideraron como criterios de aceptación a personas mayores de 18 años consumidores frecuentes de queso fresco y como criterios de exclusión a personas alérgicas o sensibles a los ingredientes presentes en los quesos a evaluar.

Los quesos sometidos a evaluación sensorial fueron analizados como lo indica la NOM-243-SSA1-2010, para asegurar su inocuidad y conferir un riesgo mínimo al ejercicio de evaluación. Los ingredientes de los quesos que fueron evaluados son todos reconocidos como seguros por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA).

A cada participante se le proporcionó un consentimiento informado (anexo 2), el cual contiene la información completa sobre el estudio que el participante debe conocer. El documento escrito quedó en resguardo del personal a cargo de la prueba como evidencia de que el participante fue informado y comprendió la información proporcionada.

Las muestras de queso se presentaron de forma homogénea, con idéntica preparación y presentación. Los panelistas degustaron cuatro muestras: 1) queso sin tratamiento (control, QC), 2) queso recubierto sin microorganismos añadidos (QR), 3) queso con microcápsulas sin recubrimiento (QM) y 4) queso con microcápsulas y recubrimiento (QRM). Entre cada degustación de una muestra de queso los panelistas limpiaron su paladar con agua purificada natural y galletas neutras para eliminar cualquier residuo de la muestra anterior. Las muestras se presentaron en porciones de $5 \text{ g} \pm 1 \text{ g}$. La información recabada fue utilizada para realizar el análisis estadístico.

5.10 Diseño experimental

Los tratamientos que se utilizaron en el presente trabajo fueron: Queso empacado en bolsas plásticas (QC); queso con adición de microcápsulas, sin recubrimiento empacado en bolsas plásticas (QM); queso con recubrimiento activo de caseína y quitosano empacado en bolsas plásticas (QR); queso con adición de microcápsulas y con recubrimiento activo de caseína y quitosano empacado en bolsas plásticas (QRM).

Para lo cual se realizó un diseño, esquematizado en la Tabla 2, de 2 factores, con dos niveles evaluados a 6 tiempos (0, 4, 8, 16, 20 y 30 d) lo que nos genera 24 tratamientos que fueron aleatorizados. Este diseño se realizó con una réplica, arrojando un total de 48 tratamientos.

Tabla 2. Diseño experimental

Factor	Nivel
Recubrimiento	Presencia
	Ausencia
Microcápsulas	Presencia
	Ausencia

5.11 Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado; reportándose la media \pm desviación estándar. En el caso del análisis estadístico se realizó comparación de medias mediante la prueba de Dunnett para determinar si los resultados son significativamente diferentes utilizando el software JMP versión 6.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Cultivo a nivel biorreactor de *Lactococcus lactis* UQ2

La cinética de crecimiento de *Lactococcus lactis* UQ2 en biorreactor, utilizando suero de leche suplementado como medio alternativo, no muestra una fase de adaptación ya que el microorganismo fue adaptado al uso de este medio con dos activaciones anteriores a la fermentación en biorreactor (Figura 7).

También se puede observar que la fase de crecimiento exponencial termina a las 8 h de iniciada la fermentación lo que es congruente con lo reportado por Shokri et al., (2020), donde la cinética de *L. lactis* subsp. *lactis* hasta un tiempo de 12.5 h muestra que la fase exponencial termina a las 7.5 h. Por lo tanto, se tomó la decisión de detener la fermentación a las 7 h de su inicio, con la finalidad de poder obtener las células en su fase exponencial que es donde ocurre la producción de nisina.

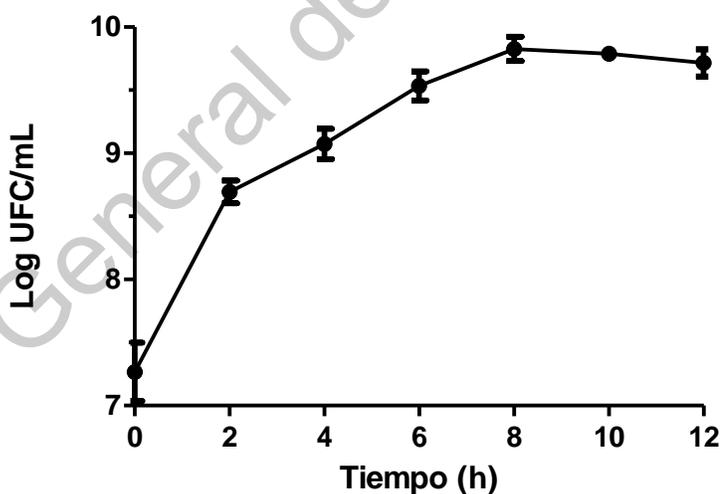


Figura 7. Cinética de crecimiento en biorreactor de *L. lactis* UQ2 utilizando suero de leche como medio alternativo bajo condiciones controladas: temperatura= 30 °C, agitación= 200 rpm, flujo de aire= 10 L/min y pH= 6.5.

Se realizaron 3 fermentaciones independientes que fueron detenidas a las 7 h para recuperar las células y posteriormente microencapsularlas. El promedio de las cinéticas de crecimiento se puede observar en la figura 8.

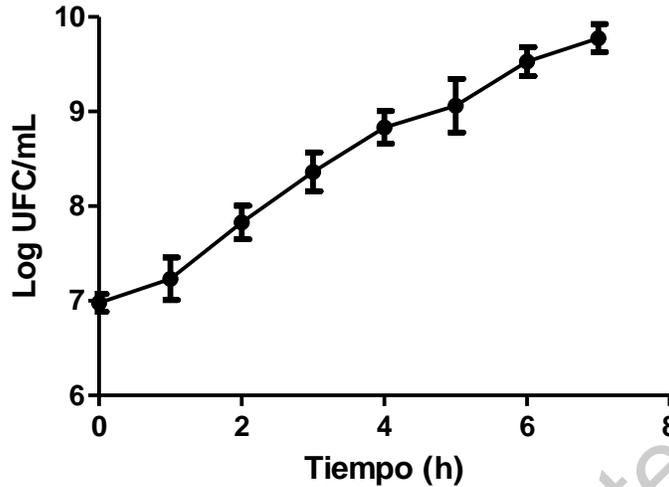


Figura 8. Cinética de crecimiento de *L. lactis* UQ2 en biorreactor. Los datos corresponden a la media y a la desviación estándar de tres tratamientos independientes.

La Figura 8 indica un crecimiento de casi 3 Log durante las 7 horas de fermentación, este dato es mayor a lo reportado por Shokri y colaboradores (2020), quienes crecieron *L. lactis* en caldo soya tripticaseína y alcanzaron solo un aproximado de 2 Log de crecimiento en 12.5 h; lo anterior nos indica que el suero de leche es un buen medio alternativo para el crecimiento de *L. lactis* UQ2 como anteriormente había sido reportado por Patiño (2014), quien reporta crecimientos similares a los obtenidos en el presente trabajo.

La nisina producida durante cada fermentación, se cuantificó a partir de una curva de calibración (Anexo III), donde la ecuación de regresión correspondiente (6) mostró una $r^2 = 0.974$:

$$x = 10^{(y-22.65)/6.739} \quad (6)$$

Donde:

x= actividad de nisina ($\mu\text{g/mL}$)

y= diámetro de inhibición (mm)

Con la ecuación anterior se calculó la producción de nisina durante las fermentaciones en biorreactor, representada en la Figura 9, los niveles máximo y mínimo de producción de nisina pura fueron 0.80 $\mu\text{g/mL}$ y 0.57 $\mu\text{g/mL}$ a las 7 h de fermentación respectivamente. Estos niveles de producción son inferiores a los reportados por Patiño (2014), quien alcanzó niveles máximos de producción de nisina 7.11 UI/mL a las 5.5 h.

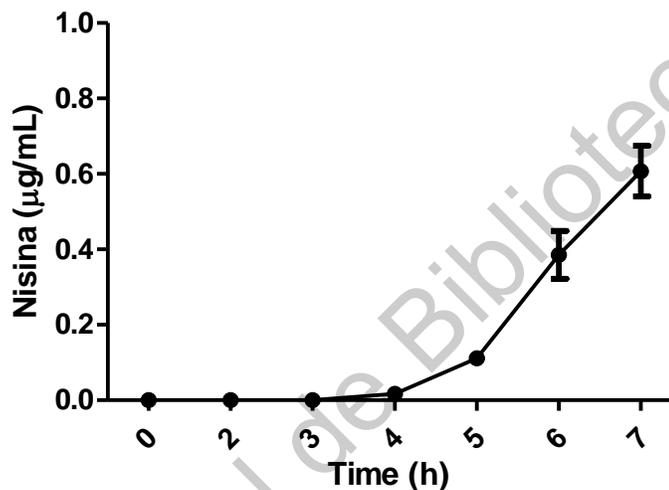


Figura 9. Actividad de nisina obtenida por la fermentación en biorreactor de *L. lactis* UQ2 con suero de leche. Los datos corresponden a la media y a la desviación estándar de dos tratamientos independientes.

6.2 Microencapsulación de *Lactococcus lactis* UQ2 mediante secado por aspersión.

El grupo de trabajo ya ha microencapsulado con anterioridad a *L. lactis* UQ2. Abarca (2012), determinó la mezcla más adecuada de materiales de pared que debe utilizarse para microencapsular dicho microorganismo, sin embargo, la viabilidad celular que obtuvo fue baja, con un máximo de 6.3 %. En otro trabajo se determinaron mejores condiciones de secado, con las cuales se alcanzó una viabilidad de 43.6 % (Patiño, 2014).

Con base en estos dos trabajos se realizaron los secados para la obtención de las microcápsulas, en la Tabla 3 se reportan los valores de disminución en la

recuperación celular (reducción celular), eficiencia de encapsulación (% EE) definida como la tasa de supervivencia del microorganismo durante el proceso de secado, calculado según lo propuesto por Nunes et al. (2018):

$$\%EE = \left(\frac{N}{N_0} \right) \times 100 \quad (7)$$

Donde N es el número de células viables (Log UFC) en las microcápsulas y N_0 es el número de células viables (Log UFC) en las soluciones de alimentación (antes del secado); y el rendimiento de sólidos obtenido (rendimiento de encapsulación % p/p). Los parámetros de secado utilizados fueron los siguientes: 90 % de aspiración, 13 % de potencia de bomba (5 mL/min) y 90 °C de temperatura de entrada, cabe mencionar que la temperatura de salida es dependiente de la temperatura de entrada, lo que la convierte en el único parámetro no controlable.

Tabla 3. Viabilidad, eficiencia y rendimiento de encapsulación de *L. lactis* UQ2 durante el proceso de secado por aspersión utilizando un volumen de 200 mL con 15 % de sólidos totales.

Secador	Número de células viables (Log UFC)		Reducción (Log UFC)	Eficiencia de encapsulación (% EE)	Rendimiento de encapsulación (% RE)
	Antes del secado	Después del secado			
MiniSpray Drier B-191	12.65 ± 0.02	12.60 ± 0.04	0.05 ± 0.04	90.2 ± 8.75	69.9 ± 14.5

Los datos corresponden a la media y a la desviación estándar de tres tratamientos independientes. Reducción= Población celular después del secado, comparado con la que había antes del secado. % EE= tasa de supervivencia de la población después del secado. % RE= Sólidos recuperados después del secado relativo a los sólidos iniciales.

La EE obtenida en el presente trabajo alcanzó hasta 98.9 %, esto es mayor al rango de supervivencia celular que oscila entre 70 y 85 % para microorganismos expuestos al proceso de secado por aspersión propuesto por Huq et al. (2013). Del mismo modo, Rosolen et al. (2019), estudiaron el efecto de utilizar inulina y suero de leche como agentes encapsulantes, utilizando secado por aspersión y evaluando la supervivencia de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7, donde encontraron una EE de 96.61 %. Ellos concluyen que la inulina y el suero tienen un buen efecto de protección ante el proceso de secado por aspersión, dicha conclusión es extrapolable a nuestros

resultados, el almidón modificado en combinación con suero de leche y maltodextrina protegen a las células de *L. lactis* UQ2 durante la exposición al calor por el proceso de secado por aspersión ya que se obtuvo una baja reducción celular y un alto rendimiento.

6.3 Viabilidad de *L. lactis* UQ2 microencapsulado a través del tiempo

Para estudiar la viabilidad de la cepa microencapsulada a través del tiempo, se llevó a cabo el monitoreo de la población a lo largo de 6 meses de almacenamiento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ya que varios trabajos han reportado que entre menor sea la temperatura de almacenamiento es mayor la supervivencia celular a través del tiempo (viabilidad) (Maciel et al., 2014; Dianawati et al., 2016). La población disminuyó en aproximadamente 2 Log (Figura 10), mostrando una mayor supervivencia que lo reportado por Patiño (2014), quien reportó una disminución *L. lactis* UQ2 microcapsulado de aproximadamente 5 Log a los 80 d de almacenamiento, aunque utilizó una temperatura de 4°C . Por otro lado, Dutra- Rosolen et al. (2019), reportaron una reducción en la población de *L. lactis* subsp *lactis* de 4 Log a los 15 d de almacenamiento, independientemente de la temperatura utilizada (-20 , 4 y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$).

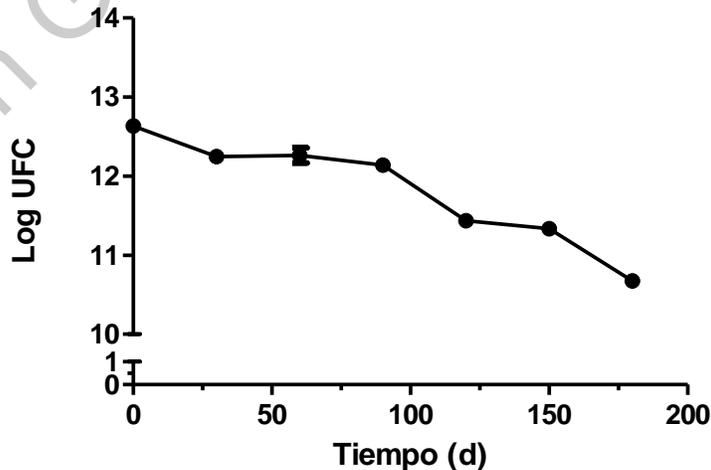


Figura 10. Viabilidad celular de las microcápsulas de *L. lactis* UQ2 a través del tiempo almacenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Con lo anterior, podemos inferir que la supervivencia de la población de *L. lactis* UQ2 microencapsulado no solo depende de los materiales de pared y del proceso de secado, ya que la temperatura de almacenamiento contribuye significativamente a mantener su población viable, siendo -70 °C una excelente opción de temperatura a utilizar.

6.4 Microestructura de las microcápsulas de *L. lactis* UQ2

En las micrografías de las microcápsulas, se observan morfologías esféricas y homogéneas con tamaños que oscilan entre 5 y 12 μm de diámetro (Figura 11); en el panel A encontramos las microcápsulas después de 90 d y en el panel B encontramos las microcápsulas después de 7 d de almacenamiento a -70 °C, a diferentes aumentos 1 000x, 2 500x, 5 000x y 10 000x para las leyendas 1, 2, 3 y 4 respectivamente. Este tamaño es similar al reportado por Patiño (2014), y ligeramente inferior a los reportados por Ceja-Medina et al. (2020) y Núñez-Ramírez et al. (2021), que fueron de 15-20 μm para la encapsulación de *Lactobacillus plantarum* utilizando fructanos y *Acidithiobacillus thiooxidans* utilizando goma arábica como material de pared, respectivamente. La superficie se muestra rugosa, tipo balón desinflado, sin presencia de grietas, mostrando una buena interacción de los materiales de pared, lo que les permitió resistir el proceso de secado otorgándoles una buena estabilidad a través del tiempo, ya que después de 90 d (Figura 11A) no se observa degradación alguna de la superficie o morfología de la microcápsula en comparación con la micrografía posterior a 7 d (Figura 11B).

En ambos tiempos de evaluación se pueden observar pequeños fragmentos adheridos a la superficie de las microcápsulas, se creó que puede ser debido a que alguno de los materiales de pared se adhirió a la parte externa de las microcápsulas. Considerando que podría tratarse del suero lácteo, al ser una proteína de menor peso molecular que la maltodextrina o el almidón modificado.

Considerando que el flujo de alimentación y la temperatura de secado otorgan la forma y funcionalidad de la cápsula (Ceja-Medina et al., 2020). Esto permite que el microorganismo esté dentro de la matriz polimérica del material de la pared, lo cual aunado a la baja temperatura de almacenamiento, explica los altos valores de supervivencia y viabilidad a través del tiempo.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

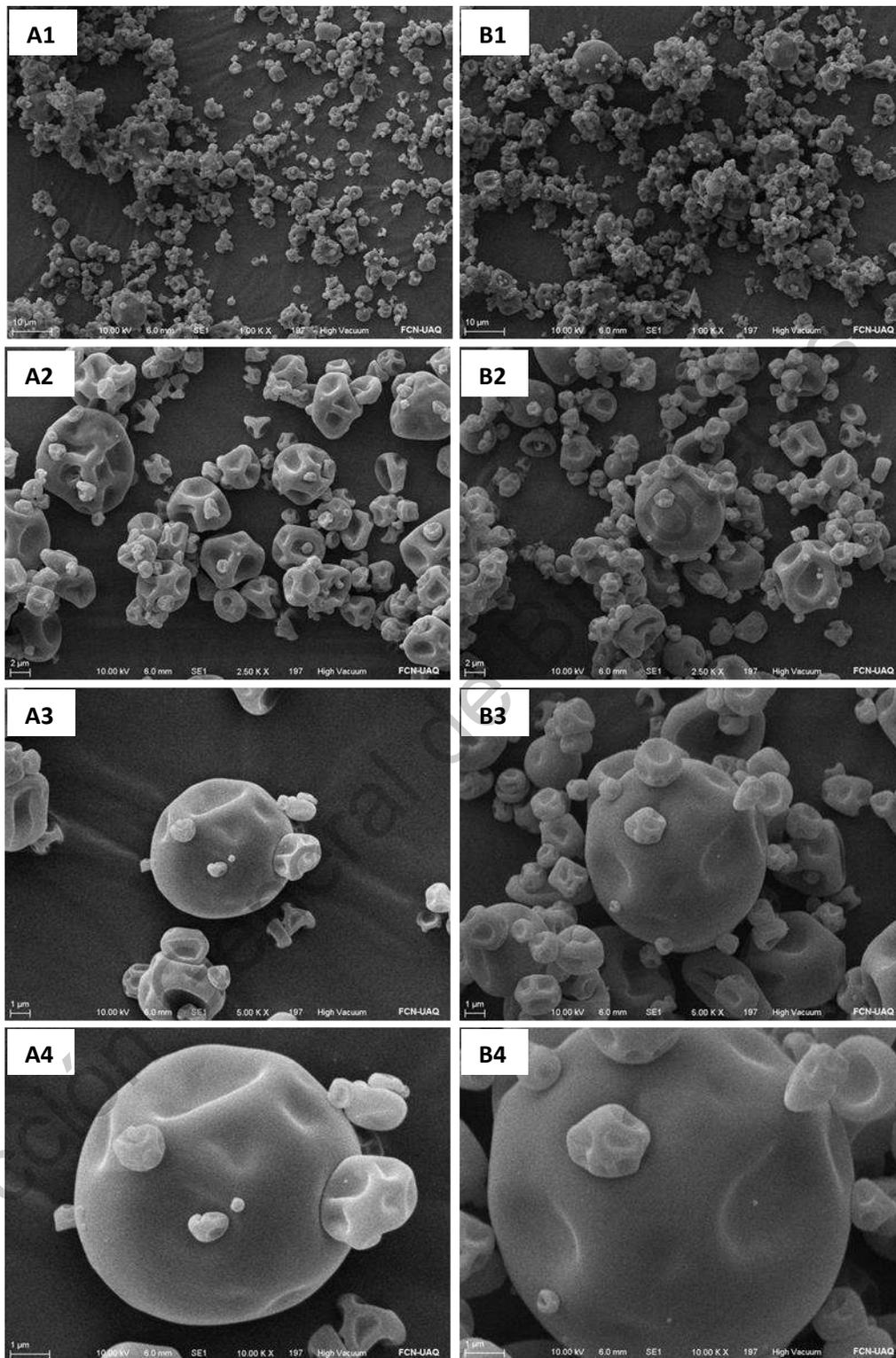


Figura 11. Micrografías de las microcápsulas de *L. lactis* UQ2, almacenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. (A) Después de 90 d y (B) Después de 7 d. En una magnificación de 1 000x (1), 2 500x (2), 5 000x (3) y 10 000x (4).

6.5 Elaboración y caracterización del recubrimiento activo

Para la elaboración del recubrimiento activo se evaluó el uso de 3 ácidos orgánicos para realizar el ajuste de pH, esto con el fin de encontrar el ácido que proporcionara las mejores condiciones para la formación de la red tridimensional del recubrimiento.

Se elaboraron 4 diferentes películas con los distintos ingredientes del recubrimiento activo, para evaluar los cambios provocados por la complejación de cada componente sobre la película obtenida:

1. CS: Caseínato de sodio + Glicerol (plastificante)
2. QT: Quitosano
3. CS:QT: Recubrimiento sin antimicrobianos
4. CS:QT + LAE + NAT: Recubrimiento activo

Es importante mencionar que la proporción de CS:QT utilizada para las películas 3 y 4 fue 8:1 (ppm/ppm) durante toda la investigación.

6.5.1 Potencial ζ

Para evaluar la estabilidad de las soluciones formadora de película, se analizó el potencial ζ para cada uno de los ingredientes por separado y en conjunto (Tabla 4). Es conocido que entre más grande sea el valor absoluto del potencial ζ (>30 mV) las suspensiones filmogénicas serán más estables como consecuencia de la repulsión electrostática de sus componentes manteniéndose suspendidas durante más tiempo (Sabba et al., 2016; Croissant et al., 2018).

Tabla 4. Caracterización de la solución filmogénica.

Tratamiento	Potencial ζ (mV)
QT	30.40 \pm 0.208 ^a
CS	-27.80 \pm 0.802 ^b
CS:QT	31.10 \pm 0.764 ^a
CS:QT + LAE +NAT	26.40 \pm 0.529 ^b

Los datos corresponden al promedio \pm desviación estándar. Valores con diferentes letras indican diferencia significativa, según la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$).

Todos los tratamientos presentaron un potencial ζ cercano a un valor absoluto de 30 mV (intervalo de -27.80 a 31.10 mV), lo que indica una buena estabilidad de la solución (Tabla 4). La carga negativa de la solución de caseinato de sodio se debe a su pH de 5.3 que se encuentra por encima de su punto isoeléctrico que es de pH 4.6, esta carga se revierte al combinarse con el quitosano ya que la carga neta individual positiva del polímero es mayor que la de la proteína al encontrarse por debajo de su punto isoeléctrico que es de entre 6.8 y 7.4 de pH.

6.5.2 Propiedades ópticas

Todas las películas obtenidas se observan incoloras, casi transparentes y muy homogéneas lo que indica una buena interacción entre sus componentes; película de CS (Figura 13A), película de QT (Figura 13B), película CS:QT (Figura 13C) y película CS:QT+LAE+NAT (Figura 13D). Al ser películas incoloras, no interfieren en la aceptabilidad de los alimentos, ya que no le conferirían cambios en sus características visuales, además de que es menos probable que las películas transparentes cambien la apariencia de los alimentos a los que se aplican (Velickova et al., 2013).

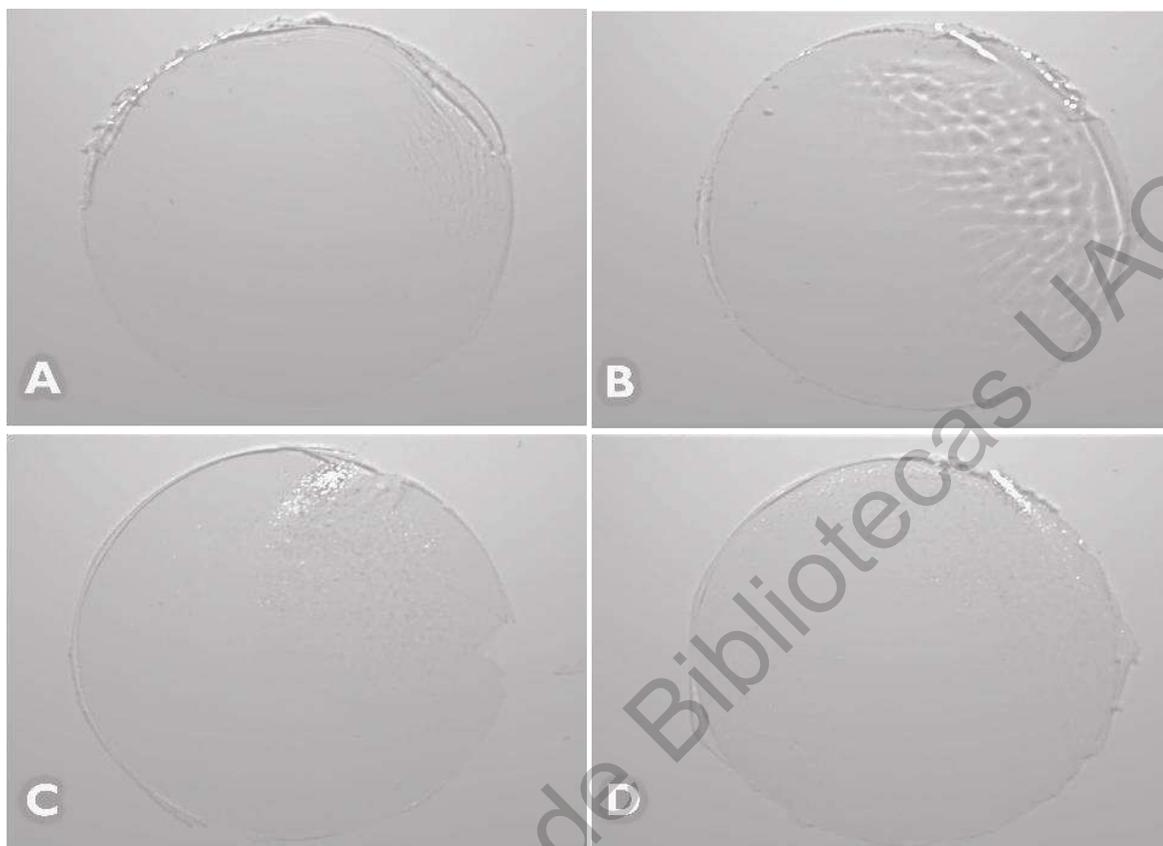


Figura 12. Películas comestibles obtenidas con distintos tratamientos: (A) CS, (B) QT, (C) CS:QT, (D) CS:QT + LAE + NAT.

En lo referente a las propiedades ópticas de las películas, se sabe que estas propiedades dependen principalmente de la metodología para la preparación de la película (pH, homogeneización y secado), así como de los disolventes y aditivos utilizados (Vahedikia et al., 2019).

Todos los tratamientos tuvieron un valor de $L > 90$, indicando una alta luminosidad, los valores de a^* fueron positivos, es decir tendencia a rojo, mientras que solo la película de QT tiene un valor positivo de b^* , indicando tono amarillo (Tabla 5). El ΔE indica la variabilidad de color entre muestras del mismo tratamiento, de acuerdo con la norma ISO 12647-2 (2013), valores inferiores a 3 indican diferencia apenas perceptible y todos nuestros tratamientos se encuentran en esta clasificación.

Tabla 5. Propiedades ópticas de las películas.

Tratamiento	Transparencia	Color				Opacidad
		L*	a*	b*	ΔE	
QT	0.721 ± 0.086 ^b	90.088 ± 0.860 ^c	0.404 ± 0.196 ^c	0.458 ± 1.298 ^a	1.168	46.570 ± 0.607 ^a
CS	0.481 ± 0.038 ^c	92.262 ± 0.487 ^a	0.911 ± 0.065 ^a	-1.99 ± 1.071 ^b	1.669	46.422 ± 0.753 ^a
CS:QT ^a	0.695 ± 0.075 ^b	92.214 ± 0.523 ^a	0.734 ± 0.076 ^b	-3.21 ± 0.220 ^c	0.603	46.573 ± 0.201 ^a
CS:QT+LAE+NAT	0.878 ± 0.057 ^a	91.591 ± 0.537 ^b	0.487 ± 0.104 ^c	-1.14 ± 0.911 ^b	1.194	47.001 ± 0.337 ^a

^aLa relación CS:QT siempre se mantuvo 8:1 (p/p). Los datos corresponden al promedio ± la desviación estándar. Valores con diferentes letras indican diferencia significativa, según la prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$).

La transparencia es una característica deseable en los recubrimientos alimenticios, ya que pueden conferir mayor visibilidad real del alimento, entre más cercano a 0 se encuentre el valor, indica mayor transparencia. Lin et al., (2020), reportaron transparencias de 0.97 ± 0.29 para películas de CS, valor que se ve disminuido a la mitad en este estudio, esto indica que las características de elaboración de nuestra película, al menos para el CS, resultan en una mejor solubilización de la proteína. Ríos de Benito (2020), reportó transparencias mínimas de 0.82 ± 0.02 para películas de CS y QT, datos comparables a los obtenidos en nuestro estudio. La película con menor transparencia es la que incluye los antimicrobianos, lo que indica que la transparencia también se ve afectada por la mayor presencia de sólidos disueltos. Por otro lado, en términos de opacidad no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

6.5.3 Propiedades mecánicas

Las películas realizadas con cada uno de los ingredientes y la mezcla de todos ellos mostraron un espesor en el rango de de 51 a 75 μm (Tabla 6). Estos valores son similares a lo reportado por Ríos de Benito (2020) en nuestro grupo de trabajo, quien reportó espesores de entre 57 y 73 μm en películas elaboradas con

los mismos biopolímeros, pero utilizando aceite esencial de orégano contenido en partículas de sílice mesoporoso como agente antimicrobiano.

Es importante recalcar que a pesar de que la película con adición de antimicrobianos es la que contiene la mayor cantidad de sólidos no presenta el espesor más alto. Esto significa que hubo una exitosa formación de complejo entre el CS y el QT dada su interacción electrostática al presentar cargas opuestas, favoreciendo su coacervación. A este fenómeno se atribuye que a pesar de la mayor cantidad de sólidos de la película completa con antimicrobianos tenga un espesor menor que la película sin los antimicrobianos y la que contiene solamente quitosano.

Tabla 6. Propiedades mecánicas de las películas.

Tratamiento	Espesor (μm)	Resistencia a la tensión (MPa)	Elongación (%)	Módulo de Young (Mpa)
QT	74 ± 5^a	171.9 ± 31.5^a	70.6 ± 8.6^a	390.2 ± 69.5^c
CS	51 ± 4^c	167.2 ± 7.0^{ab}	5.1 ± 0.7^c	6489.0 ± 604.6^a
CS:QT	74 ± 5^a	114.0 ± 17.6^b	46.4 ± 17.5^b	1718.1 ± 178.7^{bc}
CS:QT + LAE + NAT	65 ± 4^b	130.3 ± 1.1^{ab}	64.2 ± 5.3^{ab}	2240.9 ± 237.6^b

Los datos corresponden a la media y a la desviación estándar. Valores con diferentes letras indican diferencia significativa de Tukey ($\alpha=0.05$).

La resistencia a la tensión de las películas de quitosano, de caseinato de sodio y la mezcla de estos dos biopolímeros con adición de antimicrobianos son las que presentan los mayores valores de resistencia a la tensión (>130 MPa) (Tabla 6). Se presentaron diferencias significativas para la mezcla que no contiene antimicrobianos. Se encontró que las películas más elongables son las de QT y de la mezcla de biopolímeros con adición de antimicrobianos, con valores aproximados al 70 % de elongación, seguidas de la película de CS:QT (8;1) con elongación

cercana al 50 %. La película que presentó la menor elongación fue la de CS con solo un 5%. De acuerdo con el módulo de Young, la película menos rígida (menor fragilidad) fue la de QT, seguida de la CS:QT con y sin adición antimicrobianos, siendo la película de CS la más rígida (mayor fragilidad).

Con lo anterior, podemos concluir que la película obtenida de la solución filmogénica diseñada para aplicar en queso fresco mostró una alta elongación, una alta resistencia y una rigidez media con una buena complejación entre sus componentes, lo que la convierte en la película con mejores características de los tratamientos analizados.

En relación a las propiedades mecánicas, la resistencia a la tensión indica cuál es la máxima resistencia que posee un material sometido a una carga de estiramiento sin romperse; el porcentaje de elongación refiere a la capacidad que tiene un material para alargarse sin romperse y por último el módulo de Young indica la rigidez que puede alcanzar un material, es decir, la capacidad de este material para resistirse a la deformación, entre mayor sea este valor mayor será la rigidez de la película evaluada. En combinación, estos 3 parámetros nos indican la flexibilidad y resistencia de las películas (Giosafatto et al., 2014).

6.5.4 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La película elaborada solo con QT fue única con diferencia significativa relativa a la PVA, sugiriendo que las mezclas con CS y los antimicrobianos aumenta la hidrofobicidad de las películas formadas (Figura 14).

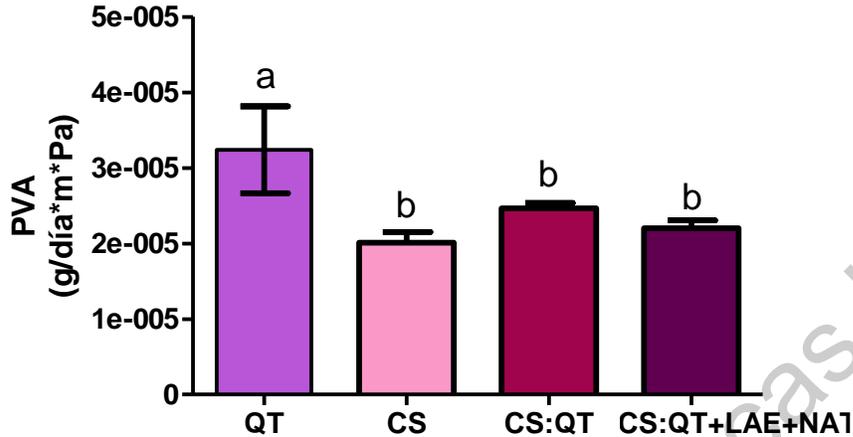


Figura 13. Permeabilidad al vapor de agua de las películas. Barras con diferente letra indican diferencia significativa entre tratamientos. La barra de error corresponde a la desviación estándar. Barras con diferentes letras indican diferencia significativa de Tukey ($\alpha=0.05$).

El recubrimiento activo comestible presentó una PVA de $2.204 \times 10^{-5} \pm 2.053 \times 10^{-6} \text{ g día}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, este valor es inferior al reportado por Spatafora-Salazar et al. (2019), para películas con base en pectina ($7.656 \times 10^{-5} \text{ g día}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$). También menor que la PVA de películas basadas en residuos de papaya ($3.465 \times 10^{-5} \text{ g día}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) (Rangel-Marrón et al., 2019), y de papa con glicerol ($8.286 \times 10^{-5} \text{ g día}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$) (Ballesteros-Martínez et al., 2020). Sin embargo, la PVA de nuestras películas es cuatro órdenes de magnitud mayor que la reportada para los plásticos comerciales 7.520×10^{-9} , 3.008×10^{-9} , 4.011×10^{-9} y $3.936 \times 10^{-9} \text{ g día}^{-1} \text{ m}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ para polietileno de baja densidad, polietileno de alta densidad, polipropileno y poliestireno respectivamente.

De lo anterior se concluye que la película diseñada en el presente trabajo tiene mejores valores de PVA que las diseñadas con otros biopolímeros, lo que la convierte en una buena opción para aplicar en diferentes alimentos de los que se quiera evitar la pérdida de agua o humedad, aunque no es comparable con la barrera que puede proporcionar un plástico comercial.

La transmisión de gases a través de un material de embalaje puede tener lugar a través de dos mecanismos: efecto de poro y efecto de solubilidad-difusión. En el primer caso, los gases atraviesan el material pasando a través de pequeños orificios o roturas en la estructura. En el segundo caso, la diferencia de concentración entre los dos lados del material de embalaje y la solubilidad de los gases en el material correspondiente determina el nivel de transmisión. La permeabilidad a vapor de agua es otro parámetro importante que considerar al momento de elegir películas poliméricas para el envasado de alimentos (Bastarrachea et al., 2011).

6.5.5 Solubilidad

Se estudió el porcentaje de solubilidad de las películas en agua (SW); tanto de las películas de CS y QT, como de su mezcla en relación 8:1 de CS:QT con y sin antimicrobianos los resultados se muestran en la Figura 15. Las películas de CS fueron prácticamente solubles en su totalidad ($SW = 98.2 \pm 1.7\%$), a diferencia de las basadas en QT, que mostraron una $SW = 61.2 \pm 2.6\%$. Las películas de CS:QT mostraron menores valores de SW que las de los biopolímeros solos, con $SW = 36.8 \pm 2.4\%$ para CS:QT y $38.8 \pm 2.1\%$ para CS:QT + LAE + NAT. La solubilidad mostrada por los tratamientos CS:QT con y sin adición de antimicrobianos no presentó diferencias significativas, lo cual permite asumir que es el resultado de la buena complejación alcanzada por los componentes y que los antimicrobianos no interfieren en ésta. Además, la complejación es probablemente también responsable de la disminución observada en el espesor, especialmente cuando se añaden los antimicrobianos (Tabla 6).

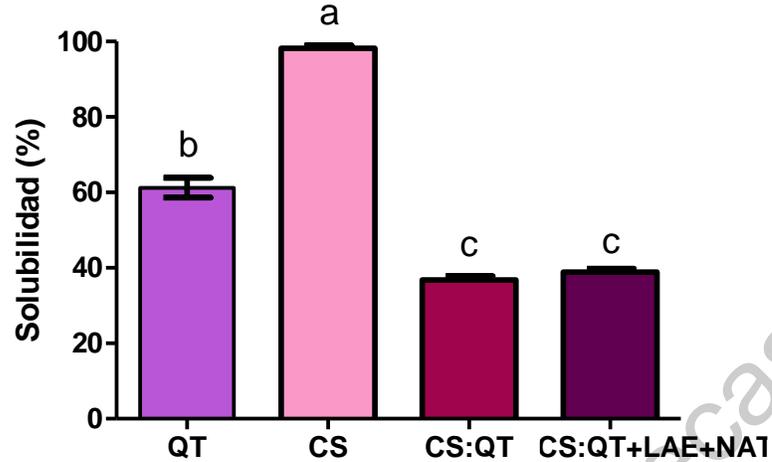


Figura 14. Porcentaje de solubilidad de las películas en agua. La barra de error corresponde a la desviación estándar. Barras con diferentes letras indican diferencia significativa de Tukey ($\alpha=0.05$).

Estos resultados son similares a los reportados por Bonilla y Sobral (2020), quienes evaluaron películas elaboradas con CS y QT, obteniendo una SW de 100 y 55.3 ± 1.6 %, respectivamente. Cuando mezclaron CS:gelatina (1:1 p/p) obtuvieron $SW = 30.96 \pm 2.64$ % QT:gelatina (1:1 p/p) una $SW = 42.82 \pm 1.90$ %.

De igual manera, Ríos de Benito (2020) obtuvo SW de entre 35 y 45 % para películas de CS y QT. Esto indica una buena formación del complejo CS:QT, lo que sugiere un aumento de su hidrofobicidad y le confiere buenas propiedades para evitar la pérdida de humedad de los alimentos.

El parámetro de solubilidad involucra la transferencia de las moléculas de agua a través de la matriz polimérica, generalmente seguido de la disrupción de las fuerzas de Van der Waals entre las cadenas poliméricas; es una propiedad importante que debe considerarse al momento de la caracterización de una película, ya que determinará si su aplicación sobre un alimento específico será o no adecuada (Cecchini et al., 2017; Quiroz, 2020).

6.5.6 Estructura de las películas comestibles

La estructura y microestructura final de las películas es el resultado de las interacciones entre sus componentes, así como los fenómenos de desestabilización que puedan tener lugar durante la etapa de secado (Ríos de Benito, 2020).

6.5.6.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La película de CS (Fig. 16A) presenta algunos poros sobre su superficie y se ven pequeñas grietas cuando aumenta la magnificación de la micrografía. La película de QT (Fig. 16B) se observa que presenta una superficie completamente lisa, mientras que la película de CS:QT (Fig. 16C) presenta poros al igual que la película de CS, aunque con grietas un poco más pronunciadas. Por otro lado, al adicionar los antimicrobianos (Fig. 16D) las grietas y poros se ven disminuidos en gran medida.

La película de CS:QT+LAE+NAT muestra una estructura diferente a la reportada para películas de CS:QT+micropartículas partículas de sílice cargadas con aceite esencial de orégano (MSN-OEO) (Ríos de Benito, 2020). Las MSN-OEO quedaban embebidas sobre la superficie de la película, mientras que LAE y NAT del presente trabajo se integran en su totalidad a la película, reduciendo las grietas y poros de su superficie. Esta característica indica una buena interacción de los antimicrobianos con los biopolímeros mejorando la compatibilidad del sistema multicomponente. Un comportamiento similar fue descrito por Xu et al. (2021), quienes reportaron que la adición de LAE a una película elaborada con QT y hydroxypropyl- β -cyclodextrina (HPCD) mejoró en gran medida la superficie de la película al reducir las grietas y el tamaño de poros presentes en ésta.

La mejora en la estructura superficial de las películas de CS:QT+ LAE + NAT puede asociarse a las interacciones entre los grupos carbonilo de LAE y natamicina con los grupos amino de QT, y de las cadenas laterales de los aminoácidos del CS. Asimismo, pudiera existir interacción entre los grupos amino de los antimicrobianos

y los grupos carboxilo de los residuos de aminoácidos del CS que no interaccionaron con el QT.

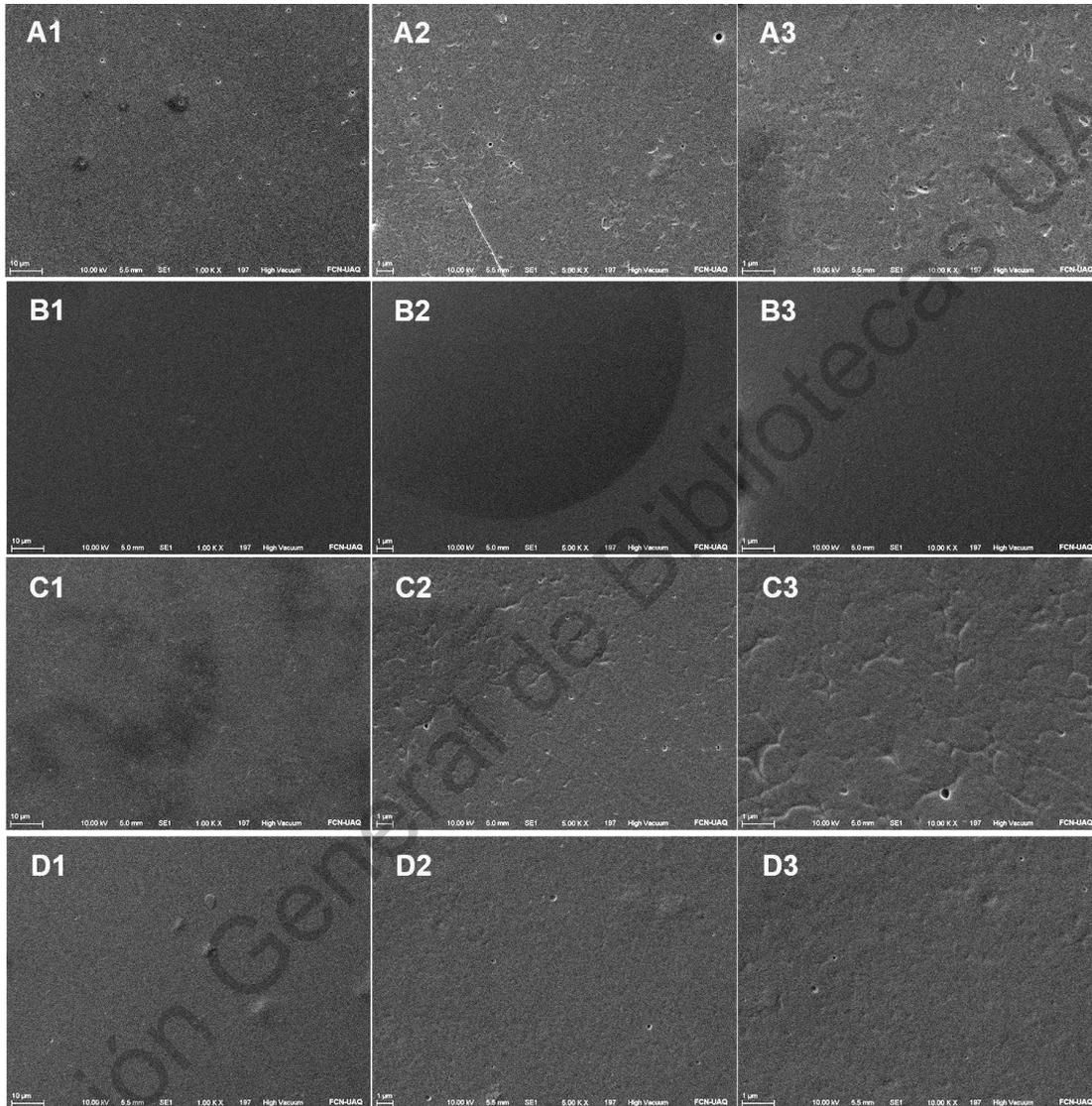


Figura 15. Microestructura de las películas de CS (A), QT (B), CS: QT (C) y CS:QT + LAE + NAT (D) a diferentes aumentos: 1 000X (1), 5 000X (2) y 10 000X (3).

6.5.6.2 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Con ayuda de la AFM se obtuvieron imágenes topográficas para evaluar las rugosidades de la superficie de las películas de los tratamientos CS:QT con y sin adición de antimicrobianos. Las imágenes representativas en 3D, para áreas de

exploración de 30X30 μm se muestran en la Figura 17, donde se logra observar una mayor rugosidad en las películas sin adición de antimicrobianos (Fig. 17A).

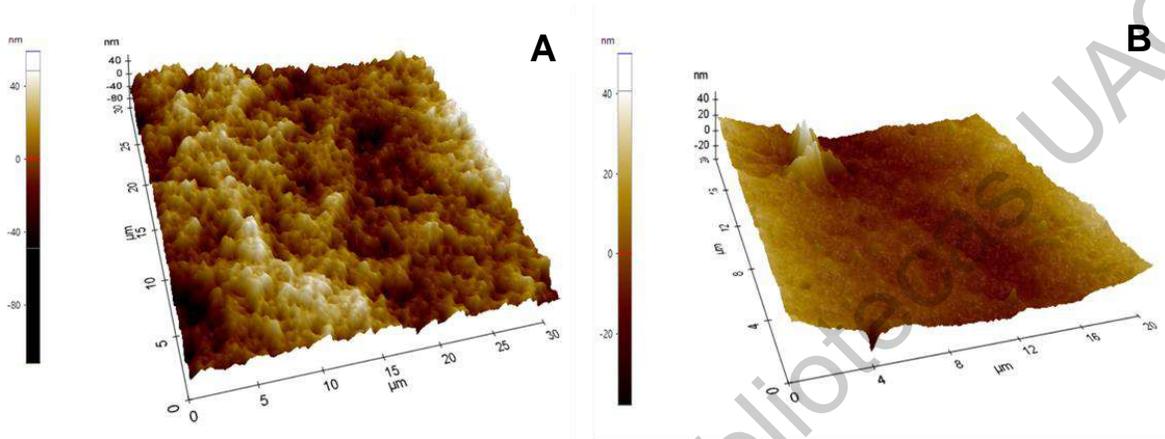


Figura 16. Gráfico en 3D obtenido por AFM de las películas de CS:QT (A) y CS:QT+LAE+NAT (B).

La superficie de las películas nos muestra como la rugosidad disminuye drásticamente con la adición de los antimicrobianos (Figura 17B), indicando que los antimicrobianos mejoran la compatibilidad de los componentes del sistema y ayudan a la complejación del CS con el QT al momento de la formación de la red tridimensional. De la misma manera, en la formulación sin adición de antimicrobianos se observa un aumento de los valores R_a y R_q , utilizando un área de exploración de $5 \times 5 \mu\text{m}$ como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Parámetros de rugosidad de las películas de CS:QT con y sin adición de antimicrobianos

Tratamiento	R_q (nm)	R_a (nm)
CS:QT	9.332 ± 0.490^a	7.436 ± 0.267^a
CS:QT + LAE +NAT	2.426 ± 0.504^b	1.406 ± 0.146^b

Los resultados se reportan como el promedio \pm la desviación estándar ($n=3$). Letras distintas indican diferencia significativa de Tukey ($\alpha=0.05$).

En la tabla 7 encontramos que existe diferencia significativa entre los tratamientos evaluados, siendo la rugosidad del tratamiento sin antimicrobianos cerca de cuatro y cinco veces mayor que la del tratamiento con antimicrobianos para R_q y R_a , respectivamente.

6.5.7 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

En general, los espectros FTIR de las películas de CS:QT se mantienen altamente similares al espectro de la película que solo contiene CS, esto es debido a que el CS constituye el 65 % del total de sólidos presentes en las películas de las mezclas (Figura 18).

El espectro de la película de CS o la combinación CS:QT, exhibieron bandas principales en regiones alrededor de 3280 cm^{-1} (amida A), 2930 cm^{-1} (amida B), 1640 cm^{-1} (amida I), 1540 cm^{-1} (amida II) y 1240 cm^{-1} (amida-III), asignados al estiramiento de NH junto con enlaces de hidrógeno, vibraciones de estiramiento asimétrico de CH y NH_3^+ , estiramiento de C=O / enlace de hidrógeno junto con COO^- (láminas β), estiramientos CN fuera de fases de combinación y modos de deformación NH en el plano del grupo peptídico y fluctuación en el plano de los grupos C-N y N-H de la amida unida o fluctuación del grupo CH_2 de la glicina, respectivamente (Arrieta et al., 2013; Jahromi et al., 2020). Las bandas identificadas en aproximadamente 1400 , 1040 y 925 cm^{-1} podrían atribuirse al grupo carboxilato (O-C-O), al estiramiento del enlace CO con la glicerina (plastificante) y a las interacciones monocatónicas con Na^+ , respectivamente (Kajthunyakarn et al., 2019). El pico a 2875 cm^{-1} corresponde a estiramiento de CH (terciario) (Pereda, Aranguren & Marcovich, 2007).

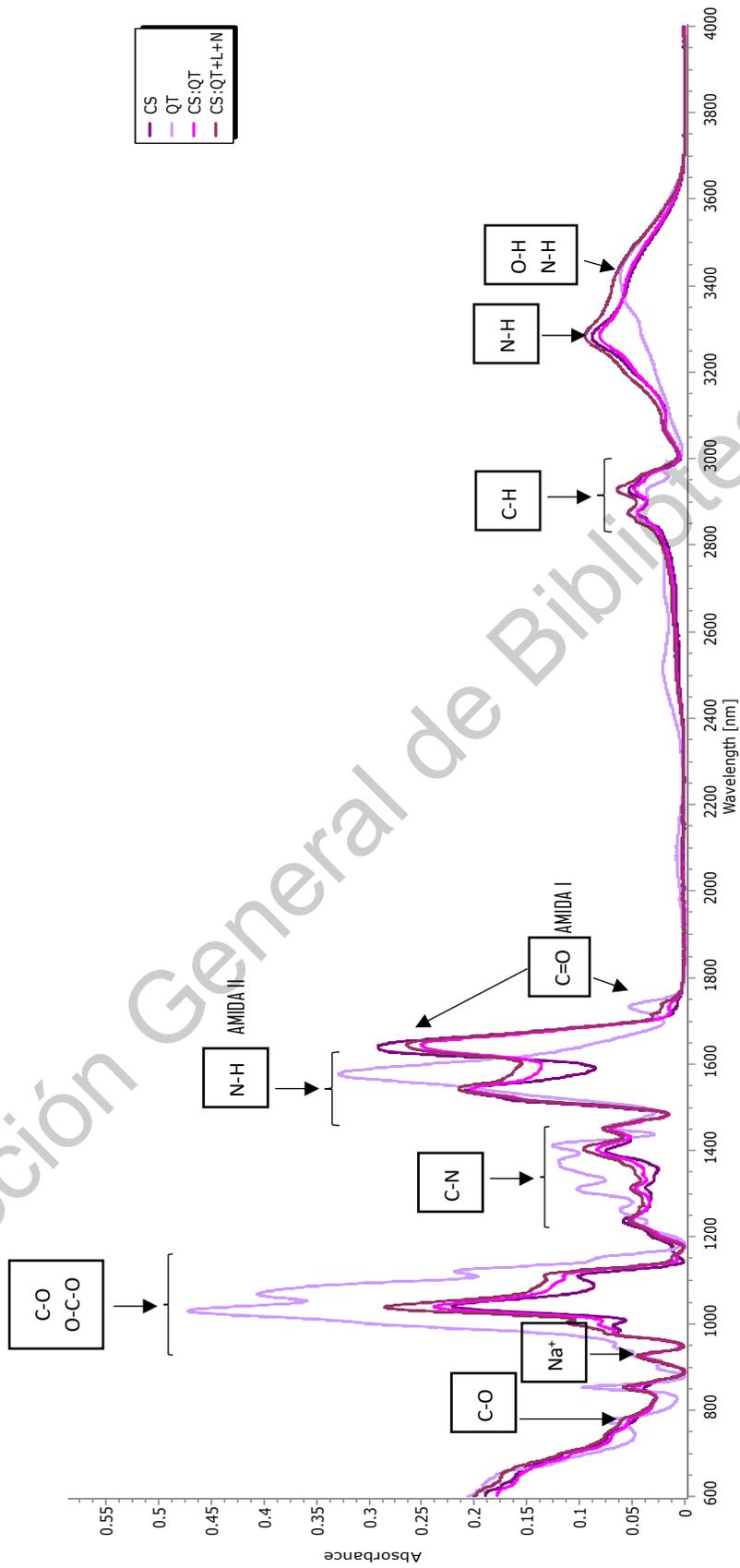


Figura 17. Espectros FTIR de películas comestibles (QT, CS, CS:QT y CS:QT+LAE+NAT)

El espectro de QT mostró las principales bandas características de este biopolímero, incluida una banda ancha ubicada en 3450 cm^{-1} , que corresponde a las vibraciones de estiramiento O-H y N-H, y una banda alrededor de 2875 cm^{-1} que es de la vibración simétrica y asimétrica del enlace sencillo C-H. Además, las bandas a 1730 y 1575 cm^{-1} se atribuyen al estiramiento del doble enlace de C=O (amida I) del anillo aromático y a la flexión del enlace sencillo de N-H (amida II), respectivamente. Las bandas ubicadas en 1310 , 1028 y 852 cm^{-1} corresponden a la estructura del sacárido, en donde se puede observar el estiramiento del enlace sencillo C-N, del estiramiento simétrico del enlace C-O-C y de las vibraciones del estiramiento del enlace sencillo C-O respectivamente (Costa et al., 2021).

Además de los picos de absorción característicos del CS y el QT, no aparecieron nuevos picos de absorción en los espectros FT-IR de las películas CS:QT ni CS:QT+LAE+NAT, este efecto es indicativo de la interacción de los grupos amino del quitosano con los grupos carboxilo cargados negativamente del caseinato durante la complejación de la película, infiriéndose que no se produjeron cambios químicos (interacciones covalentes) durante la mezcla ni por la adición de antimicrobianos, por lo que la interacción del complejo debería ser electrostática (Yuan et al., 2021). En un ambiente ácido, el grupo amino del quitosano (NH_2) puede encontrarse protonado (NH_3^+) pudiendo formar interacciones con los grupos aniónicos de otros biopolímeros como los grupos carboxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos del caseinato de sodio que de igual manera interacciona con los aminos de la natamicina y del arginato láurico, lo que explica la buena complejación de la película activa.

6.5.8 Actividad antimicrobiana

Se determinó la actividad antimicrobiana de la película con adición de antimicrobianos y para discriminar que el efecto sea debido a estos y no a los biopolímeros utilizados, se evaluaron películas de cada componente (CS y QT) así

como su mezcla sin adición de antimicrobianos (CS:QT) y los resultados se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Diámetros de inhibición correspondientes a la actividad antimicrobiana de las películas de biopolímeros realizadas en este trabajo y su mezcla con agentes antimicrobianos. Diámetros de inhibición en cm.

Tratamiento	Microorganismo		
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Penicillium expansum</i>
QT	ND	4.90 ± 0.36 ^a	ND
CS	ND	ND	ND
CS:QT	ND	2.77 ± 0.08 ^c	ND
CS:QT+LAE+NAT	3.09 ± 0.05 ^a	3.27 ± 0.17 ^b	4.89 ± 0.14 ^a

Los datos corresponden al promedio ± la desviación estándar (n=3). Letras distintas indican diferencia significativa de Tukey ($\alpha=0.05$). ND= No detectable. QT: Quitosano; CS: Caseinato de sodio; CS:QT: Caseinato de sodio y quitosano (8:1) y CS:QT+LAE+NAT: Caseinato de sodio y quitosano (8:1) con adición de antimicrobianos.

Los antimicrobianos utilizado en el recubrimiento cumplen un espectro de inhibición contra bacterias Gram (+), Gram (-) y mohos, por lo que se evaluó un microorganismo para cada uno de ellos *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* y *Penicillium expansum* respectivamente.

La película de QT solo presentó halo de inhibición contra *Salmonella Typhimurium* (Tabla 8) alcanzando un diámetro de inhibición de 4.90±0.36 cm, cabe mencionar que, al colocar la película sobre la superficie del agar, ésta se hidrataba y extendía sobre la superficie (Anexo 4A).

La película de CS no presentó halo de inhibición contra ningún microorganismo (Tabla 8) y considerando que las películas mezcladas contienen 65 % de este biopolímero, no proporcionará efecto antimicrobiano.

La película de CS:QT, solo presentó halo de inhibición contra *Salmonella Typhimurium* (Anexo 4C), alcanzando un diámetro de inhibición de 2.77 ± 0.08 cm, este valor es inferior al alcanzado por la película de QT, y esto se debe a la proporción de quitosano presente en la película es aproximadamente del 11.1 % en comparación con el 100 % de la película de QT.

La película de CS:QT+LAE+NAT presentó halo de inhibición contra los tres microorganismos (Tabla 8), alcanzando un diámetro de inhibición de 3.09 ± 0.05 cm contra *S. Typhimurium*, 3.27 ± 0.17 cm contra *L. monocytogenes* y 4.89 ± 0.14 cm contra *P. expansum*. Con estos datos observamos que la proporción de antimicrobianos adicionada al recubrimiento es suficiente para conseguir la inhibición esperada, mientras que en relación con la inhibición de *S. Typhimurium* se ve potenciada con la adición del LAE en comparación de la película que no lo contiene.

Se han reportado actividades de inhibición de LAE contra *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *Escherichia coli* O157:H7, *S. Enteritidis*, *S. enterica*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* y *Zygosaccharomyces bailii* (Ma et al., 2020). Por su parte, la natamicina ha mostrado inhibición contra *Aspergillus alternata*, *A. solani*, *A. niger*, *Fusarium semiseptum*, *Penicillium spp*, *P. chrysogenum*, *P. commune*, *P. digitatum* y *P. roqueforti* (Nguyen Van Long et al, 2016); demostrando la capacidad de inhibición de ambos antimicrobianos. Nuestros resultados indican que las concentraciones utilizadas fueron las adecuadas para mantener la inhibición contra los tres microorganismos.

6.6 Bioconservación de queso fresco

De acuerdo con lo planteado en el diseño experimental se tuvieron 4 tratamientos de queso a los cuales se les determinaron parámetros fisicoquímicos y microbiológicos indicadores de calidad e inocuidad durante un almacenamiento de 30 d en condiciones de refrigeración considerando como control al tratamiento QC.



Figura 18. Evaluación de queso fresco al día 30 de almacenamiento en refrigeración. A: queso control (QC); B: queso conteniendo microcápsulas de *L. lactis* UQ2 (QM); C: queso con recubrimiento activo (QR); D: queso con recubrimiento activo, conteniendo microcápsulas de *L. lactis* UQ2 (QRM).

En la Figura 19 se observan los quesos a los 30 d de almacenamiento en refrigeración. Como podemos observar, el único tratamiento que presenta manchas de color café en alguna parte de su superficie es el correspondiente a QC, mientras que los que incluyen el recubrimiento y/o las microcápsulas de *L. lactis* UQ2 no presentan características visuales de degradación.

6.6.1 Pérdida de peso

En la figura 20 se presenta el porcentaje de pérdida de peso de los tratamientos a través del tiempo de almacenamiento, ya que la pérdida de peso implica la pérdida de suero y, por lo tanto, de humedad. Los quesos suaves, como el

queso fresco, tienen una vida útil corta debido a su alto contenido de humedad y susceptibilidad al deterioro microbiano. Por lo que se requieren envases adecuados para evitar que los quesos frescos pierdan humedad porque pueden deshidratarse fácilmente y escurrir gradualmente (Jafarzadeh et al., 2021).

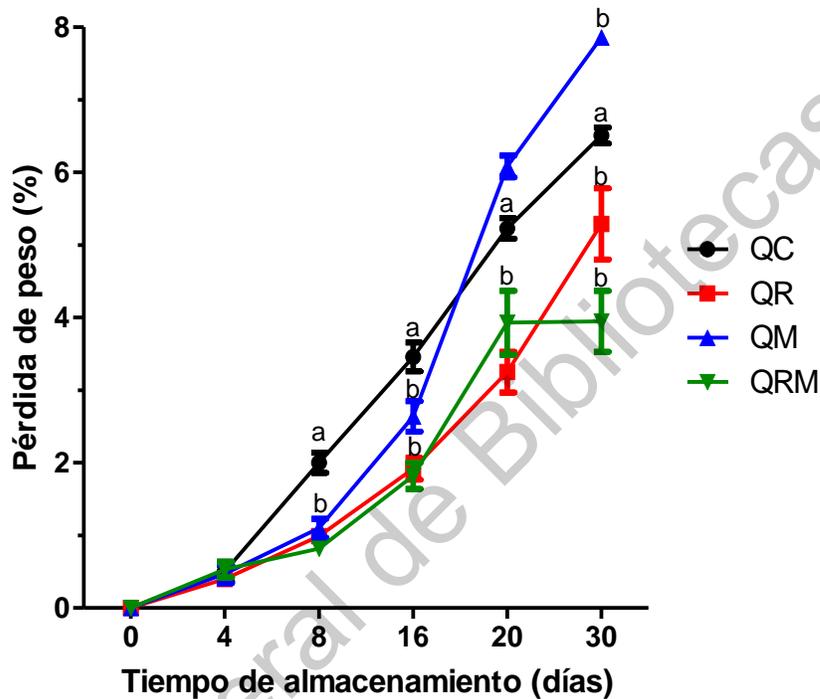


Figura 19. Porcentaje de pérdida de peso de los quesos almacenados en refrigeración a través del tiempo. Queso control (QC); queso conteniendo microcápsulas de *L. lactis* UQ2 (QM); queso con recubrimiento activo (QR); queso con recubrimiento activo, conteniendo microcápsulas de *L. lactis* UQ2 (QRM).

El porcentaje de pérdida de peso se calculó por comparación contra el peso al día 0 y presentó diferencia significativa a partir de los 8 d de almacenamiento. Para los quesos recubiertos esta diferencia significativa implica una pérdida de peso inferior a la presentada por el queso control durante todo el periodo de almacenamiento. Sin embargo, para el tratamiento QM (con adición de microcápsulas de *L. lactis* UQ2) la diferencia significativa implicó una pérdida de peso inferior a la del control solo a los 8 y 16 d de evaluación, mientras que para el día 30 la diferencia implicó una mayor pérdida de peso en comparación con el control. Este

comportamiento se puede atribuir a la fermentación *in situ* que lleva a cabo *Lactococcus lactis* UQ2 en la matriz del queso, provocando un desuerado considerable.

A los 30 d de almacenamiento, el QC tuvo una pérdida de peso total de 5.52 ± 0.10 %, mientras que QM presentó 7.86 ± 0.07 %, QR 5.29 ± 0.49 % y QRM 3.95 ± 0.42 %, presentando todos los tratamientos una diferencia significativa contra el control (QC) al utilizar la prueba de Dunnette ($\alpha=0.05$). Ramos et al. (2012), reportaron pérdidas de peso de 5.32 ± 0.24 % y 11.55 ± 0.45 % para quesos semiduros usando un recubrimiento de aislado de proteína de suero y varios agentes antimicrobianos y sin recubrir respectivamente. De manera general, esta pérdida de peso se atribuye a la pérdida de suero por exudación asociada a los quesos frescos, cuando se pierde exceso de humedad el queso tiende a oscurecerse por la desecación de la superficie como reporta Ríos de Benito (2020).

6.6.2 Color

Los valores de color de las muestras de queso fresco a los 30 d de almacenamiento en refrigeración de los diferentes tratamientos utilizados se muestran en la Tabla 9. El parámetro L^* (luminosidad) se redujo para todos los tratamientos de queso durante el período de almacenamiento, el mismo comportamiento se observó para los parámetros a^* y b^* (color verde y amarillo, respectivamente), donde para todos los tratamientos de queso disminuyó al final del período de almacenamiento sin presentar diferencias significativas para L^* ni para b^* , y para a^* solo el tratamiento QRM (con adición de recubrimiento activo y microcápsulas de *L. lactis* UQ2) presentó diferencias a los d 8 y 16.

Tabla 9. Cambios en parámetros de color (L*, a*, b*) de superficie de queso fresco.

Almacenamiento				
(D)	QC	QM	QR	QRM
L*				
0	88.86 ± 1.23 ^a	88.68 ± 1.46 ^a	88.36 ± 1.49 ^a	88.74 ± 1.38 ^a
4	88.28 ± 1.38 ^a	87.83 ± 1.78 ^a	88.14 ± 1.47 ^a	87.83 ± 1.57 ^a
8	87.48 ± 0.67 ^a	88.11 ± 0.91 ^a	88.06 ± 1.00 ^a	87.98 ± 0.88 ^a
16	87.90 ± 1.68 ^a	88.45 ± 1.29 ^a	88.20 ± 0.82 ^a	88.22 ± 1.26 ^a
20	87.72 ± 1.53 ^a	88.02 ± 1.82 ^a	87.13 ± 1.52 ^a	88.06 ± 0.76 ^a
30	87.11 ± 1.65 ^a	88.02 ± 0.88 ^a	88.47 ± 1.41 ^a	88.31 ± 1.22 ^a
a*				
0	-0.35 ± 0.04 ^a	-0.35 ± 0.06 ^a	-0.30 ± 0.09 ^a	-0.26 ± 0.07 ^a
4	-0.20 ± 0.06 ^a	-0.11 ± 0.10 ^a	-0.17 ± 0.13 ^a	-0.17 ± 0.10 ^a
8	-0.16 ± 0.12 ^a	-0.11 ± 0.12 ^a	-0.11 ± 0.19 ^a	0.04 ± 0.11 ^b
16	-0.03 ± 0.14 ^a	-0.06 ± 0.14 ^a	0.12 ± 0.13 ^a	0.18 ± 0.09 ^b
20	-0.01 ± 0.26 ^a	-0.06 ± 0.16 ^a	-0.09 ± 0.29 ^a	-0.07 ± 0.23 ^a
30	0.10 ± 0.21 ^a	-0.01 ± 0.22 ^a	-0.04 ± 0.20 ^a	-0.05 ± 0.24 ^a
b*				
0	10.21 ± 0.62 ^a	10.11 ± 0.70 ^a	10.17 ± 0.56 ^a	10.16 ± 0.36 ^a
4	10.29 ± 1.34 ^a	9.93 ± 1.34 ^a	9.84 ± 0.96 ^a	9.91 ± 0.71 ^a
8	10.39 ± 1.30 ^a	10.63 ± 1.42 ^a	9.93 ± 0.81 ^a	10.04 ± 1.21 ^a
16	9.79 ± 1.62 ^a	10.07 ± 1.41 ^a	9.42 ± 1.49 ^a	9.45 ± 1.74 ^a
20	9.75 ± 1.60 ^a	9.81 ± 1.39 ^a	9.37 ± 1.16 ^a	9.57 ± 1.61 ^a
30	10.25 ± 1.70 ^a	10.10 ± 1.16 ^a	9.46 ± 1.40 ^a	9.6 ± 1.42 ^a

Los datos corresponden al promedio ± la desviación estándar (n=3). Valores con diferentes letras indican diferencia significativa de Dunnett ($\alpha=0.05$). Queso control (QC); queso conteniendo microcápsulas de *L. lactis* UQ2 (QM); queso con recubrimiento activo (QR); queso con recubrimiento activo, conteniendo microcápsulas de *L. lactis* UQ2 (QRM).

Con los datos encontrados podemos concluir que ni la adición de las microcápsulas de *L. lactis* UQ2 ni el recubrimiento alteran el color de los quesos ni al inicio, ni a través del almacenamiento, ya que todos exhibieron una superficie totalmente blanca, a excepción del día 30, donde la muestra de QC presentó una

coloración oscura en algunas zonas de la superficie (Figura 19), sin embargo, no se vio reflejado en los parámetros de color L*, a*, b*. El color juega un parámetro de aceptación importante en los alimentos, ya que sus cambios podrían afectar la calidad final del producto.

6.6.3 Grasa y proteína

El contenido de proteína (%) y grasa (%) se analizó al día 0 de elaboración del queso fresco, los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Contenido de grasa y proteína de queso fresco.

Almacenamiento (d)	Proteína (%)	Grasa (%)
0	17.0 ± 0.5	19.6 ± 0.3

Los datos corresponden al promedio ± la desviación estándar (n=3).

El queso fresco se caracteriza por tener un contenido de grasa de entre 14 y 29 %, así como un contenido de proteína de entre 15 y 21 % (González-Córdoba et al, 2016), por lo que los resultados obtenidos para el queso se encuentran dentro de especificación.

6.6.4 pH y acidez láctica

Para los valores de pH, en todos los tratamientos se observa una ligera tendencia a disminuir hacia el final del periodo de almacenamiento manteniendo un comportamiento constante sin presentar diferencia significativa entre tratamientos (Figura 21). Comportamientos similares sin cambios en pH durante el periodo de almacenamiento han sido reportados por Ramos et al., (2012) y Berti et al. (2019), en queso semimadurado y queso Gouda respectivamente.

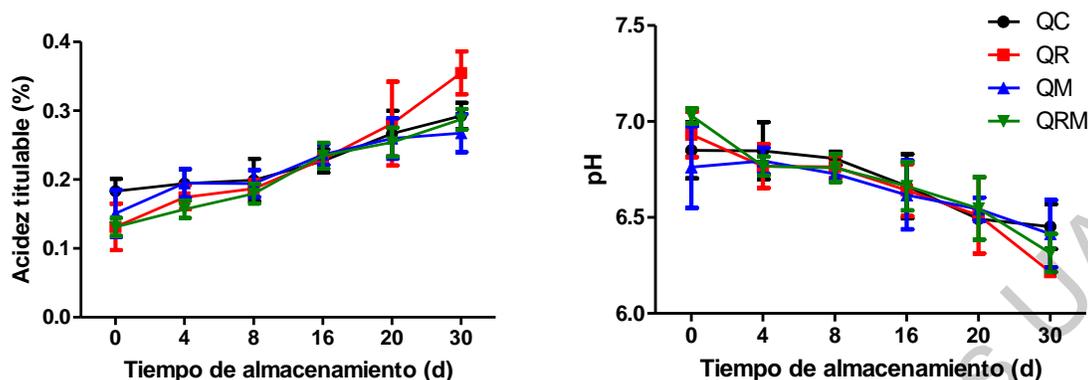


Figura 20. Contenido de acidez titulable (% ácido láctico) y pH en queso fresco a través del tiempo en almacenamiento bajo condiciones de refrigeración. Queso control (QC); queso conteniendo microcápsulas de *L. lactis* UQ2 (QM); queso con recubrimiento activo (QR); queso con recubrimiento activo, conteniendo microcápsulas de *L. lactis* UQ2 (QRM).

El control de la acidez es fundamental para la calidad del queso, ya que una alta acidez puede asociarse con sabor y atributos de textura deficientes (Ibáñez et al., 2019). En el presente trabajo se observó que todos los tratamientos presentan ligera tendencia a aumentar la acidez conforme avanza el periodo de almacenamiento, sin embargo, se presenta un comportamiento con pequeños altibajos y no se presentan diferencias significativas de los tratamientos contra el control ($\alpha < 0.05$). En conclusión, ni la adición de *L. lactis* UQ2 microencapsulado ni la adición del recubrimiento activo tienen efecto sobre el pH y acidez del queso fresco. Al-Moghazy et al. (2021), reportaron conclusiones similares para queso Karish recubierto con quitosano y aceites esenciales; además de que Mulkyte et al. (2017), reportaron varias cepas de *L. lactis* productoras de nisina con pobre actividad acidificante y la cepa utilizada en el presente trabajo podría ubicarse dentro de esta especificación, bajo las condiciones de los experimentos realizados.

6.6.5 Microbiología del queso fresco

Para evaluar el efecto de bioconservación por la adición de *L. lactis* UQ2 microencapsulado y la aplicación del recubrimiento activo, se evaluaron los

microorganismos indicados por la NOM-243-SSA1-2010 los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Microbiología de queso fresco durante almacenamiento por 30 d a 4 °C.

Almacenamiento (d)	Microorganismos					
	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	Coliformes fecales (NMP)	Hongos y levaduras (UFC/g)	
QC	0	Ausencia	Ausencia	<100	<30	<10 ± 0.0 ^a
	4	NA	NA	NA	<30	20 ± 0.0 ^a
	8	NA	NA	NA	<30	375 ± 7.1 ^a
	16	NA	NA	NA	<30	515 ± 106.1 ^a
	20	NA	NA	NA	<30	3750 ± 353.6 ^a
	30	NA	NA	NA	<30	54500 ± 707.1 ^a
QM	0	Ausencia	Ausencia	<100	<30	<10 ± 0.0 ^a
	4	NA	NA	NA	<30	10 ± 0.0 ^a
	8	NA	NA	NA	<30	50 ± 14.1 ^b
	16	NA	NA	NA	<30	120 ± 14.1 ^b
	20	NA	NA	NA	<30	485 ± 77.8 ^b
	30	NA	NA	NA	<30	17500 ± 707.1 ^b
QR	0	Ausencia	Ausencia	100	<30	<10 ± 0.0 ^a
	4	NA	NA	NA	<30	10 ± 0.0 ^a
	8	NA	NA	NA	<30	10 ± 0.0 ^b
	16	NA	NA	NA	<30	360 ± 28.3 ^b
	20	NA	NA	NA	<30	395 ± 7.1 ^b
	30	NA	NA	NA	<30	3500 ± 424.3 ^b
QRM	0	Ausencia	Ausencia	<100	<30	<10 ± 0.0 ^a
	4	NA	NA	NA	<30	10 ± 0.0 ^a
	8	NA	NA	NA	<30	75 ± 7.1 ^b
	16	NA	NA	NA	<30	195 ± 134.4 ^b
	20	NA	NA	NA	<30	275 ± 7.1 ^b
	30	NA	NA	NA	<30	3400 ± 282.8 ^b

Los datos corresponden a la media ± la desviación estándar (n=2). Valores con diferentes letras indican diferencia significativa (Dunnett $\alpha=0.05$). Queso control (QC); queso conteniendo microcápsulas de *L. lactis* UQ2 (QM); queso con recubrimiento activo (QR); queso con recubrimiento activo, conteniendo microcápsulas de *L. lactis* UQ2 (QRM).

Todos los tratamientos provienen de la misma cuajada, es por esto por lo que el análisis para los microorganismos patógenos solo se realizó al tiempo 0 de almacenamiento. En todos los tratamientos se obtuvo ausencia de *Salmonella* spp,

L. monocytogenes y *Staphylococcus aureus*, al igual que un valor de coliformes fecales <30 NMP/g para todos los tratamientos en todos los tiempos de evaluación, indicando que los quesos elaborados para evaluar la bioconservación eran inocuos. Sin embargo, los resultados para mohos y levaduras presentaron una tendencia a aumentar con el tiempo de almacenamiento como se puede observar en la Figura (22).

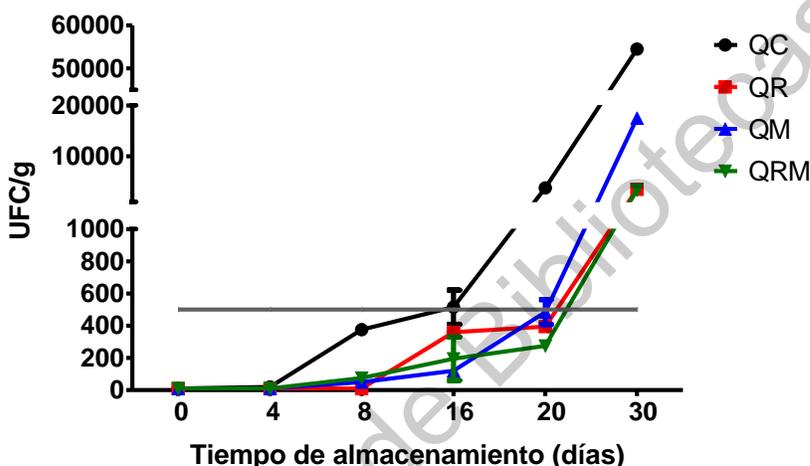


Figura 21. Población de mohos y levaduras presente en queso fresco a los 30 d de almacenamiento en condiciones de refrigeración. La línea gris es la población máxima permitida. Queso control (QC); queso conteniendo microcápsulas de *L. lactis* UQ2 (QM); queso con recubrimiento activo (QR); queso con recubrimiento activo, conteniendo microcápsulas de *L. lactis* UQ2 (QRM).

Por normatividad vigente mexicana, el límite máximo permitido de mohos y levaduras es de 500 UFC/g, con esta información podemos observar que el QC a los 16 d de almacenamiento ya se encuentra fuera de especificación, mientras que el tratamiento QM se encuentra fuera de especificación a partir del día 20 y los tratamientos que incluyen el recubrimiento QR y QRM hasta el día 30 se encontraron fuera de especificación. Es importante resaltar que a pesar de que al día 30 los quesos QR y QRM se encuentran fuera de especificación, tienen una población 10 veces menor que la población presente en el queso QM, mostrando claramente el efecto de bioconservación conseguido por la adición de los tratamientos.

Otro de los parámetros microbiológicos evaluado en los quesos, fue la población de *L. lactis* UQ2 y la producción de nisina *in situ*, estos resultados se muestran en la Figura (23). Se observa que la producción de nisina muestra una tendencia a aumentar a través del tiempo de almacenamiento, alcanzando concentraciones de $0.12 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$ tanto para QM como para QRM, actualmente la normatividad mexicana tolera una adición de 12.5 ppm (12.5 mg/kg) de nisina pura en queso, por lo que se sugiere incrementar el inóculo de *L. lactis* UQ2 para incrementar la producción de nisina *in situ* en queso fresco, ya que los valores alcanzados en este estudio fueron muy inferiores a lo permitido.

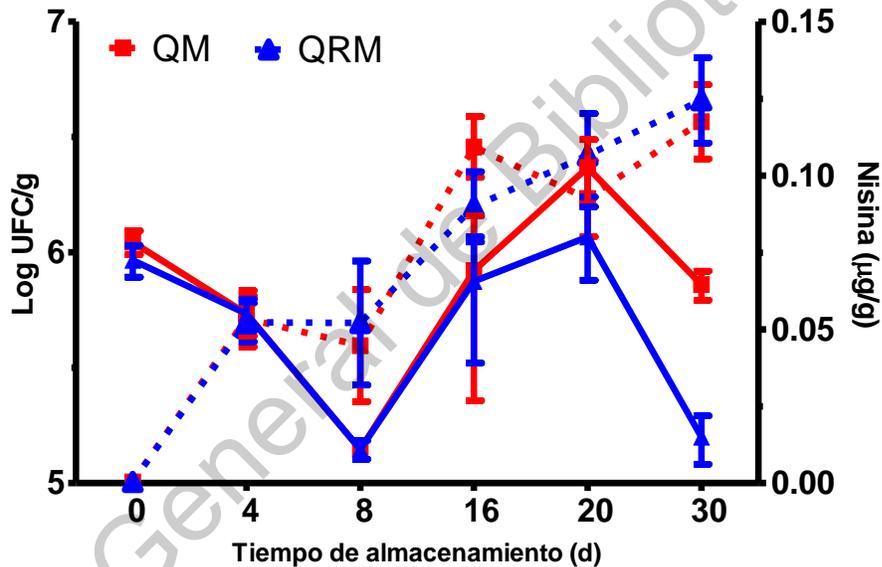


Figura 22. Población de *L. lactis* UQ2 (-) y producción de nisina *in situ* (--) en queso fresco. Queso conteniendo microcápsulas de *L. lactis* UQ2 (QM); queso con recubrimiento activo, conteniendo microcápsulas de *L. lactis* UQ2 (QRM).

En lo que respecta a la población de *L. lactis* UQ2 observamos una población inicial cercana a 6 Log de UFC/g, esta población disminuye en casi 1 Log al día 8 de almacenamiento, después del cual muestra una fase de crecimiento exponencial hasta el día 20, posterior al cual se reduce nuevamente la población en casi 1 Log. El decremento poblacional entre los 0 y 4 d de almacenamiento se asocia con el periodo de adaptación a la matriz alimentaria y a las condiciones de temperatura en

refrigeración, mientras que el decremento entre los 20 y 30 d de almacenamiento se atribuye a una fase de muerte celular.

6.6.5.1 Reto antimicrobiano contra *L. monocytogenes* en queso fresco

Como el queso elaborado para el presente trabajo fue inocuo, se adicionó *L. monocytogenes* al queso para poder evaluar la actividad antimicrobiana de nuestros tratamientos contra este patógeno en específico.

En la figura 24A se muestra la población de *L. lactis* UQ2 y la síntesis de nisina a través del tiempo, encontrando que durante todo el periodo de almacenamiento hubo síntesis de nisina, mientras que en la figura 24B encontramos que, a pesar de la alta síntesis de nisina a través del tiempo, a partir del día 8, se tiene un crecimiento exponencial de *L. monocytogenes*, lo que nos muestra la protección que sus factores de adaptación le confieren. Ya que las bacterias pueden detectar y responder a los factores estresantes de la envoltura celular, como lo es la temperatura baja, a través de factores sigma alternativos y/o sistemas de dos componentes (TCS). *L. monocytogenes* alberga al menos 15 TCS, cuatro de los cuales se ha informado que desempeñan un papel crítico en la regulación de la respuesta al estrés de la envoltura celular mediante la adición de D-alanina a los ácidos lipoteicoicos y modificando la membrana celular mediante la adición de lisina a los fosfolípidos, lo que resulta en una carga positiva neta de la envoltura celular (Henderson et al., 2020). Con lo anterior, y conociendo que se han propuesto varios factores para explicar las limitaciones de acción de la nisina en ciertos productos lácteos, entre ellos: la falta de estabilidad de la nisina a pH neutro, la posibilidad de que la nisina se atrape en los glóbulos de grasa, que la nisina catiónica se une a la caseína aniónica, así como la presencia de cationes divalentes que bloquean el acceso a los fosfolípidos de la membrana celular, lo cual podría interferir en la acción sobre *L. monocytogenes* (Ibarra-Sánchez et al., 2020).

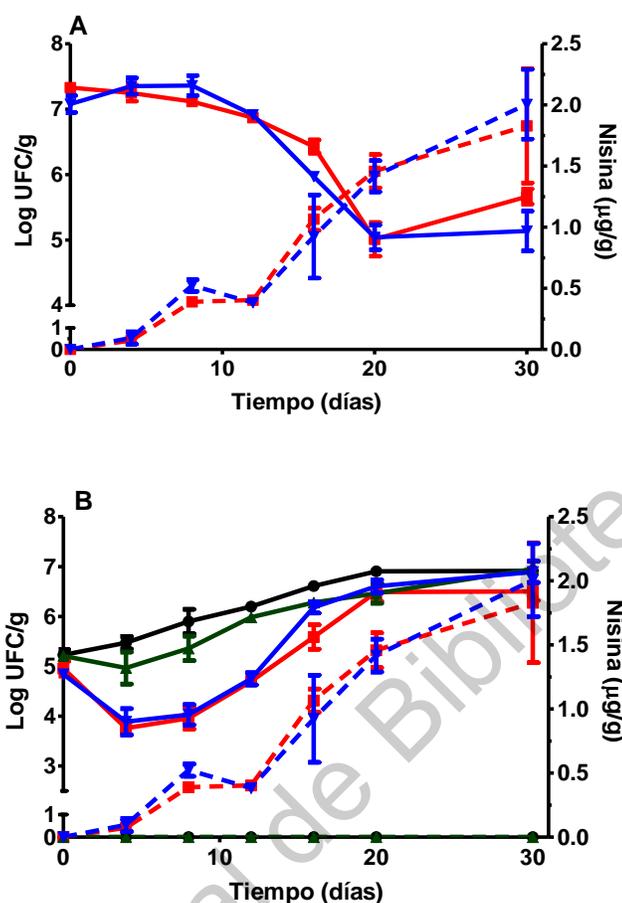


Figura 23. Reto antimicrobiano de inhibición *in situ* de los tratamientos contra *L. monocytogenes* en queso fresco almacenados en refrigeración. A: Población de *L. lactis* UQ2 y producción de nisina, como función del tiempo de almacenamiento, para los quesos QM y QRM. B: Población de *L. monocytogenes* y concentración de nisina como función del tiempo de almacenamiento. Población de *L. lactis* UQ2 (—), población de *L. monocytogenes* (—) y producción de nisina *in situ* (---) en queso fresco. Queso control (QC) en negro; queso conteniendo microcápsulas de *L. lactis* UQ2 (QM) en rojo; queso con recubrimiento activo (QR) en verde; queso con recubrimiento activo, conteniendo microcápsulas de *L. lactis* UQ2 (QRM) en azul.

La población de *L. lactis* UQ2 adicionada a los tratamientos QM y QRM (Figura 24A y 24B) fue de aproximadamente 7 Log UFC/g que se mantuvieron constantes hasta el día 8 y luego disminuyó hasta alcanzar 5 log a los 20 d de almacenamiento. Este comportamiento se atribuye a las condiciones adversas que se presentan para el microorganismo, ya que el almacenamiento a 4 °C y la presencia de *L. monocytogenes* son tipos de estrés que, probablemente provocan que *L. lactis* alargue su fase de adaptación.

En lo referente a la producción *in situ* de nisina pura (Figs. 24A y 24C), se observó una producción constante a través del tiempo alcanzando una concentración de $1.83 \pm 0.47 \mu\text{g/g}$ y $2.00 \pm 0.29 \mu\text{g/g}$ para QM y QRM respectivamente, lo que indica que la cepa de *L. lactis* UQ2 mostró una baja capacidad de síntesis de nisina en el queso fresco, pudiendo relacionarse por las características intrínsecas de éste. Es importante aclarar que esta mayor producción de nisina en el reto antimicrobiano en comparación con la biconservación, se atribuye a una mayor población de *L. lactis* UQ2 inoculada en el reto antimicrobiano, así como al aumento de síntesis producida por el estrés derivado de la presencia de *L. monocytogenes* ya que el nivel de síntesis de nisina se encuentra dado por un proceso de percepción en quórum inducido por la misma nisina, indicando que al encontrarse *L. lactis* UQ2 ante una alta población de *L. monocytogenes* se produjo una alta concentración de nisina, similar a lo reportado por Liu et al. (2021), quienes reportaron que al co-cultivar a *L. lactis* con *S. cerevisiae* en una relación $10^2:1$ se obtenían producciones de nisina de hasta $3432.7 \pm 171.6 \mu\text{g/mL}$ debido al quórum de *L. lactis* así como a que los ácidos orgánicos producidos por *L. lactis* eran absorbidos por *S. cerevisiae* impidiendo que estos disminuyeran el título de producción de nisina, lo que se sugiere también ocurre en nuestro trabajo.

Por último, encontramos a la población de *L. monocytogenes* (Figs. 24B y 24C), aquí observamos un comportamiento diferente dependiendo del tratamiento aplicado. Para QC encontramos una fase de crecimiento exponencial hasta los 20 d, seguida por una fase estacionaria que se mantiene hasta los 30 d; para QR se observa un efecto bacteriostático a los 4 d para después presentar el mismo comportamiento que en QC. Para los quesos con presencia de microcápsulas (QM y QRM), observamos un efecto bactericida hasta los 4 d, con una reducción de 1.5 log (Tabla 12), seguido de un efecto bacteriostático hasta los 8 d y posteriormente de nuevo presenta un comportamiento similar al del control. Esta conducta puede deberse a que *L. monocytogenes* cuenta con diferentes factores de protección al estrés que pueden modificar la estructura y carga neta de su pared celular lo que

puede ayudarla a ser menos susceptible a la acción de la nisina (Henderson et al., 2020) aunque también se asocia a la poca cantidad de nisina *in situ* disponible.

Tabla 12. Inhibición de *L. monocytogenes* en queso fresco.

Tratamiento	Población de <i>Listeria monocytogenes</i> (Log UFC/g), a los tiempos indicados (d)						
	0	4	8	12	16	20	30
QC	5.23 ± 0.106 ^a	5.47 ± 0.126 ^a	5.90 ± 0.246 ^a	6.20 ± 0.051 ^a	6.61 ± 0.017 ^a	6.91 ± 0.079 ^a	6.91 ± 0.064 ^a
QM	4.95 ± 0.148 ^b	3.76 ± 0.135 ^b	3.96 ± 0.216 ^b	4.70 ± 0.001 ^b	5.59 ± 0.244 ^b	6.49 ± 0.185 ^b	6.50 ± 0.184 ^b
QR	5.21 ± 0.039 ^a	4.97 ± 0.321 ^b	5.36 ± 0.245 ^b	5.98 ± 0.027 ^b	6.28 ± 0.026 ^a	6.46 ± 0.200 ^b	6.95 ± 0.046 ^a
QRM	4.84 ± 0.072 ^b	3.89 ± 0.261 ^b	4.03 ± 0.204 ^b	4.75 ± 0.123 ^b	6.18 ± 0.114 ^b	6.60 ± 0.132 ^b	6.89 ± 0.217 ^a

Los datos corresponden al promedio ± la desviación estándar (n=3). Valores con diferentes letras indican diferencia significativa de Dunnett ($\alpha=0.05$)

En la Tabla 12 se muestra como el uso de tratamientos en queso fresco produce una diferencia significativa, es decir, una disminución en la población de *L. monocytogenes* con respecto al queso control en los primeros 20 d de almacenamiento en condiciones de refrigeración, mientras que, a los 30 d de almacenamiento, ya solo el tratamiento QM mantiene esa diferencia, relacionada con un aumento en la población de *L. lactis*.

6.6.6 Análisis sensorial de queso fresco

La aplicación del recubrimiento activo comestible y las microcápsulas de *L. lactis* UQ2 como herramientas de bioconservación de queso fresco requiere una aceptación sensorial positiva por parte de los consumidores (Mirkovic et al., 2020). Los panelistas no entrenados que evaluaron los diferentes tratamientos en queso fresco no detectaron diferencia entre estos y el control, por lo cual, según el panel, no hubo una diferencia estadísticamente significativa. Los puntajes de aceptación sensorial (Figura 29) obtenidos por los panelistas no entrenados revelaron que no hay una diferencia significativa en términos de sabor, color, olor y aceptación general

de queso fresco. Esto es porque se debió esperar al día 8 que de acuerdo con el análisis microbiológico se esperarían diferencias más relevantes.

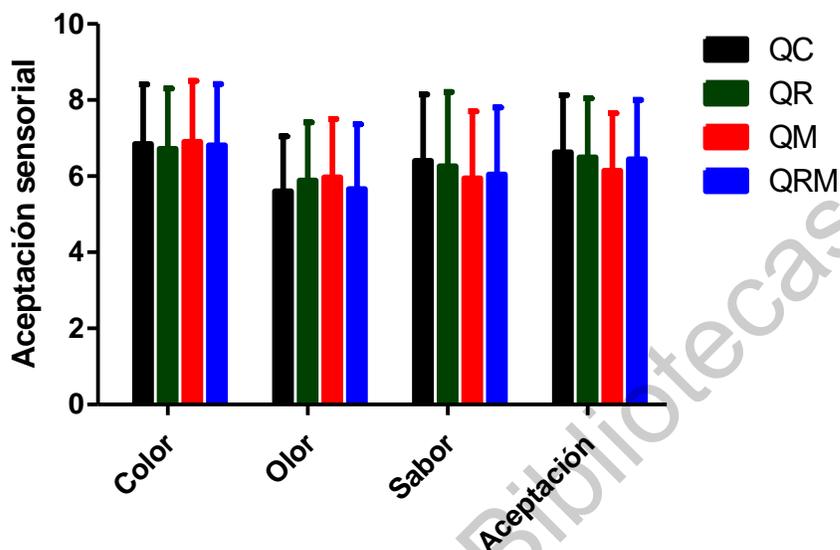


Figura 24. Evaluación sensorial de queso fresco posterior a 5 d de almacenamiento en condiciones de refrigeración. Queso control (QC), queso con adición de microcápsulas de *L. lactis* UQ2 (QM), queso con adición del recubrimiento activo comestible (QR) y queso con adición de recubrimiento activo y microcápsulas de *L. lactis* UQ2 (QRM).

Estos resultados muestran una aceptación positiva para todos los tratamientos (>5, me gusta) sin encontrar diferencias contra el control, indicando que los tratamientos no provocan ningún cambio en el perfil sensorial hasta el día 5 de almacenamiento en condiciones de refrigeración. Ahora bien, con los datos obtenidos de la evaluación sensorial, se realizó un análisis de agrupamiento por “Flash Profiling” que es un método flexible destinado a perfilar rápidamente los productos de acuerdo con sus atributos sensoriales más destacados y ha demostrado ser tan satisfactorio como el perfil convencional en muchas aplicaciones (Dairou y Sieffermann, 2002). En la figura 26 se muestra el agrupamiento que los evaluadores le confirieron a cada uno de nuestros tratamientos.

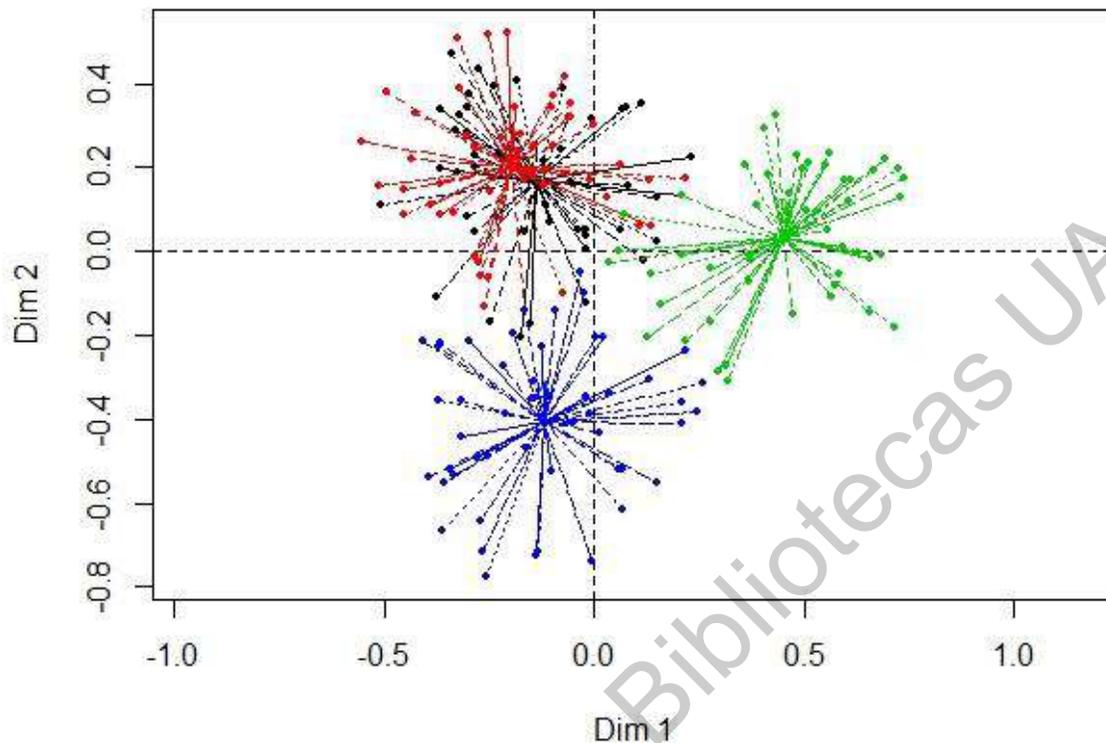


Figura 25. Agrupamiento sensorial de queso por Flash Profiling utilizando un mapa de análisis procrustiano. Queso control (QC) negro, queso con adición de microcápsulas de *L. lactis* UQ2 (QM) verde, queso con adición del recubrimiento activo comestible (QR) rojo y queso con adición de recubrimiento activo y microcápsulas de *L. lactis* UQ2 (QRM) azul.

A pesar de no encontrarse diferencia significativa en la evaluación por escala hedónica, estos mismos datos si forman agrupaciones por perfilamiento de acuerdo con los puntajes otorgados. En la figura 25 se observa la formación de 3 grupos principales; el primer grupo lo conforman los quesos QC y QR, que son los quesos que los consumidores detectan como iguales en los cuatro parámetros evaluados, mientras que los quesos QM y QRM se ubicaron como muestras individuales, es decir que no tienen demasiado parecido entre sí ni con los tratamientos QC y QR.

7. CONCLUSIONES

La microencapsulación mediante secado por aspersión resulta en una técnica eficiente para mantener una alta viabilidad celular de *Lactococcus lactis* UQ2 durante el proceso de secado y almacenamiento.

La película obtenida del recubrimiento activo diseñado mostró una buena capacidad de inhibición *in vitro* contra patógenos y deterioradores como son *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium y *Penicillium expansum*; presentando también excelentes características visuales y mecánicas, lo que le confirió una excelente opción de conservación de queso fresco.

El uso combinado del recubrimiento activo comestible y las microcápsulas de *L. lactis* UQ2 resultaron en una buena capacidad de inhibición *in situ* contra *Listeria monocytogenes* en queso fresco al reducir 1.5 log UFC/g en los primeros cuatro d, así como reducir en más de 10 veces la población de mohos y levaduras en queso fresco alargando la vida de anaquel del producto, lo que podría resultar útil para la industria productora de queso fresco.

El uso del recubrimiento activo comestible y las microcápsulas de *L. lactis* UQ2 de manera individual o combinados, no interfieren en la aceptación de queso fresco por los consumidores.

El queso con recubrimiento activo y microcápsulas de *L. lactis* UQ2, aumentó la vida útil del queso fresco almacenado en refrigeración, en al menos 5 d, comparado con el control.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Salam, M.H., & El-Shibiny, S. (2020). Preparation and potential applications of casein–polysaccharide conjugates: a review. *J Sci Food Agric*, 100, 1852-1859. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10187>
- Abdel-Naeem, H. H., Zayed, N. E., & Mansour, H. A. (2021). Effect of chitosan and lauric arginate edible coating on bacteriological quality, deterioration criteria, and sensory attributes of frozen stored chicken meat. *LWT-Food Sci Technol.*, 111928. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111928>
- Abdollahzadeh, E., Nematollahi, A., & Hosseini, H. (2021). Composition of antimicrobial edible films and methods for assessing their antimicrobial activity: A review. *Trends Food Sci Technol*, 110, 291-303. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.084>
- Adam, N. K. (1957). Use of the term ‘Young’s equation’ for contact angles. *Nature*, 180, 809–810. <https://doi.org/10.1038/180809a0>
- Aguirre, D. I. A. (2014). Calidad microbiológica y su relación con la vida útil en quesos frescos expendidos en tres mercados de Trujillo. *Rev. Científ.* 4, 11-17. <https://hdl.handle.net/20.500.12692/9825>
- Alegría, Á., Delgado, S., Roces, C., López, B., & Mayo, B. (2010). Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *Int J Food Microbiol* 143, 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.029>
- Al-Moghazy, M., El-sayed, H. S., Salama, H. H., & Nada, A. A. (2021). Edible packaging coating of encapsulated thyme essential oil in liposomal chitosan emulsions to improve the shelf life of Karish cheese. *Food Biosci*, 43, 101230. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101230>

- Amit, S.K., Uddin, M. M., Rahman, R., Islam, S. R., & Khan, M. S. (2017). A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. *Agric. Food Secur*, 6, 51-73. <https://doi.org/10.1186/s40066-017-0130-8>
- Arredondo-Ochoa, T., García, B., Amaro, A., Rivera, D., López, G., Martín, O., y Regalado-González, C. (2016). Design and characterization of corn starch edible films including beeswax and natural antimicrobials. *Food Bioproc Tech*, 10, 103-114. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1800-4>
- Arrieta, M. P., Peltzer, M. A., del Carmen Garrigós, M., & Jiménez, A. (2013). Structure and mechanical properties of sodium and calcium caseinate edible active films with carvacrol. *J Food Eng*, 114(4), 486-494. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.09.002>
- Audic, J.-L., Chaufer, B., & Daufin, G. (2003). Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review. *Lait*, 83, 417-438. <https://doi.org/10.1051/lait:2003027>
- Ballesteros-Mártinez, L., Pérez-Cervera, C., & Andrade-Pizarro, R. (2020). Effect of glycerol and sorbitol concentrations on mechanical, optical, and barrier properties of sweet potato starch film. *NFS J*, 20, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2020.06.002>
- Bastarrachea, L., Dhawan, S., & Sablani, S. S. (2011). Engineering properties of polymeric-based antimicrobial films for food packaging: a review. *Food Eng Rev*. 3(2), 79-93. <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9034-8>
- Berti, S., Ollé Resa, C., Basanta, F., & Gerschenson, L. (2019). Edible coatings on Gouda cheese as a barrier against external contamination during ripening. *Food Bioscience*, 31, 100447. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100447>
- Bonilla, J., & Sobral, P. J. (2020). Disintegrability under composting conditions of films based on gelatin, chitosan and/or sodium caseinate containing boldo-of-Chile leaves extract. *Int J Biol Macromol*, 151, 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.051>

Breukink, E., & de Kruijff, B. (2006). Lipid II as a target for antibiotics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 321-323. <https://doi.org/10.1038/nrd2004>

BS 4020. (1974). Methods for the estimation and differentiation of nisin in processed cheese. London, UK: British Standards Institute.

Castro-Rosas, J., Ferreira-Grosso, C. R., Gómez-Aldapa, C. A., Rangel-Vargas, E., Rodríguez-Marín, M. L., Guzmán-Ortiz, F. A., & Falfan-Cortes, R. N. (2017). Recent advances in microencapsulation of natural sources of antimicrobial compounds used in food - A review. *Food Res Int*, 102, 575-587. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.054>

Cecchini, J. P., Spotti, M. J., Piagentini, A. M., Milt, V. G., & Carrara, C. R. (2017). Development of edible films obtained from submicron emulsions based on whey protein concentrate, oil/beeswax and brea gum. *Food Sci Tech Int*, 23(4), 371-381. <https://doi.org/10.1177/1082013217695170>

Ceja-Medina, L. I., Ortiz-Basurto, R. I., Medina-Torres, L., Calderas, F., Bernad-Bernad, M. J., González-Laredo, R. F., ... & Manero, O. (2020). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* by spray drying with mixtures of Aloe vera mucilage and agave fructans as wall materials. *J Food Process Eng*, 43(8), 575-587. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.054>

Chaudhary, S., Kumar, S., Kumar, V., & Sharma, R. (2020). Chitosan nanoemulsions as advanced edible coatings for fruits and vegetables: Composition, fabrication and developments in last decade. *Int. J. Biol. Macromol*, 152, 154-170. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.276>

Chevalier, E., Assezat, G., Prochazka, F., & Oulahal, N. (2018). Development and characterization of a novel edible extruded sheet based on different casein sources and influence of the glycerol concentration. *Food Hydrocoll*, 75, 182-191. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.028>

Codex Alimentarius Commission, 2001. Codex Standard for Edible Casein Products. Codex Standard A-18-1995 Rev.1-2001

- Costa, M.J., Maciel, L. C., Teixeira, J. A., Vicente, A. A., & Cerqueira, M. A. (2018). Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges. *Food Res Int* 107, 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.013>
- Croissant, J. G., Fatieiev, Y., Almalik, A., & Khashab, N. M. (2018). Mesoporous silica and organosilica nanoparticles: physical chemistry, biosafety, delivery strategies, and biomedical applications. *Adv Heal Mat*, 7(4), 1700831. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700831>
- Dairou, V., & Sieffermann, J. M. (2002). A comparison of 14 jams characterized by conventional profile and a quick original method, the flash profile. *Journal of food science*, 67(2), 826-834. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10685.x>
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.-A., & Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: Tomorrow's packagings: A Review. *Crit Rev Food Sci*, 38, 299-313. <https://doi.org/10.1080/10408699891274219>
- Del Nobile, M. A., Gammariello, D., Conte, A., & Attanasio, M. (2009). A combination of chitosan, coating and modified atmosphere packaging for prolonging Fior di latte cheese shelf life. *Carbohydr polym*, 78(1), 151-156. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.03.017>
- Dianawati, D., Mishra, V., & Shah, N. P. (2016). Survival of microencapsulated probiotic bacteria after processing and during storage: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 56(10), 1685-1716. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.798779>
- Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A review. *Mater Sci Eng: C*, 33(4), 1819-1841. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.01.010>
- Escamilla-García, M., Reyes-Basurto, A., García-Almendárez, B. E., Hernández-Hernández, E., Calderón-Domínguez, G., Rossi-Márquez, G., & Regalado-González, C. (2017). Modified starch-chitosan edible films: Physicochemical

and mechanical characterization. *Coatings*, 7(12), 224.
<https://doi.org/10.3390/coatings7120224>

Esmaili, H., Cheraghi, N., Khanjari, A., Rezaeigolestani, M., Basti, A. A., Kamkar, A., & Aghaee, E. M. (2020). Incorporation of nanoencapsulated garlic essential oil into edible films: A novel approach for extending shelf life of vacuum-packed sausages. *Meat sci*, 166, 108135.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108135>

Esposito, M., Di Pierro, P., Regalado-Gonzales, C., Mariniello, L., Giosafatto, C.V.L., & Porta, R. (2016). Polyamines as new cationic plasticizers for pectin-based edible films. *Carbohydr Polym*, 153, 222-228.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.087>

Fajardo, P., Martins, J. T., Fuciños, C., Pastrana, L., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2010). Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. *J Food Eng*, 101(4), 349-356.
<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.06.029>

Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends Food Sci Tech* 22, 292-303. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.02.004>

Favaro, L., Barretto, A. L., & Todorov, S. (2015). Bacteriocinogenic LAB from cheeses- Application in biopreservation? *Trends Food Sci Tech*, 41, 37-48.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.09.001>

Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J. (2014). *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *J Food Prot*, 77(1), 150-170. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-150>

FDA. (2005). *Food and Drug Administration* . Obtenido de Agency response letter GRAS notice No. GRN:

<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices>.
26/03/2020

Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. (2017). *Fundamentals of Cheese Science*. New York: Springer.

Freitas Martins, M. C., Fusieger, A., de Freitas, R., Valence, F., Nero, L. A., & Fernandes de Carvalho, A. (2020). Novel sequence types of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* obtained from Brazilian dairy production environments. *LWT - Food Sci Technol*, 109-146. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109146>

Galus, S., & Kadzińska, J. (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends Food Sci Technol*, 45(2), 273-283. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.011>

García Domínguez, J., Infante, M., Erra, P., & Julia, M. (1983). *España Patente No ES, 512643, A1*.

García-Almendarez, B. E., Cann, I., Martín, E., Guerrero-Legarreta, I., & Regalado, C. (2008). Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*, 19, 670-680. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.07.015>

Ghanbari, M., Jamí, M., Domig, K. J., & Kneifel, W. (2013). Seafood biopreservation by lactic acid bacteria: A review. *LWT - Food Sci Technol*, 315-324. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.039>

Giosafatto, C. V. L., Di Pierro, P., Gunning, P., Mackie, A., Porta, R., & Mariniello, L. (2014). Characterization of Citrus pectin edible films containing transglutaminase-modified phaseolin. *Carbohydr Polym*, 106, 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.02.015>

González-Toledo, S. Y., Domínguez-Domínguez, J., García-Almendárez, B. E., Prado-Barragán, L. A., Regalado-González, C. (2010). Optimization of nisin production by *Lactococcus lactis* UQ2 using supplemented whey as alternative

culture medium. *J Food Sci*, 75, 347-353. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01670.x>

González-Córdova, A. F., Yescas, C., Ortiz-Estrada, Á. M., Hernández-Mendoza, A., & Vallejo-Cordoba, B. (2016). Invited review: artisanal Mexican cheeses. *J Dairy Sci*, 99(5), 3250-3262. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10103>

Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends Food Sci Tech*, 15, 330-347. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.10.005>

Guilbert, S., Gontard, N., & Cuq, B. (1995). Technology and applications of edible protective films. *Packag Technol Sci*, 8, 339-346. <https://doi.org/10.1002/pts.2770080607>

Gutián, M. V., Ibarguren, C., Soria, M. C., Hovanyecz, P., Banchio, C., & Audisio, M. C. (2019). Anti-*Listeria monocytogenes* effect of bacteriocin-incorporated agar edible coatings applied on cheese. *Int Dairy J*, 97, 92-98. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.05.016>

Güler, Z., Türkmen, D., & Dursun, A. (2021). Different scalding duration in hot whey influencing chemical, biochemical, physical, microstructural, textural and sensorial characteristics of brine-type cheese. *LWT.*, 145, 111312. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111312>

Guo, M., Yadav, M. P., & Jin, T. Z. (2017). Antimicrobial edible coatings and films from micro-emulsions and their food applications. *Int J Food Microbiol*, 263, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.002>

Haghighi, H., De Leo, R., Bedin, E., Pfeifer, F., Siesler, H. W., & Pulvirenti, A. (2019). Comparative analysis of blend and bilayer films based on chitosan and gelatin enriched with LAE (lauroyl arginate ethyl) with antimicrobial activity for food packaging applications. *Food Packag Shelf Life*, 19, 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.11.015>

- Han, J. H. (2014). Edible Films and Coatings: A Review. En J.H. Han, *Innovations in Food Packaging*. Texas, Academic Press.
- Hassan, B., Chatha, S. A., Hussain, A. I., Zia, K. M., & Akhtar, N. (2018). Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *Int. J. Biol. Macromol*, 1095-1107. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.097>
- Henderson, L. O., Cabrera-Villamizar, L. A., Skeens, J., Kent, D., Murphy, S., Wiedmann, M., & Guariglia-Oropeza, V. (2019). Environmental conditions and serotype affect *Listeria monocytogenes* susceptibility to phage treatment in a laboratory cheese model. *J Dairy Sci*, 102 (11), 9674-9688. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16474>
- Henderson, L. O., Erazo Flores, B. J., Skeens, J., Kent, D., Murphy, S. I., Wiedmann, M., & Guariglia-Oropeza, V. (2020). Nevertheless, she resisted—role of the environment on *Listeria monocytogenes* sensitivity to nisin treatment in a laboratory cheese model. *Front Microbiol*, 11, 1-15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00635>
- Hernández-Hernández, E., Regalado-González, C., Vázquez-Landaverde, P., Guerrero-Legarreta, I., & García-Almendárez, B. E. (2014). Microencapsulation, chemical characterization, and antimicrobial activity of Mexican (*Lippia graveolens* H.B.K.) and European (*Origanum vulgare* L.) oregano essential oils. *Sci World J*, 2014, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/641814>
- Hough, G. (2010). *Sensory shelf life estimation of food products*. Boca Raton, CRC Press.
- Huq, T., Khan, A., Khan, R. A., Riedl, B., & Lacroix, M. (2013). Encapsulation of probiotic bacteria in biopolymeric system. *Critl Rev Food Sci Nutr*, 53(9), 909-916. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.573152>

- Ibáñez, R. A., Govindasamy-Lucey, S., Jaeggi, J. J., Johnson, M. E., McSweeney, P. L. H., & Lucey, J. A. (2020). Low-and reduced-fat milled curd, direct-salted Gouda cheese: Comparison of lactose standardization of cheesemilk and whey dilution techniques. *J Dairy Sci*, *103*(2), 1175-1192. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17292>
- Ibarra-Sánchez, L. A., El-Haddad, N., Mahmoud, D., Miller, M. J., & Karam, L. (2020). Invited review: Advances in nisin use for preservation of dairy products. *J Dairy Sci*, *103*(3), 2041-2052. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17498>
- Ibrahim, M., Sapuan, S., Zainudin, E., & Zuhri, M. (2019). Physical, thermal, morphological, and tensile properties of cornstarch-based films as affected by different plasticizers. *Int J Food Prop*, *22*, 925-941. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1618324>
- Infante, R., García Domínguez, J., Erra, P., Julia, R., & Prats, M. (1984). Surface active molecules: preparation and properties of long chain N α -acyl-L- α -amino- ω -guanidine alkyl acid derivatives. *Int J Cosmet Sci* *6*, 275-282. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2494.1984.tb00385.x>
- ISO (2013). International Organization for Standardization. ISO 12647-2:2013 Graphic technology. <https://www.iso.org/standard/57833.html>
- Jafarzadeh, S., Rhim, J. W., Alias, A. K., Ariffin, F., & Mahmud, S. (2019). Application of antimicrobial active packaging film made of semolina flour, nano zinc oxide and nano-kaolin to maintain the quality of low-moisture mozzarella cheese during low-temperature storage. *J Sci Food Agric*, *99*(6), 2716-2725. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9439>
- Jafarzadeh, S., Salehabadi, A., Nafchi, A. M., Oladzadabbasabadi, N., & Jafari, S. M. (2021). Cheese packaging by edible coatings and biodegradable nanocomposites; improvement in shelf life, physicochemical and sensory properties. *Trends Food Sci Technol*. *116*, 218-231. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.021>

- Jalilzadeh, A., Tunçtürk, Y., & Hesari, J. (2015). Extension Shelf Life of Cheese: A Review. *Int J Dairy Sci*, 10, 44-60. DOI: 10.3923/ijds.2015.44.60
- Jouki, M., Khazaei, N., Ghasemlou, M., & HadiNezhad, M. (2013). Effect of glycerol concentration on edible film production from cress seed carbohydrate gum. *Carbohydr Polym*, 96, 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.077>
- Karam, L., Jama, C., Dhulster, P., & Chihib, N.-E. (2013). Study of surface interactions between peptides, materials and bacteria for setting up antimicrobial surfaces and active food packaging. *J. Mater. Environ. Sci.* 4, 798-821. ISSN : 2028-2508
- Kern, L., Fabre, O., Scher, J., & Petit, J. (2019). Chemical fractionation of caseins by differential precipitation: influence of pH, calcium addition, protein concentration and temperature on the depletion in α - and β -caseins. *Int J Food Sci Tech*, 55, 1-11. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14283>
- Kinsell, J. E., & Morr, C. V. (1984). Milk proteins: Physicochemical and functional properties. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 21, 197-262. <https://doi.org/10.1080/10408398409527401>
- Kondrotiene, K., Kasnauskyte, N., Serniene, L., Gölz, G., Alter, T., Kaskoniene, V., & Malakauskas, M. (2018). Characterization and application of newly isolated nisin producing *Lactococcus lactis* strains for control of *Listeria monocytogenes* growth in fresh cheese. *LWT*. 87, 507-514. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.021>
- Krochta, J. M. (2002). Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. *Protein-based films and coatings*, 1, 1-40. Boca Raton. CRC Press.
- Kurek, M., Scetar, M., & Galic, K. (2017). Edible coatings minimize fat uptake in deep fat fried products: A review. *Food Hydrocoll*, 71, 225-235. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.006>

- Lin, H. C., Wang, B. J., & Weng, Y. M. (2020). Development and characterization of sodium caseinate edible films cross-linked with genipin. *LWT*, 118, 108813. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108813>
- Liu, W., Zhou, J., Tan, F., Yin, H., Yang, C., & Lu, K. (2021). Improvement of nisin production by using the integration strategy of co-cultivation fermentation, foam fractionation and pervaporation. *LWT*, 142, 111093. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111093>
- Lourenço, A., Kamnetz, M. B., Gadotti, C., & Diez-Gonzalez, F. (2017). Antimicrobial treatments to control *Listeria monocytogenes* in queso fresco. *Food Microbiol*, 64, 47-55. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.12.014>
- Lerdthanangkul, S., & Krochta, J. M. (1996). Edible coating effects on postharvest quality of green bell peppers. *J Food Sci*, 61(1), 176–179. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb14753.x>
- Lotfi, M., Tajik, H., Moradi, M., Forough, M., Divsalar, E., & Kuswandi, B. (2018). Nanostructured chitosan/ monolaurin film: Preparation, characterization and antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* on ultrafiltered white cheese. *LWT - Food Sci Technol*, 92, 576–583. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.020>
- Lubelski, J., Rink, R., Khusainov, R., Moll, G. N., & Kuipers, O. P. (2008). Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cell Mol Life Sci*, Vol. 455-476. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7171-2>
- Lücke, F. K. (2014). Biopreservation. *Encyclopedia of Food Safety*, 135-139.
- Ma, Q., Davidson, P., & Zhong, Q. (2020). Properties and potential food applications of lauric arginate as a cationic antimicrobial. *Int J Food Microbiol*, 315, 108417. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108417>

- Maan, A. A., Ahmed, Z. F. R., Khan, M. K. I., Riaz, A., & Nazir, A. (2021). Aloe vera gel, an excellent base material for edible films and coatings. *Trends Food Sci Technol*. 116, 329-341. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.035>
- Maciel, G. M., Chaves, K. S., Grosso, C. R. F., & Gigante, M. L. (2014). Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. *Journal of dairy science*, 97(4), 1991-1998. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7463>
- Maresca, D., De Prisco, A., La Stora, A., Cirillo, T., Esposito, F., & Mauriello, G. (2016). Microencapsulation of nisin in alginate beads by vibrating technology: Preliminary investigation. *LWT - Food Sci Technol*, vol. 436-443. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.062>
- Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innov Food Sci Emerg* *Creo que e título le falta algo* 27, 15-25. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>
- Martin, N. H., Torres-Frenzel, P., & Wiedmann, M. (2020). Invited review: Controlling dairy product spoilage to reduce food loss and waste. *J Dairy Sci*. 104, 1251-1261. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19130>
- Martins, J. T., Cerqueira, M. A., Souza, B. W., Carmo Avides, M. D., & Vicente, A. A. (2010). Shelf life extension of ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporating nisin against *Listeria monocytogenes*. *J Agric Food Chem*, 58(3), 1884-1891. <https://doi.org/10.1021/jf902774z>
- Moll, G. N., Konings, W. N., & Driessen, A. J. (1999). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 185-198. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2027-4_8

Moreira, M.D., Pereda, M., Marcovich, N. E., & Roura, S. I. (2011). Antimicrobial effectiveness of bioactive packaging materials from edible chitosan and casein polymers: Assessment on carrot, cheese, and salami. *J Food Sci*, 76, 54-63. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01910.x>

Mulkytė, K., Kasnauskytė, N., Šernienė, L., Malakauskas, M., Maruška, A. S., Kaškonienė, V., ... & Naujokaitytė, G. (2017). Niziną Z gaminačių *Lactococcus Lactis* padermių panaudojimas *Listeria Monocytogenes* bakterijų kontrolei pasterizuotoje fermentinėje varškėje. *Kaunas: Lietuvos sveikatos mokslų universiteto Leidybos namai, 2017.*

Nguyen Van Long, N., Joly, C., & Dantigny, P. (2016). Active packaging with antifungal activities. *Int J Food Microbiol*, 220, 73-90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.001>

NMX-F-098 (1976). Norma Mexicana NMX-F-098-1976, determinación de proteínas en quesos.

NMX-F-100 (1984). Norma Mexicana NMX-F-100-1984, alimentos. Lácteos. Determinación de grasa butírica en quesos.

NMX-F-111 (1984). Norma Mexicana NMX-F-111-1984, alimentos. Lácteos. Determinación de sólidos totales en quesos.

NOM-121-SSA1 (1994). *Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, bienes y servicios. quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias.* Obtenido de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/121ssa14.html>.

NOM-210-SSA1 (2014). *Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.* Obtenido de http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015

NOM-243-SSA1 (2010). *Norma Oficial Mexicana* NOM-243-SSA1-2010, productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Obtenido de <http://dof.gob.mx/normasOficiales/4156/salud2a/salud2a.htm>

Nunes, G. L., de Araújo Etchepare, M., Cichoski, A. J., Zepka, L. Q., Lopes, E. J., Barin, J. S., & de Menezes, C. R. (2018). Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated by spray drying. *LWT*, 89, 128-133. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.032>

Núñez-Ramírez, D. M., López-Martínez, A., Medina-Torres, L., Calderas, F., Martínez-Prado, M. A., Lara, R. H., & Manero, O. (2021). Microencapsulation of *Acidithiobacillus thiooxidans* by spray drying using biopolymers as wall materials: A potential alternative for its application in the mining industry. *Miner Eng*, 166, 106882. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2021.106882>

Oros-Flores, Z. S., García-Almendárez, B. E., Barboza-Corona, J. E., Salcedo-Hernández, R. (2019). A fast micromethod for the estimation of nisin activity in a soft cheese. *Int J Dairy Technol*, 70, 01-05. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12583>

Patiño, H. (2014). Microencapsulación de nisina a partir de *Lactococcus lactis* UQ2 y su incorporación en queso tipo panela. Tesis para obtener el grado de *Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Querétaro, Querétaro, México.

Paulo, F., & Santos, L. (2017). Design of experiments for microencapsulation applications: A review. *Mater Sci Eng C*, 1327-1340. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.219>

Pereda, M., Aranguren, M., & Marcovich, N. (2007). Characterization of chitosan/caseinate films. *J Appl Polym Sci*, 107, 1080-1090. <https://doi.org/10.1002/app.27052>

- Petkoska, A. T., Daniloski, D., D'Cunha, N. M., Naumovski, N., & Broach, A. T. (2021). Edible packaging: Sustainable solutions and novel trends in food packaging. *Food Res Int*, 140, 109981. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109981>
- Ponce, A. G., Roura, S. I., del Valle, C. E., & Moreira, M. R. (2008). Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *In vitro* and *in vivo* studies. *Postharvest Biol Tech*, 49, 294-300. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.02.013>
- Porta, R., Mariniello, L., Di Pierro, P., Sorrentino, A., & Giosafatto, C. V. (2011). Transglutaminase crosslinked pectin- and chitosan based edible films: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 51, 223-238. <https://doi.org/10.1080/10408390903548891>
- Porta, R., Di Pierro, P., Rossi-Marquez, G., Mariniello, L., Kadivar, M., & Arabestani, A. (2015). Microstructure and properties of bitter vetch (*Vicia ervilia*) protein films reinforced by microbial transglutaminase. *Food Hydrocolloids*, 50, 102-107. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.04.008>
- Priyadarshi, R., Sauraj, Kumar, B., & Negi, Y. S. (2018). Chitosan film incorporated with citric acid and glycerol as an active packaging material for extension of green chilli shelf life. *Carbohydr Polym*, 195, 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.04.089>
- Rabea, E. I., Badawy, M. E.-T., Stevens, C. V., Smaghe, G., & Steubaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, vol. 1457-1465. <https://doi.org/10.1021/bm034130m>
- Ramos, Ó. L., Pereira, J. O., Silva, S. I., Fernandes, J. C., Franco, M. I., Lopes-da Silva, J. A., ... & Malcata, F.X. (2012). Evaluation of antimicrobial edible coatings from a whey protein isolate base to improve the shelf life of cheese. *J Dairy Sci*, 95, 6282–6292. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5478>

- Rangel-Marrón, M., Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2019). Effects of alginate-glycerol-citric acid concentrations on selected physical, mechanical, and barrier properties of papaya puree-based edible films and coatings, as evaluated by response surface methodology. *LWT*, *101*, 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.005>
- Rathore, S., Mahendrakumar, D., Liew, C. V., Chan, L. W., & Heng, P. W. (2013). Microencapsulation of microbial cells. *J Food Eng*, Vol. 369-381. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.022>
- Reyes-Díaz, R., Gonzáles-Córdova, A. F., Estrada-Montoya, M., Méndez-Romero, J. I., Mazorra-Manzano, J. Á., Soto-Valdez, H., & Vallejo-Cordoba, B. (2019). Volatile and sensory evaluation of Mexican Fresco cheese as affected by specific wild *Lactococcus lactis* strains. *J Dairy Sci* *103*, 242-253. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17188>
- Rhim, J.-W., & Ng., P. K. (2007). Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* *47*, 411–433. <https://doi.org/10.1080/10408390600846366>
- Roberts, D., & Greenwood, M. (2008). *Practical food microbiology*. John Wiley & Sons.
- Rosolen, M. D., Bordini, F. W., de Oliveira, P. D., Conceição, F. R., Pohndorf, R. S., Fiorentini, Â. M., & Pieniz, S. (2019). Symbiotic microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 using whey and inulin by spray drying. *LWT*, *115*, 108411. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108411>
- Rubilar, J. F., Candia, D., Cobos, A., Díaz, O., & Pedreschi, F. (2016). Effect of nanoclay and ethyl-N α -dodecanoyl-L-arginate hydrochloride (LAE) on physico-mechanical properties of chitosan films. *LWT*. *72*, 206-214. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.057>
- Sabbah, M., Esposito, M., Pierro, P. D., Giosafatto, C. V., Mariniello, L., & Porta, R. (2016). Insight into zeta potential measurements in biopolymer film

preparation. *J Biotechnol Biomat*, 6, e126. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-952X.1000e126>

Sahraee, S., Milani, J. M., Regenstein, J. M., & Kafil, H. S. (2019). Protection of foods against oxidative deterioration using edible films and coatings: A review. *Food Biosci*, 32, 100451. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100451>

Salazar, A. S. S., Cavazos, P. A. S., Paz, H. M., & Fragoso, A. V. (2019). External factors and nanoparticles effect on water vapor permeability of pectin-based films. *J Food Eng*, 245, 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.09.002>

Sharma, N., Angural, S., Rana, M., Puri, N., Kondepudi, K. K., & Gupta, N. (2020). Phytase producing lactic acid bacteria: Cell factories for enhancing micronutrient bioavailability of phytate rich foods. *Trends Food Sci Tech*, 96, 01-12. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.001>

Shewfelt, R. L., Thai, C. N., & Davis, J. W. (1988). Prediction of changes in color of tomatoes during ripening at different constant temperatures. *J Food Sci*, 53, 1433–1437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb09293.x>

Shokri, S., Shekarforoush, S. S., & Hosseinzadeh, S. (2020). Stimulatory effects of low intensity ultrasound on the growth kinetics and metabolic activity of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. *Proc Bioch*, 89, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.033>

SIAP. (01 de 03 de 2020). *Boletín trimestral sobre la producción de leche de bovino*. Obtenido de <https://www.gob.mx/siap/prensa/boletin-de-leche-155932>. 15/09/2021

Song, A. A.-L., In, L. L., Lim, S. H., & Rahim, R. A. (2017). A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microb Cell Fact*, 16, 01-15. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0669-x>

Sothornvit, R., & Krochta, J. M. (2005). *Plasticizers in edible films and coatings. Innovations in Food Packaging*. Manitoba, Academic Press.

- Salazar, A. S. S., Cavazos, P. A. S., Paz, H. M., & Fragoso, A. V. (2019). External factors and nanoparticles effect on water vapor permeability of pectin-based films. *J Food Eng*, 245, 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.09.002>
- Stalder, A. F., Kulik, G., Sage, D., Barbieri, L., & Hoffmann, P. (2006). A snake-based approach to accurate determination of both contact points and contact angles. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 286(1-3), 92-103. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.03.008>
- Suhag, R., Kumar, N., Petkoska, A. T., & Upadhyay, A. (2020). Film formation and deposition methods of edible coating on food products: A review. *Food Res Int*, 136, 109582. DOI:10.1016/j.foodres.2020.109582
- Surber, G., Schäper, C., Wefers, D., Rohm, H., & Jaros, D. (2021). Exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* affect manufacture, texture and sensory properties of concentrated acid milk gel suspensions (fresh cheese). *Int Dairy J*, 112, 104854. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104854>
- Surber, G., Spiegel, T., Dang, B. P., Pombo, A. W., Rohm, H., & Jaros, D. (2021). Cream cheese made with exopolysaccharide-producing *Lactococcus lactis*: Impact of strain and curd homogenization pressure on texture and syneresis. *J Food Eng*, 308, 110664. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110664>
- Swaigood, H. E. (1993). Review and update of casein chemistry. *J Dairy Sci* 76, 3054-3061. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77645-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77645-6)
- Vahedikia, N., Garavand, F., Tajeddin, B., Cacciotti, I., Jafari, S. M., Omid, T., & Zahedi, Z. (2019). Biodegradable zein film composites reinforced with chitosan nanoparticles and cinnamon essential oil: Physical, mechanical, structural and antimicrobial attributes. *Coll Surf B: Biointerf*, 177, 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.045>

- Valencia G.A., Luciano C.G., Monteiro Fritz A.R. (2019) Smart and Active Edible Coatings Based on Biopolymers. In: Gutiérrez T. (eds) *Polymers for Agri-Food Applications*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19416-1_20
- Vanderzant, C., & Spittstoesser, D. F. (1992). *Compendium of methods for microbiological examination of foods*, Edward Brothers. Ann Arbor.
- Van Long, N. N., Joly, C., & Dantigny, P. (2016). Active packaging with antifungal activities. *Intl J Food Microbiol*, 220, 73-90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.001>
- Van Tassell, M. L., Ibarra-Sánchez, L. A., Takhar, S. R., Amaya-Llano, S. L., & Miller, M. J. (2015). Use of a miniature laboratory fresh cheese model for investigating antimicrobial activities. *J dairy sci*, 98(12), 8515-8524. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9967>
- Verraes, C., Vlaemyneck, G., Van Weyenberg, S., De Zutter, L., Daube, G., Sindic, M., & Herman, L. (2015). A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *Int Dairy J*, 50, 32-44. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.05.011>
- Vieira, M. G., da Silva, M. A., dos Santos, L. O., & Beppu, M. M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *Eur Polym J*, 47, 254-263. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011>
- Walstra, P., Wouters, J. T., & Geurts, T. J. (2005). *Dairy Science and Technology*. CRC Press. Boca Ratón.
- Xing, Y., Li, X., Xu, Q., Yun, J., Lu, Y., & Tang, Y. (2011). Effects of chitosan coating enriched with cinnamon oil on qualitative properties of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Food Chem*, 124, 1443-1450. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.105>
- Xu, Y., Hou, K., Gao, C., Feng, X., Cheng, W., Wu, D., ... & Tang, X. (2021). Characterization of chitosan film with cinnamon essential oil emulsion co-

stabilized by ethyl- α -lauroyl-L-arginate hydrochloride and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Int J Biol Macromol*, 188, 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.007>

Yildirim, S., Röcker, B., Pettersen, M., Nilsen-Nygaard, J., Ayhan, Z., Rutkaite, R., ... & Coma, V. (2018). Active packaging applications for food. *Compr Rev Food Sci Food Safety*, 17, 165-199. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12322>

Young, T. (1805). An assay on the cohesion of fluids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 95, 65–87.

Youssef, A. M., El-Sayed, S. M., El-Sayed, H. S., Salama, H. H., & Dufresne, A. (2016). Enhancement of Egyptian soft white cheese shelf life using a novel chitosan/carboxymethyl cellulose/zinc oxide bionanocomposite film. *Carbohydr Polym*, 151, 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.023>

Yuan, Y., Zhang, X., Pan, Z., Xue, Q., Wu, Y., Li, Y., ... & Li, L. (2021). Improving the properties of chitosan films by incorporating shellac nanoparticles. *Food Hydrocoll*, 110, 106164. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106164>

Yusuf, M. (2018). Natural Antimicrobial Agents for Food Biopreservation. *Food Packaging and Preservation*. London: Elsevier.

Zacharof, M. P., & Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: A Review Article. *APCBEE Procedia*, 2, 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.010>

ANEXOS

Anexo 1. Formato de evaluación sensorial de queso fresco

EVALUACIÓN DE QUESO FRESCO

Fecha: _____

Sexo: F__M__

Folio: _____

Edad: _____

Estado de procedencia: _____

Antes de realizar la evaluación lea cuidadosamente las instrucciones:

Frente a usted se encuentran cuatro muestras de queso cada una con un código diferente, un vaso con agua y galletas para limpiar el paladar entre cada muestra evaluada. La evaluación sensorial constará en primera instancia una evaluación visual, de olor y de sabor para en conjunto obtener una evaluación de la aceptación global de la muestra.

Tome una muestra de queso y, de acuerdo con su preferencia para el consumo de queso fresco, evalúe los atributos solicitados colocando un punto sobre la línea indicando si le gusta o le disgusta, repita esto para cada muestra evaluada



CÓDIGO DE MUESTRA: _____

Atributo: Color

Atributo: Olor

Atributo: Sabor

Atributo: Aceptación

CÓDIGO DE MUESTRA: _____

Atributo: Color

Atributo: Olor

Atributo: Sabor

Atributo: Aceptación

CÓDIGO DE MUESTRA: _____

Atributo: Color



Atributo: Olor



Atributo: Sabor



Atributo: Aceptación



CÓDIGO DE MUESTRA: _____

Atributo: Color



Atributo: Olor



Atributo: Sabor



Atributo: Aceptación



COMENTARIOS ADICIONALES (opcional).

Anexo 2. Consentimiento informado

Consentimiento informado

No. de boleta: _____
Fecha: _____

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos
C.U., Cerro de las Campanas s/n, Colonia Las Campanas,
C.P.76010, Querétaro, Qro.

Título del proyecto: Bioconservación de queso fresco mediante *Lactococcus lactis* UQ2 y un recubrimiento activo.

Investigador responsable: Dr. Carlos Regalado González

Nom

bre del evaluador: Mayra Maya Plaza

Se desea realizar un estudio en donde se considera que usted es apto para participar. Este consiste en probar queso fresco que puede o no incluir microcápsulas y un recubrimiento comestible. El queso tiene como materias primas: leche pasteurizada de bovino, cuajo enzimático y sal. Para elaborar las microcápsulas se utilizó al microorganismo *Lactococcus lactis*, una bacteria intestinal productora de una bacteriocina llamada nisina, ambas reconocidas como seguras por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de Los Estados Unidos de América; las microcápsulas fueron elaboradas mediante secado por aspersión utilizando almidón modificado. Mientras que los componentes del recubrimiento comestible son: caseinato de sodio, quitosano adicionado con natamicina y arginato láurico, los cuales son reconocidos como seguros por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de Los Estados Unidos de América. Este producto no representa ningún riesgo para usted ya que se ha asegurado su inocuidad. La actividad es solamente de tipo experimental, confidencial y de carácter voluntario,

por lo que, si desea retirarse de esta actividad, puede hacerlo en cualquier momento, aún durante la evaluación. Si usted no comprende algo sobre el estudio o algún concepto no queda claro, siéntase libre de hacer cualquier tipo de pregunta.

Justificación del estudio

En la actualidad, el queso fresco es el tipo de queso más producido y con mayor derrama económica en México. Sin embargo, al ser un alimento rico en nutrientes y con alta actividad de agua, su vida de anaquel es corta aún en condiciones de refrigeración. El queso fresco se ha visto involucrado con brotes de enfermedades provocadas principalmente por *Salmonella* Tiphymurium y *Listeria monocytogenes*. Su importancia económica para el país, su corta vida de anaquel y su alta susceptibilidad a la contaminación microbiológica, tanto deterioradora como patógena, lo convierten en un producto que necesita alternativas para mejorar dichas deficiencias.

Dentro de estas alternativas se plantea el uso de dos tecnologías que implican el uso de microorganismos y/o sus metabolitos como medio de protección del queso y la utilización de recubrimientos comestibles activos como medio de empaque para reducir esta problemática.

Objetivo del estudio

Adicionar queso fresco con microcápsulas de *Lactococcus lactis* y recubrirlo con una mezcla de quitosano y casinato de sodio utilizando natamicina y arginato láurico como antimicrobianos, para evaluar sensorialmente y medir el porcentaje de aceptabilidad general de los productos.

Procedimiento del estudio

Si usted cumple con los requisitos para participar en este estudio y acepta participar voluntariamente se aplicará la siguiente evaluación sensorial:

- 1) Se presentará el queso en contenedores codificados con números de 3 dígitos aleatorios, agua purificada para enjuagar su paladar y una boleta para llenar una vez que haya probado el queso.

- 2) Probará cada una de las muestras dando un enjuague entre cada muestra diferente que pruebe para limpiar su paladar.
- 3) Llenará la boleta indicando si cada una de las muestras que probó fue de su agrado o no.

Duración del estudio:

El estudio tendrá una duración aproximada de 15 a 20 min.

Riesgos asociados con el estudio

Se le garantiza que los alimentos que usted va a ingerir son inocuos microbiológicamente. Asegurando su calidad microbiológica mediante los análisis que marca la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Los quesos por ingerir contienen leche de bovino pasteurizada y, puede contener o no, caseinato de sodio (derivado de la caseína, principal proteína de la leche), nisina, natamicina, arginato láurico y quitosano (compuesto extraído del caparazón de crustáceos como camarones, langostas y langostinos), que es un aditivo ampliamente utilizado en la industria alimentaria y el cual NO tiene relación alguna con los compuestos causantes de alergias por consumo de crustáceos. Sin embargo, el riesgo de alergia por algunos de los componentes puede existir dependiendo de la sensibilidad del participante. Por lo que se recomienda que si usted es consciente de presentar alergias asociadas a estos ingredientes desista de participar en este estudio.

En caso de presentar alguna reacción alérgica a uno de los componentes del alimento o presentar algún síntoma de malestar será retirado del estudio y trasladado inmediatamente a la Unidad Médica de la Universidad para que se le proporcione el tratamiento adecuado.

Aclaraciones

- La decisión de participar en este estudio es completamente voluntaria

- No recibirá ningún apoyo económico por su participación
- Puede solicitar la información que desee antes, durante y al finalizar el estudio.
- Puede tomar la decisión de retirarse del estudio en el momento que lo desee, está será respetada y puede o no dar los motivos de su decisión.
- No habrá ninguna consecuencia para usted si decide no participar en el estudio.
- No tendrá que hacer ningún gasto durante el estudio.
- Se comunicará el resultado del estudio en caso de que así lo solicite el participante
- La información recabada en este estudio será utilizada para realizar análisis estadísticos. Y los datos de carácter personal que se lleguen a recolectar se mantendrán en estricta confidencialidad por el grupo a cargo de la investigación.
- La información proporcionada en este consentimiento informado ha sido revisada y aprobada por el comité de bioética de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Cualquier duda sobre sus derechos como participante o reporte de alguna irregularidad durante el estudio favor de hacerlo a través de:

Dr. Carlos Regalado González. Investigador responsable

Teléfono: 01 442 192 12 00 ext. 55989

Correo Electrónico: regcarlos@gmail.com

Dra. Iza Fernanda Pérez Ramírez, presidenta de la Comisión de Bioética de la Facultad de Química de la Universidad de Autónoma de Querétaro.

Correo electrónico: iza.perez@hotmail.com

Teléfono: 01 442 192 12 00 ext.

Si usted voluntariamente desea participar, le pedimos que firme esta hoja, de lo contrario respetamos su decisión.

Firma del participante

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Consentimiento informado
Revocación o Rechazo

Fecha: _____

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos
C.U., Cerro de las Campanas s/n, Colonia Las Campanas,
C.P.76010, Querétaro, Qro.

Título del proyecto: Bioconservación de queso fresco mediante microcápsulas de *Lactococcus lactis* UQ2 y un recubrimiento activo basado en caseinato y quitosano.

Investigador responsable: Dr. Carlos Regalado González

Nombre del evaluador: Mayra Maya Plaza

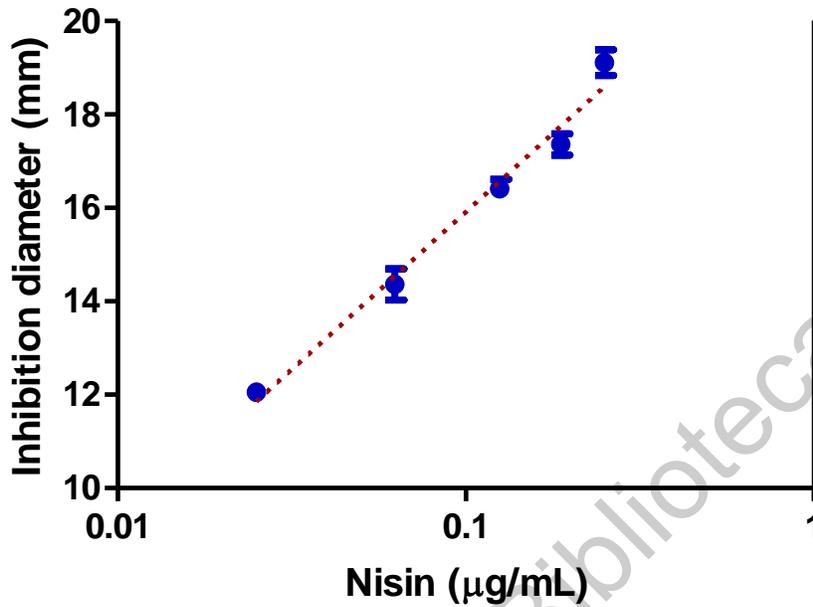
Nombre del participante: _____

Por mí mismo dejo constancia de mi decisión de revocar la autorización que firmé con anterioridad, en documento de consentimiento informado.

En tales condiciones revoco que se me aplique la evaluación sensorial programada.

Firma del participante

Anexo 3. Curva de calibración de nisina



De esta curva se obtuvo la ecuación (6), con la que se calcularon las concentraciones de nisina en el queso. A manera de ejemplo, el día 4 de evaluación del reto antimicrobiano, el tratamiento de queso con adición de microcápsulas (QM) presentó los siguientes diámetros de inhibición (mm): 14.8, 15.8, 14.8, 14.8, 14.8 y 14.8.

Al realizar la sustitución en la ecuación (6) tenemos:

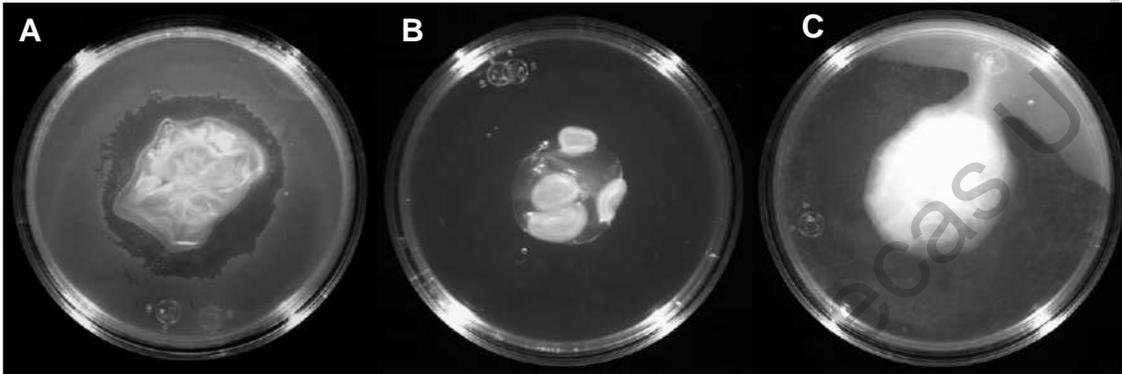
$$x = 10^{(14.8-22.65)/6.739} = 0.068 \mu\text{g/g}$$

$$x = 10^{(15.8-22.65)/6.739} = 0.096 \mu\text{g/g}$$

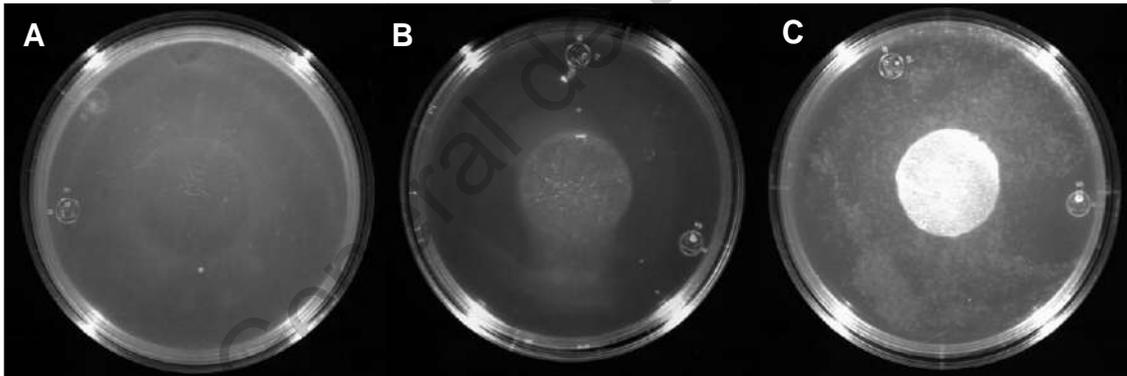
Con lo anterior para el día 4 del reto antimicrobiano, se reporta una concentración de nisina de $0.073 \pm 0.011 \mu\text{g/g}$ de nisina pura.

Anexo 4. Imágenes de actividad antimicrobiana de las películas comestibles.

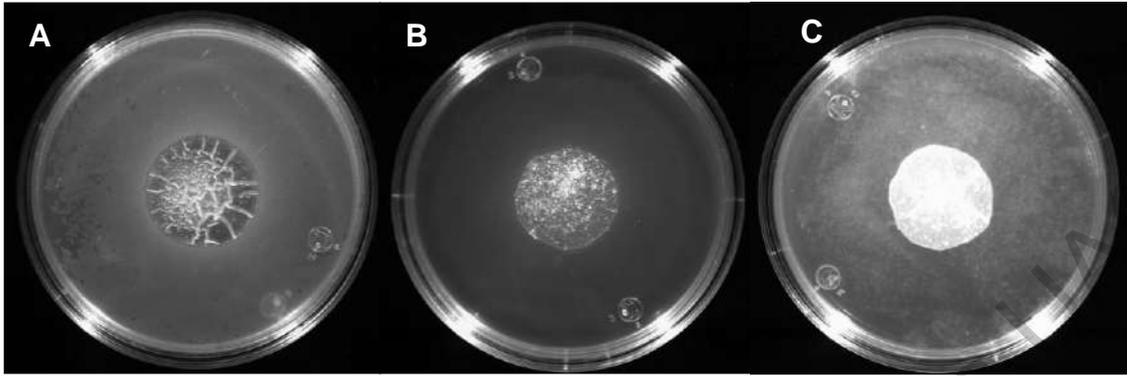
4A. Actividad antimicrobiana *in vitro* de las películas de QT contra *Salmonella Typhimurium* (A), *Listeria monocytogenes* (B) y *Penicillium expansum* (C).



4B. Actividad antimicrobiana *in vitro* de las películas de CS contra *Salmonella Typhimurium* (A), *Listeria monocytogenes* (B) y *Penicillium expansum* (C).



4C. Actividad antimicrobiana *in vitro* de las películas de CS:QT contra *Salmonella Typhimurium* (A), *Listeria monocytogenes* (B) y *Penicillium expansum* (C).



4D. Actividad antimicrobiana *in vitro* de las películas de CS:QT + LAE + NAT contra *Salmonella Typhimurium* (A), *Listeria monocytogenes* (B) y *Penicillium expansum* (C).

