

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE  
 $\epsilon$ -POLILISINA-L Y NATAMICINA, SU INCORPORACIÓN  
EN UN EMPAQUE ACTIVO Y APLICACIÓN EN QUESO  
FRESCO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**ANA VIOLETA OCHOA RICO**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2009**

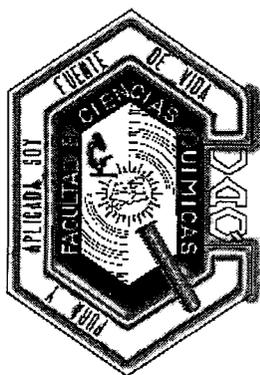
**BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

No. Adq. 1759034

Clas. JS

637.3

816e



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE  
 $\epsilon$ -POLILISINA-L Y NATAMICINA, SU INCORPORACIÓN  
EN UN EMPAQUE ACTIVO Y APLICACIÓN EN QUESO  
FRESCO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**ANA VIOLETA OCHOA RICO**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ**

**SINODALES**

**Dra. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ**  
DIRECTOR

\_\_\_\_\_

**Q. en A. RAFAEL PÉREZ MUÑOZ**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**Dra. SILVIA AMAYA LLANO**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco infinitamente a Dios por llenar mi vida de dicha y bendiciones.*

*Esta tesis esta dedicada a mis padres ha quienes les agradezco de todo corazón, por darme la estabilidad emocional, económica y sentimental; para poder alcanzar esta meta, ya que no hubiese podido ser realidad sin ustedes, su esfuerzo se convirtió en su triunfo y el mío, LOS AMO GRACIAS.*

*Gordito, serás siempre mi inspiración para lograr mis metas, sabes que eres una parte muy importante en mi vida me has enseñado muchos valores, y si no fuese por ti no me encontraría disfrutando de este momento GRACIAS.*

*Madre gracias por todo el amor desmedido que muestras por cada uno de tus hijos especialmente gracias por el que me has dado a mí, por enseñarme que de todo se aprende y que todo esfuerzo al final es recompensado.*

*Agradezco a mis hermanos por la compañía y el apoyo que me brindan. Se que cuento con ustedes siempre, especialmente a mi Pijo por darme lata y provocarme un pff siempre que intentaba concentrarme, a mi hermanucha Nallely que aunque me abandono a medio camino me apoyo muchísimo.*

*Agradezco a mis amigos por su confianza y lealtad, a todos tanto los pasados como presentes; pasados por ayudarme a crecer y madurar como persona y presentes Indy, Evelyn, Naye, Chivis, Miriam, y Fersito, a todos los Chilitwilis Gracias por estar siempre conmigo apoyándome en todas las circunstancias posibles, también son parte de esta alegría, LOS RECUERDO SIEMPRE Y LOS QUIERO MUCHISIMO.*

*Lolis gracias por el sin número de consejos que me has dado por escucharme y por formar parte de mi formación, por tu comprensión y regaños de igual forma.*

*Agradezco a mis maestros por la disposición y ayuda brindada, especialmente a la Dra. Blanca García y a el Dr. Carlos Regalado.*

*Dra. Blanca le agradezco el apoyo, la paciencia y los regaños dados a lo largo del proyecto que realizamos ya que me enseñó a esforzarme más y por lo tanto a ser una mejor persona tanto académicamente como personalmente.*

*Y a todos aquellos, que han quedado en los recintos más escondidos de mi memoria, pero que fueron partícipes Gracias.*

## ÍNDICE GENERAL

	Página
Contenido	i
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II.1 Quesos	4
II.1.2 Definición	4
II.1.3 Clasificación de los quesos	4
II.1.3.1 Quesos frescos	5
II.1.4 Especificaciones microbiológicas	5
II.1.5 Conservadores	6
II.1.6 Defectos en queso	6
II.1.7 Hongos y levaduras	7
II.1.8 Contaminación por hongos en queso	7
II.2 Alteración de los alimentos	7
II.2.1 Importancia del control microbiano	8
II.2.2 Barreras múltiples	9
II.2.3 Protecciones, químicos y compuestos antimicrobianos naturales	10
II.3 Características de antimicrobianos naturales	11
II.3.1 $\epsilon$ -Polilisina-L	11
II.3.2 Nikon-LQ*®	13
II.3.3 Natamicina	14
II.3.3.1 Propiedades físicas y químicas de la natamicina	14
II.3.3.2 Actividad antimicrobiana	14
II.3.3.3 Modo de acción	15
II.3.3.4 Estado regulatorio	18
II.4.1 La selección de agentes o técnicas antimicrobianas	18
II.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	18

II.6.1 Material de empaque comestible y biodegradable	21
II.7.1 Propiedades de la proteína de suero	22
III. HIPÓTESIS	24
IV. OBJETIVOS	25
IV.1 General	
IV.2 Específicos	
V. METODOLOGÍA	26
V.1 Materiales	26
V.1.1 Cepas	26
V.1.2 Antimicrobianos	26
V.1.3 Soluciones y medios de cultivo	26
V.1.3.1 Diluyente de peptona al 0.1% (p/v)	26
V.1.3.2 Tween 20 al 50% (v/v)	26
V.1.3.3 Agar MRS al 1% (p/v)	26
V.1.3.4 Agar Assay al 1% (p/v)	26
V.1.3.5 Agar infusión cerebro corazón (BHI) al 1% (p/v)	27
V.1.3.6 Agar Papa dextrosa Agar (PDA) 1% (p/v)	27
V.1.3.7 Medio de Levaduras (YPD)	27
V.1.3.8 Medio de Levaduras (NYDA)	
V.1.3.9 Medio Baird-Parker	27
V.2 Métodos	28
V.2.1 Activación de cepas microbianas	28
V.2.2 Método de recuento bacteriano Miles-Misra (método de la gota).	29
V.2.3 Método de difusión en agar	28
V.2.4 Cinéticas de crecimiento	31
V.2.5 Preparación del material de empaque biodegradable como recubrimiento	32
V.2.6 Inoculación del alimento modelo (queso panela) con <i>Staphylococcus aureus</i>	32

V.2.7 Determinación de la actividad antimicrobiana del recubrimiento activo	32
V.2.8 Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico	33
V.2.9 Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> en queso panela	33
VI. RESULTADOS	34
VI.1 Evaluación del espectro antimicrobiano de $\epsilon$ -polilisina-L	34
VI.2 Cinética de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> frente a $\epsilon$ -polilisina-L y nicon-LQ*®	36
VI.3 Evaluación el efecto combinado de los antimicrobianos naturales $\epsilon$ -polilisina-L y natamicina	42
VI.4 Incorporación de $\epsilon$ -polilisina-L a materiales de empaque	48
VI.5 Mezcla de antimicrobianos naturales $\epsilon$ -polilisina-L y natamicina incorporado a queso fresco	51
VII. DISCUSIÓN	56
VIII. CONCLUSIONES	62
XI. BIBLIOGRAFÍA	64
XII. ANEXO	67

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Contenido de humedad, en diferentes tipos de quesos.	5
2	Especificaciones microbiológicas en quesos frescos, madurados y procesados.	5
3	Límites máximos en la adición de conservadores de algunos quesos.	6
4	Espectro de actividad de $\epsilon$ -polilisina-L (adaptado de Handary Bio-Engineering B.V., 2004).	12
5	Áreas de aplicación y dosis en ppm de nicon-LQ*® (adaptado de Argarza S. A. de C. V., 2004).	13
6	Sensibilidad de hongos a la natamicina (adaptado de Davidson y col., 2005).	16
7	Sensibilidad de levaduras a la natamicina (adaptado de Davidson y col., 2005).	17
8	Brotos de gastroenteritis producidos por enterotoxinas estafilocócicas y casos en los Estados Unidos, 1973-1987 (adaptado de Lund y col., 2000).	20
9	Principales agentes etiológicos reportados en brotes en diversos países de Europa, 1990-1992 (adaptado de Lund y col., 2000).	20
10	Microorganismos transmitidos por el consumo de quesos (adaptado de Ramírez y col., 2002).	20
11	Proteínas utilizadas en empaques comestibles y biodegradables.	21
12	Medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación para cada uno de los microorganismos utilizados.	29
13	Asignación de intervalos de tiempo para las muestras de $\epsilon$ -polilisina-L y natamicina.	31

14	Efecto mostrado por microorganismos Gram (+), Gram (-), hongos y levaduras frente a dos antimicrobianos naturales $\epsilon$ -polilisina-L y nicon-LQ*®.	35
15	Cantidades de $\epsilon$ -polilisina-L para determinar la concentración a utilizar, usando como microorganismo indicador <i>M. luteus</i> NCIB8166 mediante la técnica de difusión en agar.	37
16	Mezclas de natamicina y $\epsilon$ -polilisina-L, utilizando <i>M. luteus</i> NCIB8166 como microorganismo indicador mediante la técnica de difusión en agar.	48
17	Efecto de $\epsilon$ -polilisina-L, aplicado a películas activas, en concentración de 500 ppm y 1500 ppm.	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura de $\epsilon$ -polilisina-L, homopolímero de L- lisina.	12
2	Estructura de Natamicina.	15
3	Método de recuento bacteriano Miles-Misra.	30
4	Esquema del método de difusión en agar.	30
5	Diferentes tratamientos aplicados en superficie de queso fresco.	33
6	Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> , usando diferentes concentraciones de nicon-LQ* <sup>®</sup> , en caldo BHI.	42
7	Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> , usando diferentes concentraciones de $\epsilon$ -polilisina-L en caldo BHI.	43
8	Comparación de nicon-LQ* <sup>®</sup> y $\epsilon$ -polilisina-L sobre el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> , en una concentración de 3 ppm.	43
9	Crecimiento de <i>P. membranifaciens</i> con diferentes concentraciones de $\epsilon$ -polilisina-L, en caldo NYDA.	45
10	Cinética de <i>P. membranifaciens</i> con diferentes concentraciones de natamicina, en caldo NYDA.	46
11	Crecimiento de <i>M. luteus</i> NCIB8166, usando la mezcla a M1 y M2, en caldo assay.	49
12	Crecimiento de <i>S. aureus</i> , usando las mezclas M1 y M2, en medio BHI.	49
13	Crecimiento de <i>Salmonella spp.</i> , frente a M1 y M2, en medio BHI.	50
14	Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> , frente a M1 y M2, en medio BHI.	50
15	Trozos de queso fresco panela de 7cm x 3 cm, con un peso de 15 g, inoculados con 500 $\mu$ L de <i>S. aureus</i> alcanzando una población de $10^7$ ufc/mL.	54

16	Tratamientos aplicados sobre queso fresco panela (T1: con recubrimiento / sin vacío; T2: con recubrimiento / con vacío; T3: sin recubrimiento / con vacío; T4: sin recubrimiento / sin vacío).	54
17	Cuenta de ufc/mL, utilizando la técnica de extensión en superficie.	54
18	Efecto de diferentes tratamientos (T1: con recubrimiento / sin vacío; T2: con recubrimiento / con vacío; T3: sin recubrimiento / con vacío; T4: sin recubrimiento / sin vacío), sobre queso fresco inoculado con <i>S. aureus</i> .	55

## RESUMEN

La conservación de alimentos requiere de la eliminación o limitación de la habilidad de los microorganismos deterioradores y patógenos de crecer, y del empaque para limitar la contaminación posterior. Desde una perspectiva de seguridad alimentaria, el empaque cumple con dos funciones: previene la contaminación y alarga la efectividad de los métodos de conservación del alimento. La creciente demanda en alimentos frescos de contar con alta calidad y una larga vida de anaquel, en conjunto con el reclamo ambiental de reducir los desperdicios sólidos, ha incrementado el interés en la investigación sobre recubrimientos comestibles con antimicrobianos incorporados, ya que éstos sirven como barreras múltiples de protección y conservación, para mantener las características y prolongar la vida de anaquel de los alimentos frescos. En este trabajo se estudió el espectro de  $\epsilon$ -polilisina-L comparándolo con otros antimicrobianos naturales tales como natamicina y nicon-LQ\*<sup>®</sup>, con el objetivo de evaluar su actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos incluyendo bacterias Gram (+), Gram (-), hongos y levaduras. Se adicionaron dos diferentes antimicrobianos naturales  $\epsilon$ -polilisina-L y natamicina a soluciones filmogénicas a base de aislado proteína de suero, que sirvieron como recubrimientos activos. Posteriormente se evaluó su efectividad en queso fresco inoculado con *Staphylococcus aureus*. La demanda actual de los consumidores por alimentos seguros, ha llevado a la aplicación de diversas barreras para garantizar la inocuidad microbiana en alimentos frescos, en los que existe el riesgo de contaminación y desarrollo de diferentes microorganismos patógenos.

## I. INTRODUCCIÓN

Los antimicrobianos naturales, son compuestos con capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos, incluyendo bacterias, virus y hongos, constituyen cada vez una nueva forma de garantizar alimentos seguros, manteniendo inalterable la calidad del alimento. Los microorganismos contaminan los alimentos y producen cambios químicos en ellos, deteriorándolos y modificando sus propiedades convirtiéndolos en dañinos para la salud.

El consumo de queso fresco, esto es preparado sin el uso controlado de cultivos iniciadores, a diferencia de los quesos madurados, generalmente implica un riesgo a la salud. El problema es mayor cuando la leche utilizada en su elaboración no ha sido pasteurizada y ha recibido un tratamiento térmico adecuado. En muchos países subdesarrollados, existe una gran demanda de la población por este tipo de productos. Los riesgos sanitarios implicados se configuran por tres elementos fundamentales:

- a) La exposición a la contaminación microbiana de la materia prima a lo largo de la fabricación y comercialización.
- b) La composición de un sustrato muy favorable para el desarrollo microorganismos deterioradores como patógenos.
- c) La ausencia de tratamientos antimicrobianos previo a su consumo.

La elaboración de quesos tiene una tecnología muy elemental que puede seguirse en el hogar, de igual forma en las plantas procesadoras, las cuales generan grandes volúmenes. En ellas se utiliza leche pasteurizada y como protección un empaque. Sin embargo el producto no se encuentra exento de una contaminación posterior ya que después de la pasteurización de la leche, éste es manejado sin ningún tipo de tratamiento, hasta llegar el momento de empacarlo ya sea con una envoltura o un empaque hermético.

De igual forma, las pérdidas económicas que de ellos se derivan pueden ser muy sustanciosas. Por ello es necesario disponer de procedimientos para controlar la contaminación y el crecimiento microbiano. Por tal debe existir un control que se refiere a la inhibición, muerte o eliminación de los microorganismos.

Considerando los recubrimientos activos o películas activas, en los cuales se adicionaría el agente antimicrobiano que ayuda a conservar el alimento, alargando su vida de anaquel. Estos recubrimientos activos pueden ser incorporados al queso fresco, evitando la proliferación en caso de existir una contaminación posterior.

La creciente demanda en alimentos frescos, de contar con alta calidad y una larga vida de anaquel, en conjunto con el reclamo ambiental de reducir los desperdicios sólidos, ha incrementado el interés en la investigación sobre recubrimientos comestibles con antimicrobianos incorporados, ya que éstos sirven como barreras de protección y conservación, para mantener las características y prolongar la vida de anaquel de los alimentos frescos.

Aunque estas películas y recubrimientos activos no están pensadas como reemplazos totales de los empaques sintéticos, tienen potencial para reducir su uso y para limitar la migración de humedad, aromas y lípidos entre los componentes de los alimentos, o ser acarreadores de agentes antioxidantes y antimicrobianos, donde los empaques tradicionales no pueden funcionar.

Anualmente se dispone en el mercado de nuevos antimicrobianos para enfrentar el problema de la resistencia microbiana, las bacterias son capaces de desarrollar “defensas” más efectivas contra estos nuevos y poderosos antimicrobianos. Las características mismas de los microorganismos hacen que la lucha contra ellos se haya convertido en una carrera donde ha habido la necesidad de emplear todo tipo de estrategias, desde la búsqueda de compuestos nuevos con mayor actividad biológica, hasta el diseño de moléculas nuevas mediante procedimientos de

biotecnología, pasando por combinaciones de antimicrobianos. La resistencia bacteriana es un tema muy importante en el estudio de los antimicrobianos.

El género *Staphylococcus* es uno de los grupos bacterianos el cual se ha estudiado frente a diferentes antimicrobianos; se encuentran en piel, mucosas y pueden llegar a los alimentos, a través de manipuladores con infecciones piógenas agudas o por portadores asintomáticos, se albergan en fosas nasales y faringe. Asociando su presencia en alimentos a una inadecuada manipulación, o al empleo de materia prima contaminada constituyendo, a su vez una fuente de diseminación a nuevos hospedadores susceptibles de adquirir la infección.

Por tal motivo y con el fin de encontrar la mejor opción de un agente antimicrobiano que contribuya en la industria láctea, específicamente en la prevención para la contaminación de queso fresco, serán analizados los antimicrobianos naturales  $\epsilon$ -polilisina-L, natamicina y nicon-LQ\*®.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Quesos

#### II.1.2 Definición

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, microorganismos lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, presada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos de acuerdo a su proceso: fresco, madurado o procesado (NOM-121-SSA1-1994).

Según el Codex Alimentarius (1999), el queso se define como un producto lácteo elaborado con la cuajada de leche entera, parcial o totalmente descremada de vaca o de otra especie animal, por la coagulación de la caseína con el cuajo (quimosina o renina), otras enzimas, microorganismos lácticos, ácidos orgánicos, etc., y la adición o no de fermentos de maduración láctica, mohos especiales, aditivos y condimentos.

#### II.1.3 Clasificación de los quesos

Los quesos pueden clasificarse de acuerdo a;

- a) El contenido de humedad (Cuadro 1);
- b) El proceso de elaboración; en donde se cuenta con quesos frescos (sin maduración, sin adición de fermento), quesos madurados (con maduración y adición de fermento), quesos fundidos (procesados a partir de la fusión de diferentes variedades de quesos) (Codex Alimentarius, 1999).

De acuerdo a la NOM-121-SSA1-1994, los quesos se clasifican por su proceso en frescos, madurados y procesados. Dentro de los frescos encontramos; frescales (panela, canasto, sierra, rancho, fresco, blanco, enchilado adobado), de pasta

cocida (oaxaca, asadero, mozzarella, del morral, adobera), acidificados (cottage, crema, doble crema, petit suisse, neufchatel).

Cuadro 1. Contenido de humedad, en diferentes tipos de queso (Codex Alimentarius, 1999).

Clases	% (p/p) de humedad de quesos descremados
Frescos	60 – 80
Blandos	55 – 60
Semiduros	42 – 55
Duros	20 – 42

#### II.1.3.1 Quesos frescos

Queso fresco, producto que cumple con lo señalado en el punto II.1.2 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 (método de conservación que mantienen el producto a una temperatura máxima de 7°C) (NOM-121-SSA1-1994).

#### II.1.4 Especificaciones microbiológicas

De acuerdo a la NOM-121-SSA1-1994, estos parámetros incluyen microorganismos indicadores, deterioradores y patógenos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Especificaciones microbiológicas en quesos frescos.

Microorganismos	Frescos	Madurados	Procesados
Limite Máximo			
Coliformes fecales (NMP/g)	100	50	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ufc/g)	1000	100	Menos de 100
Hongos y levaduras (ufc/g)	500	500	100
<i>Salmonella</i> en 25 g	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Listeria monocytogenes</i> en 25 g	Negativo	Negativo	Negativo

### II.1.5 Conservadores

De acuerdo a la NOM-121-SSA1-1994, los conservadores sólo son permitidos en tipo procesado (Cuadro 3).

Cuadro 3. Límites máximos en la adición de conservadores de algunos quesos.

Quesos	Límite máximo %
<b>Madurados</b>	
Acido sórbico o propiónico o sus sales de sodio o potasio (sólo en superficie de quesos).	0.1
Natamicina o Pimaricina (sólo en la superficie de los quesos).	0.002
Nitrato de sodio o potasio (sólo para quesos de pasta).	0.005
<b>Procesados</b>	
Acido propiónico y sus sales de sodio o calcio, mezclados o individualmente.	0.3
Acido sórbico o sus sales de sodio o potasio, mezclados o individualmente.	0.3
Nisina	0.00125
Se permite el empleo de peróxido de hidrógeno en la elaboración de queso Cheddar.	0.05

### II.1.6 Defectos en queso

El defecto mayor en queso es a causa de presencia de esporas, usualmente resulta por la formación de gas de bacterias en crecimiento, como *Clostridium tyrobutyricum* el cual ocasiona el crecimiento de *C. sporogenes* y *C. butyricum*. Estos defectos ocurren en quesos madurados y se prolonga a lo largo de las semanas a medida que el queso se envejece. Los quesos procesados son susceptibles a la contaminación ya que las esporas no son inactivadas con el calor del proceso. El resultado del gas producido durante la fermentación está asociado con la formación de ácido butírico, ácido acético, dióxido de carbono e hidrógeno por lo cual el sabor así como la apariencia son afectados.

### II.1.7 Hongos y levaduras

El crecimiento de hongos y levaduras es una causa común de contaminación en productos lácteos fermentados porque pueden crecer bien por el pH bajo. La contaminación por levaduras es manifestada por el olor a frutas y la formación de gas. El queso elaborado de manera adecuada se realiza con bajas cantidades de lactosa, y así el potencial de crecimiento de la levadura es limitado. Diferentes productos derivados de leche como el yogurt y queso fresco, contienen niveles fermentables de lactosa por tal es probable la contaminación por levaduras. En queso Cheddar el sabor es modificado por el crecimiento de *Candida sp.*, asociado con concentraciones elevadas de etanol, acetato de etilo y butirato de etilo. El queso es afectado por el alto contenido de humedad y bajo contenido de sal, esto contribuye con el crecimiento de levaduras. Las levaduras capaces de producir enzimas proteolíticas y lipolíticas también pueden tener una ventaja selectiva del crecimiento en productos lácteos.

### II.1.8 Contaminación por hongos en queso

El crecimiento de hongos en queso es un problema de gran importancia, que data desde la prehistoria. El hongo más común encontrado en queso es *Penicillium spp.*; otros géneros incluyen *Aspergillus*, *Alternaria*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Geotrichum* y *Hormodendrum* especies que se encuentran ocasionalmente. En producto procesado contaminado por hongos las especies aisladas, incluyen a *P. roqueforti*, *P. cyclopium*, *P. viridicatum*, y *P. crustosum*. En queso Cheddar empacado al vacío se ha encontrado hongos como *Cladosporium cladosporioides*, *P. commune* y especies de *Phoma*, *Candida sp.*, es una levadura que ha sido aislada de queso empacado al vacío (Doyle y col., 2005).

### II.2 Alteración de los alimentos

Se entiende por alteración de los alimentos el cambio en las características sensoriales, es decir, en la apariencia, olor o sabor que los hace inaceptables para el consumo. Los alimentos alterados no tienen necesariamente que ser peligrosos

para la salud, pero en pocos casos la alteración es producida por microorganismos patógenos. Los alimentos alterados generalmente se consideran no aptos para el consumo humano y no pueden distribuirse o consumirse. La alteración de los alimentos causa importantes pérdidas económicas a los productores, distribuidores e incluso a los consumidores, en forma de elevación de precio y restricción de abastecimiento.

Dado que los alimentos son material orgánico, pueden proveer nutrientes para el crecimiento de una amplia variedad de bacterias. Las características físicas y químicas de los alimentos determinan su grado de susceptibilidad a la actividad microbiana. Con respecto a la alteración, los alimentos se pueden clasificar en tres categorías principales:

- 1) Alimentos perecederos, tales como alimentos frescos.
- 2) Alimentos semiperecederos, tales como frutos secos.
- 3) Alimentos no perecederos, tales como la harina o el azúcar.

#### II.2.1 Importancia del control microbiano

Las principales razones para controlar a los microorganismos pueden resumirse en:

- 1) Para evitar la transmisión de la enfermedad y la infección.
- 2) Para erradicar los microorganismos de un hospedador que está infectado.
- 3) Para prevenir el deterioro y alteración de los alimentos por los microorganismos.

Muchos factores y condiciones influyen sobre la tasa con que son inhibidos o destruidos los microorganismos por un agente o proceso antimicrobiano. Todos deben tenerse en consideración para hacer una aplicación práctica y efectiva de los métodos de control (Brock y col., 2004).

Los hongos y levaduras causantes de alteraciones de los productos y derivados lácteos, pueden aislarse en la planta procesadora, en el equipo, aire, salmueras y en el medio ambiente (suelos, paredes, conductos de ventilación, etc.). Por tal motivo el producto pasteurizado debe evitar la exposición a estas fuentes. Si el nivel inicial de contaminación es controlado a lo largo del proceso, las estrategias para inhibir el crecimiento son más probables que resulten exitosas. Estas estrategias incluyen el empaçado, reducción del oxígeno, almacenamiento en frío, el uso de agentes químicos como antimicrobianos, sorbato, y natamicina. Ninguna de estas medidas es totalmente eficaz.

El queso empaçado es susceptible debido a defectos en el empaque, en los pliegues o arrugas formadas en la película plástica pueden crecer hongos. Algunos hongos son resistentes a los aditivos, por tal es recomendado el uso de barreras múltiples con lo cual podemos lograr una protección de nuestro alimento por un periodo más largo, sumando cada una de ellas a la protección de nuestro producto (Doyle y col., 2005).

### II.2.2 Barreras múltiples

La contaminación y deterioro del alimento por microorganismos, es un problema a pesar de las múltiples técnicas para la conservación del alimento (refrigeración, pasteurización, enlatado entre otros). La demanda actual del consumidor por productos frescos y naturales ha llevado al uso de técnicas aplicables (atmosferas modificadas, bioconservación, cadenas de refrigeración), generando más dificultades. Por tal existe una gran demanda por fabricantes de alimentos frescos, para brindar seguridad al consumidor. La tecnología de barreras múltiples (también llamada, métodos combinados, procesos combinados, o tecnología de barreras), busca mediante un serie de técnicas establecidas como factores de conservación (barreras), mantener la calidad microbiológica del alimento. Estas barreras pueden ser la temperatura, actividad de agua ( $a_w$ ), pH, etc. Un microorganismo requiere una cierta cantidad de esfuerzo para superar cada barrera. Algunas barreras, como

la pasteurización, pueden ser altas para un gran número de microorganismos, respecto a otras barreras, como la concentración de sal, la cual tiene menor efecto y está limitado en el rango de microorganismos que afecta. La barrera de mayor esfuerzo necesita ser vencida por un gran número de microorganismos. La combinación de diferentes barreras le da al alimento factores de conservación, para mantener una estabilidad microbiológica. El concepto de barreras múltiples se ha aplicado en una gran variedad de alimentos; frutas, verduras, productos de panadería, lácteos, pescado etc. Varios factores para conservar el alimento se siguen estudiando e implementado como: la producción de bacteriocinas, el uso de empaque comestibles, empaques activos, ultrapasteurización, facilitando mantener el alimento por un periodo mucho más largo (vida de anaquel). La aplicación de este concepto ha sido muy exitoso, ya que el uso de barreras múltiples en el alimento logra la estabilidad microbiana y seguridad al consumidor (Leistner y Gorris, 1995).

### II.2.3 Protecciones, químicos y compuestos antimicrobianos naturales.

La calidad de un producto alimenticio disminuye a medida que transcurre el tiempo de la cosecha, madurez, etc., hasta el momento que se consume. La pérdida de la calidad puede ser debida a factores microbiológicos, enzimáticos, cambios físicos y químicos. Al disminuir la calidad causada por microorganismos, genera pérdidas y arriesga al consumidor debido a la presencia de toxinas y microorganismos patógenos. Muchas tecnologías de conservación del alimento, se encuentran en uso protegiéndolo de efectos microbianos y del deterioro inherente. Los microorganismos pueden ser inhibidos ya sea enfriando, reduciendo la actividad de agua, con la restricción de nutrientes, acidificando, modificando la atmósfera de empaquetado, utilizando fermentación o a través de la adición de compuestos antimicrobianos. Los antimicrobianos adicionados a los alimentos retardan el crecimiento microbiano, resistiéndose al deterioro dando seguridad y calidad (Leistner, 2000).

## II.3 Características de antimicrobianos naturales

### II.3.1 $\epsilon$ -Polilisisina-L

La  $\epsilon$ -polilisisina-L es un agente antimicrobiano natural producido por fermentación de una cepa no patogénica, no toxigénica. Es un homopolímero de L-lisina, aminoácido que es común en varias proteínas. El polímero consiste en aproximadamente 30 unidades de L-lisina con un peso molecular de 4700 Da y una fórmula empírica de  $C_{180}H_{362}N_{60}O_{31}$  (Handary, 2004).

El nombre sistemático es poli[imino (2-amino-1-oxo-1,6-hexadietil)] (Figura 1). Es fabricado por la fermentación utilizando una cepa no patógena y no tóxica de *Lysinopolymerus* de la subespecie del albulus de los *Streptomyces* bajo condiciones aerobias.

Después de la fermentación los microorganismos se eliminan por filtración en membrana. La  $\epsilon$ -polilisisina-L en líquido es purificada más a fondo pasándolo a través de una resina de intercambio iónico con carbón activado, y secuencialmente el paso a través de tres resinas de intercambio iónico y después concentrado por evaporación. Los sólidos resultantes de  $\epsilon$ -polilisisina-L se pulverizan o se atomizan para producir el polvo fino deseado (Hiraki, 1995).

Este aditivo obtuvo su estatus GRAS (Numero GRN 000135) otorgado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) en Enero de 2004, fue otorgado a Chisso Corporation. Para su uso como agente antimicrobiano en arroz cocido y arroz en sushi en niveles hasta de 50 mg/kg de arroz (FDA, 2004).

Se han reportado datos de  $\epsilon$ -polilisisina-L abarcando un gran espectro de inhibición, (Cuadro 4), tanto bacterias Gram (+), Gram (-), como hongos y levaduras, reportándose las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC).

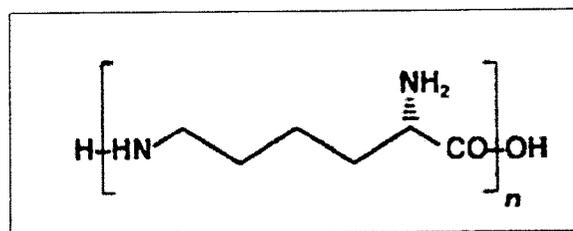


Figura 1. Estructura de  $\epsilon$ -polilisina-L, homopolímero de L-lisina (Handary, 2004).

Cuadro 4. Espectro de actividad de  $\epsilon$ -polilisina-L (adaptado Handary, 2004).

Grupo	Especie	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )
Hongos	<i>Aspergillus niger</i> IFO4416	250
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> IFO7522	60
Levaduras	<i>Candida acutus</i> IFO1912	6
	<i>Phaffia rhodozyma</i> IFO10129	12
	<i>Pichia anomala</i> IFO0146	150
	<i>P. membranifaciens</i> IFO0577	<3
	<i>Rhodotorula lactase</i> IFO1423	25
	<i>Sporobolomyces roseus</i> IFO1037	<3
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> IFO1130	150
Bacterias Gram-positivas	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> IFO12550	5
	<i>Bacillus coagulans</i> IFO12583	10
	<i>B. subtilis</i> IAM1069	<3
	<i>Clostridium acetobutylicum</i> IFO13948	32
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> IFO3832	50
	<i>Lactobacillus brevis</i> IFO3960	10
	<i>L. plantarum</i> IFO12519	5
	<i>Micrococcus luteus</i> IFO12708	16
	<i>Staphylococcus aureus</i> IFO13276	12
	<i>Streptococcus lactis</i> IFO12546	100
Bacterias Gram-negativas	<i>Raoultella planticola</i> IFO3317	8
	<i>Campylobacter jejuni</i>	100
	<i>Escherichia coli</i> IFO13500	50
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO3923	3
	<i>Salmonella typhimurium</i>	16

### II.3.2 Nicon-LQ\*®

Es un conservador a base de extracto de semilla de toronja, que se ha recomendado como aditivo de incorporación directa en lácteos; cremas, quesos frescos, quesos procesados, yogurt, etc. Altamente microbicida, no tóxico, no volátil e inodoro, de acción antioxidante. En su formulación, el complejo de toronja cuenta con trazas de elementos químicos naturales como el ácido ascórbico o vitamina C, ácido palmítico, aminoácidos, fracciones de azúcares, etc. Es un líquido ligeramente viscoso.

Su modo de acción es por contacto directo con poder de penetración rápida y eficaz que produce el rompimiento de la pared celular de los microorganismos. Es un antimicrobiano de amplio espectro ya que ataca bacterias Gram (+), Gram (-), hongos y levaduras. Las dosis sugeridas por el fabricante se muestran en el Cuadro 5, (Argarza, 2004).

Cuadro 5. Areas de aplicación y dosis en ppm de nicon-LQ\*®  
(adaptado de Argarza, 2004).

<b>Aéreas de aplicación</b>	<b>*Dosis</b>
En quesos: frescos, panela, mozzarella, chihuahua, manchego, análogo, asadero, cottage, rancho, adobera, requesón, etc.	1000 ppm 3000 ppm 5000 ppm
Sanitización en ambientes y procesos.	500 ppm 1000 ppm
Formulación de crema.	120 a 140 ppm/2400 L de crema.
Queso asadero.	500 ppm 1000 ppm
Yogurt.	300 ppm 400 ppm

\*Concentraciones de 300 a 16,000 ppm, alteran el sabor por lo que el límite de la concentración es el umbral del sabor.

### II.3.3 Natamicina

La natamicina ha sido utilizada por varios años como un conservador para la prevención del deterioro como resultado del crecimiento de hongos y levaduras asociados con varios alimentos y bebidas. Fue descubierta por primera vez en 1955 en un cultivo filtrado de *Streptomyces natalensis* aislado de una muestra de tierra de la provincia natal, del sur de África, y es de esta región que se deriva su nombre. Un primer nombre fue pimaricina, pero aunque este nombre puede ser encontrado en antiguas publicaciones, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ya no acepta este nombre (Davidson y col., 2005).

La natamicina es particularmente útil en alimentos para prevenir el crecimiento de hongos, los cuales crecen sobre alimentos de bajo pH, humedad y actividad de agua, el hongo es también capaz de crecer a bajas temperaturas (Davis y Diner, 1987).

#### II.3.3.1 Propiedades físicas y químicas de la natamicina

La natamicina es un polieno tetraeno con peso molecular de 665.7 Da. El nombre químico completo es 22-(3-amino-3,6didesoxi-β-D-mano piranosol) oxi 1, 3, 26 trihidroxi-12-metil-10-oxo-6, 11, 28-trioxiatri o catosa-8, 14, 16, 18, 20-pentaeno-25-ácido carboxílico. La formula empírica es  $C_{33}H_{47}NO_{13}$  y la estructura completa fue esclarecida por Ceder en 1964 (Figura 2). Este polvo puede ser almacenado por varios años teniendo una pérdida mínima de su actividad, la cual disminuye principalmente por el desdoblamiento hidrolítico de la natamicina en micosamina y aponatamina (Lancelin y Beau, 1995).

#### II.3.3.2 Actividad antimicrobiana

La natamicina es activa contra casi todas las levaduras y hongos pero no tiene efecto sobre bacterias, protozoos o virus. La industria alimentaria que se basa en fermentaciones de bacterias ha encontrado a la natamicina como un excelente conservador por que no interfiere con la fermentación o con procesos de

maduración. Muchos hongos son inhibidos a concentraciones de 0.5 a 25  $\mu\text{g/mL}$  como lo muestra el Cuadro 6. Una gran cantidad de levaduras son inhibidas a concentraciones de 1.0 a 5.0  $\mu\text{g/mL}$ , (Cuadro 7) (Davidson y col., 2005).

### II.3.3.3 Modo de acción

La membrana de la célula eucariota contiene lípidos, fosfolípidos, proteínas y esteroides. Los esteroides juegan un papel importante en la acción selectiva de los polienos antimicóticos, tal como es la natamicina. El ergosterol es el más importante esteroide en la membrana celular de los hongos y levaduras.

La natamicina (Figura 2) tiene una alta afinidad por el ergosterol, por lo tanto se liga irreversiblemente al ergosterol de la membrana celular de los hongos. Estos cambios de la membrana celular conducen a la rápida liberación de iones esenciales y pequeños péptidos, lo cual conduce a la lisis de la célula (Roller, 2003).

El ergosterol está ausente en las membranas celulares de los virus, bacterias y protozoos, lo cual explica porque estos microbios son resistentes a la natamicina (Hamilton-Miller, 1974).

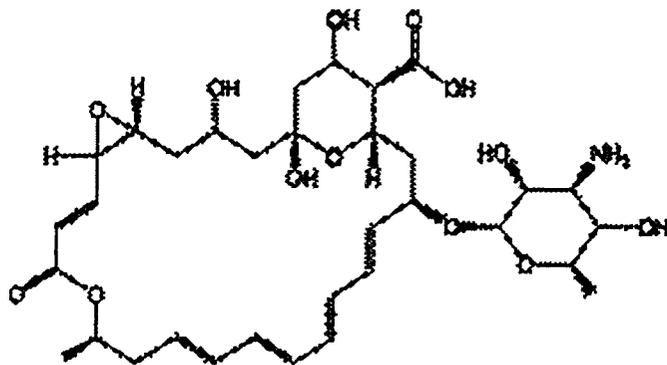


Figura 2. Estructura de la natamicina (Davidson y col., 2005).

Cuadro 6. Sensibilidad de hongos a la natamicina (adaptado de Davidson y col., 2005).

Especie	CMI <sup>a</sup> (µg/mL)
<i>Byssosclamyces fulva</i> 040021	0.1-1.25
<i>Penicillium candidum</i> S66	0.1-1.25
<i>P. chrysogenum</i> S138	0.1-1.25
<i>P. commune</i> ABC118	0.1-1.25
<i>P. cyclopium</i> S124	0.1-1.25
<i>P. nalgiovense</i> S125	0.1-1.25
<i>Aspergillus chevalieri</i> 4298	0.1-2.5
<i>A. clavatus</i>	0.1-2.5
<i>A. nidulans</i>	0.1-2.5
<i>A. ochraceus</i> 4069	0.1-2.5
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0.1-2.5
<i>Gloeosporium album</i>	0.1-2.5
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.1-2.5
<i>P. islandicum</i>	0.1-2.5
<i>P. verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>	0.1-2.5
<i>Sclerotinia fructicola</i>	0.1-2.5
<i>Botrytis cinérea</i>	1-25
<i>Aspergillus niger</i> CBS733.88	2.5
<i>A. versicolor</i> 108959	2.5
<i>B. nivea</i> 163642	2.5
<i>Fusarium solani</i> S200	2.5
<i>P. roqueforti</i> S44	2.5
<i>Absidia</i> sp.	4.0-8.0
<i>Acromonium sclerotigenum</i>	4.0-8.0
<i>Aspergillus flavus</i> CBS 3005	4.0-8.0
<i>A. flavus</i> BB 67	4.0-8.0
<i>A. flavus</i> Madagascar	4.0-8.0
<i>A. flavus</i> Prot Lamy	4.0-8.0
<i>A. niger</i>	4.0-8.0
<i>A. versicolor</i>	4.0-8.0
<i>Mucor mucedo</i>	4.0-8.0
<i>Penicillium digitatum</i>	4.0-8.0
<i>P. expansum</i>	4.0-8.0
<i>P. notatum</i> 4640	4.0-8.0
<i>P. nigricans</i>	4.0-8.0
<i>P. viridicatum</i> Westling	4.0-8.0
<i>Scopulariopsis asperula</i>	4.0-8.0
<i>Aspergillus oryzae</i>	10
<i>Fusarium</i> sp.	10
<i>Geotrichum candidum</i>	10
<i>Penicillium roqueforti</i> var. <i>punctatum</i> 6018	10
<i>Rhizopus oryzae</i> 4758	10
<i>P. discolor</i> 547.95	>40
<i>P. discolor</i> 549.95	>40
<i>P. discolor</i> 551.95	>40

<sup>a</sup>Concentración mínima inhibitoria (definida como el no crecimiento después de cinco días a 25°C; inoculando 10<sup>4</sup> esporas en el centro de la caja con agar).

Cuadro 7. Sensibilidad de levaduras a la natamicina (adaptado de Davidson y col., 2005).

Especie	CMI <sup>a</sup> (µg/mL)
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	1.0-2.5
<i>Candida albicans</i>	1.0-2.5
<i>C. krusei</i> H66	1.0-2.5
<i>C. pseudotropicalis</i> H3	1.0-2.5
<i>C. valida</i> H74	1.0-2.5
<i>C. vini</i>	1.0-2.5
<i>Debaryomyces hansenii</i> H42	1.0-2.5
<i>Dekkera bruxellensis</i> CBS2796	1.0-2.5
<i>D. bruxellensis</i> CBS4459	1.0-2.5
<i>D. bruxellensis</i> CBS6055	1.0-2.5
<i>Hanseniasporun uvarum</i> CBS5074	1.0-2.5
<i>Hansenula polymorpha</i>	1.0-2.5
<i>Pichia membranaefaciens</i> H67	1.0-2.5
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> CBS8161	1.0-2.5
<i>Saccharomyces (Zygosaccharomyces) bailii</i>	1.0-2.5
<i>S. bayanus</i>	1.0-2.5
<i>S. bayanus</i> I018-2007	1.0-2.5
<i>S. carlsbergensis</i> CRA6413	1.0-2.5
<i>S. cerevisiae</i> ATCC9763	1.0-2.5
<i>S. cerevisiae</i> CRA124	1.0-2.5
<i>S. cerevisiae</i> H78	1.0-2.5
<i>S. cerevisiae</i> 8021	1.0-2.5
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>	1.0-2.5
<i>S. exiguus</i>	1.0-2.5
<i>S. ludwigii</i> 0339	1.0-2.5
<i>Torulopsis candida</i>	1.0-2.5
<i>Z. bailii</i> CRA229	1.0-2.5
<i>Z. rouxii</i> CBS 1640	1.0-2.5
<i>S. exiguus</i> Rees CBS1514	3.0-10.0
<i>S. florentinus</i> H79	3.0-10.0
<i>S. unisporus</i> H104	3.0-10.0
<i>S. (Zygosaccharomyces) rouxii</i> 0562	3.0-10.0
<i>S. sake</i> 0305	3.0-10.0
<i>Torulopsis lactis-condensi</i>	3.0-10.0
<i>Torulaspota rosei</i>	3.0-10.0
<i>Zygosaccharamyces barkerii</i>	3.0-10.0

<sup>a</sup>Concentración mínima inhibitoria (definida como la inhibición de crecimiento por 14 días a 25°C; inoculando un nivel de 10<sup>3</sup> ufc/mL).

#### II.3.3.4 Estado regulatorio

El uso de la natamicina es permitido en muchos países como un aditivo alimentario en una variedad de alimentos para el control del crecimiento de hongos y levaduras; por ejemplo en la Unión Europea, la natamicina es utilizada para tratamientos superficiales de quesos duros, semiduros y en salchichas curadas. En Estados Unidos, puede ser aplicada sobre quesos en cantidades no mayores de 20 mg/kg de producto terminado. En Australia se aplica superficialmente en quesos en una concentración de 15 mg/kg. En países como Costa Rica y algunos países Árabes está permitido como un aditivo general; mientras que en México y Chile se utiliza en tratamientos superficiales en quesos a concentraciones de 2 mg/dm<sup>2</sup> de superficie pero ausente a la profundidad de 5 mm. Estos usos con cubiertos por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS) (Roller, 2003).

#### II.4.1 La selección de agentes o técnicas antimicrobianas

Ningún agente o técnica antimicrobiana es la mejor para todas las aplicaciones prácticas. Así que en la elección se busca la mejor opción para aplicar diferentes antimicrobianos naturales sobre la superficie de queso fresco, conlleva un estudio elaborado y detallado de las propiedades de los antimicrobianos naturales sobre la superficie de alimentos frescos listos para el consumo, la cual nos proporcione mejores condiciones de calidad final del producto.

#### II.5.1 *Staphylococcus aureus*

Organismo aerobio Gram (+), no esporulado, sin movilidad, catalasa positivo, relativamente resistente a un potencial de agua reducido y tolera bastante bien la sequía y la salinidad. Además de crecer en medio con altas concentraciones de sal, es un parásito habitual de los humanos y otros animales, se recupera escasamente del contenido intestinal se aísla con frecuencia de la piel y varias mucosas del hombre y animales (Doyle y col., 2005).

La mucosa nasal es la localidad que más comúnmente lo alberga. Ante cuadros infecciosos como faringitis, sinusitis o gripe, las tasas de portadores se incrementan. Otro sitio de interés es la piel, donde puede permanecer sin causar daño al huésped o provocando lesiones de variada intensidad, las cuales pueden ser transitorias. Produce varias enterotoxinas que secreta al medio circundante o al alimento; si se ingiere el alimento que contiene la toxina, en el plazo de 1-6 horas se observan severas reacciones que incluyen náuseas, vómito y diarrea. Se han identificado seis tipos de toxinas de *S. aureus* (A, B, C1, C2, D y E). La toxina A es la que más frecuentemente está asociada a los brotes de intoxicación alimentaria estafilocócica, la intoxicación puede aparecer tras la ingestión de un alimento libre de estafilococos viables, y se han registrado varios casos en Estados Unidos (Cuadro 8) (Lemus y col., 2007).

Entre los años 1993 y 2000, en Latinoamérica ocurrieron 121 brotes por intoxicación estafilocócica con 6433 afectados y dos muertes. De estos brotes 48 correspondieron a Venezuela, de los cuales en 40 el queso fue el alimento involucrado (Díaz y González, 2001).

En México en el periodo de 1980 a 1989 se confirmaron 58 brotes de los 79 estudiados, en esos el principal microorganismo implicado fue *S. aureus*, que provocó el 48.2% de los incidentes. De este total los alimentos involucrados fueron: quesos 29.3%, pasteles 15.5%, carne cocinada 15.1%, leche 13.8%, pescados y mariscos 7.0%. Cabe hacer notar que los brotes se confirmaron representan sólo una mínima parte de los que ocurren en el país sin embargo, esta información nos da una idea de los alimentos que pueden estar involucrados en intoxicaciones alimentarias producidas por este microorganismo (Parrilla y col., 1993).

Este microorganismo ha causado intoxicaciones por consumo de carne de aves de corral, pescado, huevo, papas, productos lácteos, (leche, mantequilla y queso), productos horneados e incluso hongos enlatados (Snayder y Poland, 2000).

Existen diversos reportes sobre los microorganismos transmitidos por brotes involucrando al queso (Cuadro 9) y principales agentes etiológicos involucrados en brotes en diversos países de Europa (Cuadro 10).

Cuadro 8. Brotes de gastroenteritis producidos por enterotoxinas estafilocócicas y casos en los Estados Unidos, 1973-1987 (adaptado de Lund y col., 2000).

Años	Brotes	Casos	Porcentaje de todos los casos
1973-1987	367	17248	14.0
1983	14	1257	15.9
1984	11	1153	14.1
1985	14	421	1.8
1986	7	250	4.3
1987	1	100	1.0

Cuadro 9. Principales agentes etiológicos reportados en brotes en diversos países de Europa, 1990-1992 (adaptado de Lund y col., 2000).

Agente etiológico	Número de brotes	Porcentaje
<i>Salmonella</i> spp.	9882	84.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	409	3.5
<i>Clostridium perfringens</i>	356	3.0
<i>Trichinella</i>	181	1.5
Hongos	152	1.3
<i>C. botulinum</i>	123	1.1
<i>Bacillus cereus</i>	113	1.0
<i>Campylobacter</i> spp.	85	0.7
<i>Shigella</i> spp.	64	0.5
<i>Escherichia coli</i>	33	0.3
Otros	301	2.6

Cuadro 10. Microorganismos transmitidos por el consumo de quesos (adaptado de Ramírez y col., 2002).

Tipo de Riesgo		
Alto	Medio	Bajo
<i>Salmonella</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Clostridium botulinum</i>
<i>E. coli</i>	<i>B. abortus</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
	<i>M. tuberculosis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
	<i>C. burnetti</i>	
	<i>Vibrio</i>	
	<i>A. hydrophila</i>	

### II.6.1 Material de empaque comestible y biodegradable

Los empaques biodegradables, retrasan el deterioro de los productos, aumenta la vida de anaquel y calidad del alimento. Cualquier reemplazo de empaques a empaques biodegradables reduce el uso de recursos no renovables. Estos empaques no son un reemplazo total de el empaque convencional sintético, si no que sirve como una barrera más de protección. Los empaques comestibles forman parte de las barreras de protección, debido a las propiedades que le brinda al alimento, controlan el transporte de humedad, oxígeno, aroma, aceites y sabores del sistema alimenticio (Aristippos, 2002).

Entre los materiales disponibles para los empaques comestibles y biodegradables se encuentran los lípidos, polisacáridos y proteínas. Dentro de las proteínas, las más utilizadas en alimentos son las solubles en agua (Cuadro 11).

Cuadro 11. Proteínas utilizadas en empaques comestibles y biodegradables (adaptado Aristippos, 2002).

Proteína	Solventes			
	Agua	Alcalino	Ácido	Etanol
Colágeno		X		
Gelatina	X			
Proteína de pescado		X	X	
Queratina				X
Proteína de clara de huevo			X	
Caseína	X			
Proteína de suero	X			
Proteína de maíz				X
Proteína de gluten de trigo		X	X	X
Proteína de salvado de arroz		X	X	
Proteína de soya	X		X	
Proteína de cacahuete			X	
Proteína de semilla de algodón			X	

Durante la distribución de alimentos perecederos, existen factores que deterioran su calidad, estos pueden ser causas físicas, químicas y biológicas. La búsqueda de mejorar los sistemas de se debe a la tendencia de consumir productos mínimamente procesados, de fácil preparación y adicionados de conservadores naturales. Los empaques activos protegen los alimentos de factores físicos, químicos y de la degradación biológica, por un mayor tiempo comparado con un empaque tradicional, llamados así por la adición de:

- ✚ Antioxidantes
- ✚ Agentes antimicrobianos
- ✚ Colorantes
- ✚ Saborizantes
- ✚ Nutrientes (Vitaminas y minerales).

El empaque activo cuenta con barreras múltiples, las cuales funcionan a favor del alimento, aumentando su calidad (Han, 2000).

#### II.7.1 Propiedades de la proteína de suero

El suero es una fuente confiable de un número de proteínas, hidratos de carbono y minerales de alta calidad y biológicamente activos. La industria de los alimentos continuamente está buscando ofrecer productos innovadores para satisfacer la necesidad del consumidor. Los aspectos nutrimentales y de salud de los alimentos han impulsado muchas de las investigaciones sobre los efectos saludables del suero y sus fracciones. Las proteínas de suero se digieren fácilmente y contiene un perfil de aminoácidos que satisfacen o sobrepasan los requerimientos de aminoácidos esenciales especificados por la Organización para la Agricultura y Alimentación/Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS). Reconocida como fuente de proteína de alta calidad. Existen cada vez más evidencias de que el suero contiene una variedad de factores y compuestos capaces de mejorar la salud y prevenir enfermedades (Walzem, 2001).

La proteína de suero puede ser aplicada como material de empaque comestible para el uso dentro de los alimentos. Se han evaluado películas a base de polímeros, hidratos de carbono, proteínas y lípidos, los cuales tienen la propiedad de formar películas delgadas, flexibles y transparentes, similares a las películas formadas de polímeros sintéticos. Los recubrimientos comestibles brindan un gran potencial para extender la vida de anaquel de los alimentos (Lin y Krochta, 2003).

### III. HIPÓTESIS

La incorporación de los agentes antimicrobianos naturales  $\epsilon$ -polilisina-L y natamicina, en material de empaque biodegradable y comestible, a base de aislado de proteína de suero, incrementa la calidad e inocuidad de queso fresco.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1 General

- ✚ Evaluar el espectro de actividad de dos agentes antimicrobianos naturales,  $\epsilon$ -polilisina-L y natamicina, incorporarlos en una mezcla filmogénica a base de proteína de suero y usarlos como recubrimientos activos en queso frescos.

### IV. 2 Específicos

- ✚ Evaluar el espectro antimicrobiano de  $\epsilon$ -polilisina-L
- ✚ Evaluar el efecto combinado de los antimicrobianos naturales  $\epsilon$ -polilisina-L y natamicina.
- ✚ Incorporar la mezcla de dos agentes antimicrobianos naturales  $\epsilon$ -polilisina-L y natamicina, sobre recubrimientos a base de proteína de suero y evaluar su actividad antimicrobiana contra bacterias Gram (+) y Gram (-).
- ✚ Evaluar el efecto inhibitorio del recubrimiento adicionado con el agente antimicrobiano aplicado a un alimento fresco (queso panela), inoculado superficialmente con *S. aureus*.

## V. METODOLOGÍA

### V.1 Materiales

#### V.1.1 Cepas

Proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química.

#### V.1.2 Antimicrobianos

- ✚ ε-Polilisina-L (Proporcionado por Handary Bio-Engineering B.V.).
- ✚ Nicon-LQ\*® (Proporcionado por Comercializadora Argarza S. A. de C. V.).
- ✚ Natamicina (Proporcionado por Handary Bio-Engineering B.V.).

#### V.1.3 Soluciones y medios de cultivo

##### V.1.3.1 Diluyente de peptona al 0.1%

Formulación: 0.1 g de peptona bacteriológica por cada 100 mL, distribuir en frascos de vidrio y esterilizar en autoclave

##### V.1.3.2 Tween 20 al 50%

Mezclar Tween 20 y agua destilada en partes iguales 1:1, esterilizar en autoclave.

##### V.1.3.3 Agar MRS al 1%

Para 100 mL, disolver 5.5 g de caldo MRS, 1 g de agar bacteriológico (Bioxon) en 100 mL de agua destilada, calentar y mezclar hasta disolver, ajustar el pH del medio a  $6.5 \pm 0.2$ , distribuir en tubos de ensayo y esterilizar en autoclave.

##### V.1.3.4 Agar Assay al 1%

Para 100 mL, disolver: 1 g de peptona bacteriológica, 0.3 g de extracto de carne, 0.3 g de cloruro de sodio, 0.15 g de extracto de levadura, 0.1 g de azúcar moscabada y 1 g de agar bacteriológico. En 100 mL de agua destilada, calentar y mezclar hasta disolver, ajustar pH final a  $7.5 \pm 0.2$ , distribuir en tubos de ensayo y esterilizar en autoclave.

#### V.1.3.5 Agar infusión cerebro corazón (BHI) al 1%

Para 100 mL, disolver 3.7 g de agar BHI (Bioxon) más 1 g de agar bacteriológico (Bioxon) en 100 mL de agua destilada, distribuir en tubos de ensayo y esterilizar en autoclave.

#### V.1.3.6 Agar papa dextrosa agar (PDA) 1%

Para 100 mL, disolver 3.7 g de agar PDA (Bioxon) en 100 mL de agua destilada, distribuir en tubos de ensayo y esterilizar en autoclave.

#### V.1.3.7 Medio de Levaduras (YPD)

En porcentaje realizar una solución con: Extracto de levadura 1%, peptona 2%, dextrosa 2%, agua destilada 95% ajustar el pH  $5.5 \pm 0.2$  y posteriormente esterilizar. Se le adiciona ácido láctico al 10% v/v (1 mL de ácido láctico por cada 100 mL de medio, esto garantiza que el pH del medio disminuya hasta 3.5), evita obscurecimiento del medio y promueve crecimiento óptimo.

#### V.1.3.8 Medio de Levaduras (NYDA)

En porcentaje realizar una solución con: extracto de levadura 0.5%, glucosa 1%, agar 1.5%, caldo nutritivo 1% y agua destilada al 96%. Distribuir en tubos de ensayo y esterilizar en autoclave.

#### V.1.3.9 Medio Baird-Parker

Ingredientes: medio base 95 mL, solución de telurito de potasio 1 mL, emulsión de yema de huevo 5 mL (Anexo 1). Cuando el medio base esté a 45 °C, agregar los demás ingredientes y mezclar. Colocar de 15 a 20 mL del medio completo, enfriar y dejar solidificar. Las placas pueden almacenarse por 48 horas a temperatura de 0 a 5 °C.

## V.2 Métodos

### V.2.1 Activación de cepas microbianas

A partir de cultivos en chaquiras de los diferentes microorganismos tanto bacterias Gram (+), Gram (-) y levaduras, conservados a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se colocaron las chaquiras en tubos con 3 mL de caldo estéril específico para cada tipo, incubándose posteriormente a la temperatura y el tiempo óptimo según correspondiera.

En el caso de la activación de los hongos esto se realizó de diferente forma en una caja petri con agar PDA (papa dextrosa agar), se sembró por punción con un asa estéril obteniéndose el hongo de una conserva en sílica. Se incubó y se le dió el tiempo de crecimiento adecuado (Cuadro 12).

### V.2.2 Método de recuento bacteriano Miles-Misra (Método de la gota).

Se preparó una serie de diluciones del microorganismo, método: pipetear 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión bacteriana en un microtubo con 900  $\mu\text{L}$  de agua peptonada al 0.1%. Se homogenizó en el vórtex, de este tubo se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se vertieron a otro tubo con 900  $\mu\text{L}$  de diluyente de peptona, se homogenizó, y se repitió el procedimiento hasta obtener las diluciones deseadas (Vanderzant y Splittstoesser, 1992).

Se prepararon placas de agar (agar soya tripticaseína, agar assay ó agar BHI) al 1%. Se rotularon las cajas señalando las diluciones, se colocaron tres gotas de 20  $\mu\text{L}$  de dilución correspondiente sobre el agar sólido y se dejaron secar a temperatura ambiente (Figura 3), según el microorganismo, se determinó tiempo y temperatura correspondiente para su incubación (Cuadro 12).

### V.2.3 Método de difusión en agar

Se dispuso de tubos de agar ya fundido según correspondiera de 10 mL cada uno, se colocan 200  $\mu\text{L}$  de Tween 20 (polietilén glicol sorbitán monolaurato), al 50% v/v a cada tubo. Se temperó el medio ( $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de la respectiva

dilución del microorganismo, el contenido de los tubos se vació en una caja petri y se dejó solidificar (Figura 4). Una vez que el medio se encontró firme, con un horador del número dos (5 mm), se hicieron pozos en el medio, indicando cada antimicrobiano, se agregaron dentro de los pozos 20 µL del antimicrobiano y se dejaron secar en la campana de flujo laminar, posteriormente se incubaron a la temperatura y el tiempo estimado para cada microorganismo, trascurrido el tiempo se observó el crecimiento, y se midió el halo de inhibición (Bhunja y col., 1988).

Cuadro 12. Medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación para cada uno de los microorganismos a utilizar.

Microorganismo	Medio de cultivo	Temperatura de incubación	Tiempo de incubación
<i>Lactobacillus plantarum</i> 9L	MRS	30 °C	24 horas
<i>Lactobacillus plantarum</i> 18L	MRS	30 °C	24 horas
<i>Lactobacillus plantarum</i> 35L	MRS	30 °C	24 horas
<i>Staphylococcus aureus</i> 8443	BHI	37 °C	24 horas
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	BHI	37 °C	24 horas
<i>Salmonella</i> spp	BHI	30 °C	24 horas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BHI	30 °C	24 horas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PDA	30 °C	24 horas
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	PDA	30 °C	24 horas
<i>Torulaspota</i> spp.	PDA	28 °C	24 horas
<i>Pichia membranifaciens</i>	PDA	28 °C	24 horas
<i>Saccharomyces boulardii</i>	PDA	28 °C	24 horas
<i>Micrococcus luteus</i> NCIB8166	ASSAY	30 °C	48 horas
<i>Aspergillus niger</i> ATCC9642	PDA	30 °C	5 días
<i>Penicillium funiculosum</i> ATCC11797	PDA	30 °C	5 días
<i>Trichoderma virens</i> ATCC9645	PDA	30 °C	5 días

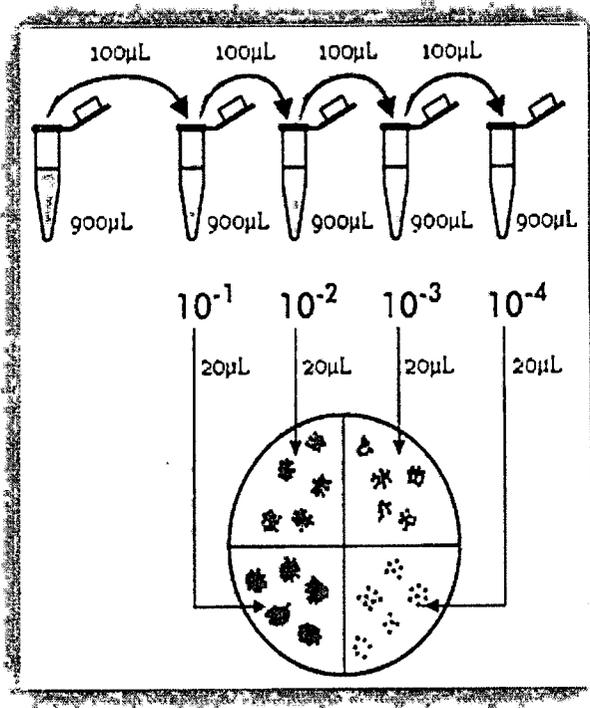


Figura 3. Método de recuento bacteriano Miles-Misra.

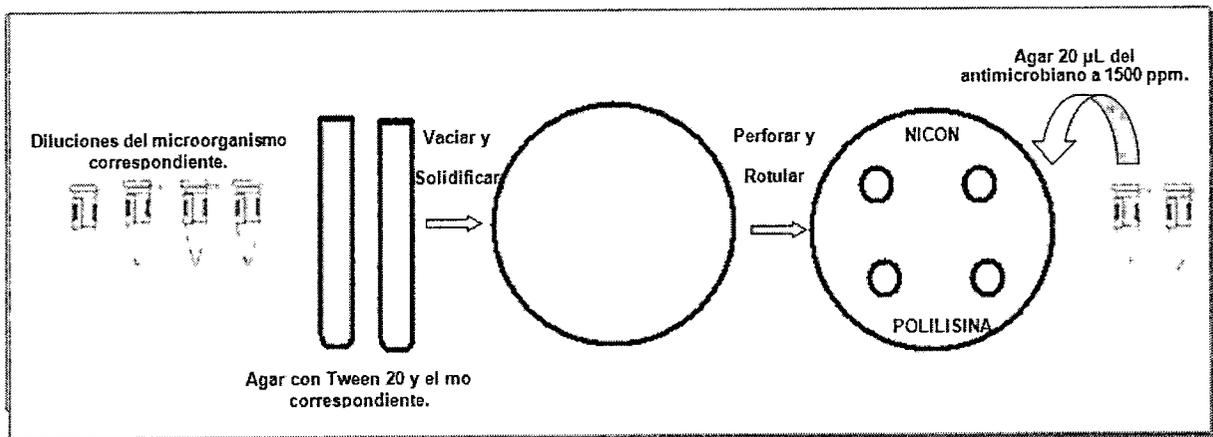


Figura 4. Esquema del método de difusión en agar.

#### V.2.4 Cinéticas de crecimiento

La cinética de crecimiento de un microorganismo constituye una de las operaciones más utilizadas por la Industria Alimentaria y la Biotecnología. La gráfica de cinética de crecimiento se compone de cuatro fases: latencia, logarítmica, estacionaria y muerte. Para estudiar la cinética de crecimiento de diferentes microorganismos se realiza el siguiente procedimiento:

Se colocaron cuatro matraces cada uno con caldo 50 mL de caldo (según correspondiera dependiendo del microorganismo), a éstos se le adicionaron diferentes concentraciones de  $\epsilon$ -polilisina-L (o el antimicrobiano evaluado), las concentraciones adicionadas fueron: un control, una concentración mínima, la máxima permitida así como un punto intermedio; se adicionó el inóculo al 0.1% v/v a cada uno de los matraces.

Se incubó a la temperatura y tiempo de crecimiento de cada microorganismo (Cuadro 12), transcurrido el tiempo se homogenizó la muestra, se colocó en microtubos para realizar pruebas de recuento, las cuales se realizaron por el método de Miles-Misra, utilizando diferentes diluciones, la toma de la muestra se realizó cada cuatro horas. Después de inocular las cajas con las cuales contenían agar correspondiente, se incubaron por 24 horas, se realizó el conteo de microorganismos (Cuadro 13), de igual forma una gráfica de la cinética de crecimiento.

Cuadro 13. Asignación intervalos de tiempo para las muestras  $\epsilon$ -polilisina-L y natamicina.

Tiempos (t)	Tiempo de incubación (h)
T0	Control
T1	4
T2	8
T3	12
T4	16
T5	24

#### V.2.5 Preparación del material de empaque biodegradable como recubrimiento

Para la preparación de las películas se utilizó aislado de proteína de suero (APS), se disolvió en agua estéril 5% p/v disolviéndolo completamente por agitación. Se ajustó el pH a 7.5 con NaOH, y posteriormente se calentó a 80 °C por 30 minutos en un baño María. Durante los últimos 5 minutos de calentamiento se adicionó la cera de abeja 1.4% p/v. Se transfirió a un frasco el cual contenía Tween 20 al 1% v/v, como plastificante. En seguida se homogenizó por 2 minutos con un homogenizador ultra-turrax a 21500 rpm, se dejó reposar durante 1 minuto y se repitió el homogenizado 1 minuto más, se colocó sobre un baño de hielo por 15 minutos, donde se le adicionó el antimicrobiano 0.5% p/v. La solución se desgasificó por 20 minutos antes de verter sobre placa de vidrio para formar películas.

#### V.2.6 Inoculación del alimento modelo (queso panela) con *S. aureus*

Con el fin de recuperar una población aproximada de  $10^7$  ufc/mL, se realizaron una serie de pruebas preliminares, en las cuales se inocularon diferentes volúmenes de la suspensión de *S. aureus* en trozos de queso. En base a lo anterior, se aplicaron 500 µL de suspensión sobre cada pieza del alimento (queso panela, 15 gramos con 7 cm de largo y 3 cm de ancho), por extensión con ayuda de una varilla de vidrio, en la campana de flujo laminar, se dejó secar, terminado este tiempo las muestras se refrigeró a 4 °C, empacada bajo diferentes condiciones.

#### V.2.7 Determinación de la actividad antimicrobiana del recubrimiento activo

Se evaluó el efecto antimicrobiano del empaque el cual fue aplicado en diferentes tratamientos para un total de cuatro (Figura 5), para determinar la actividad contra *S. aureus*. El queso fue monitoreado durante 30 días (vida de anaquel), con muestreos periódicos cada 7 días. Además se evaluó el efecto inhibitorio del recubrimiento activo hacia *S. aureus*.

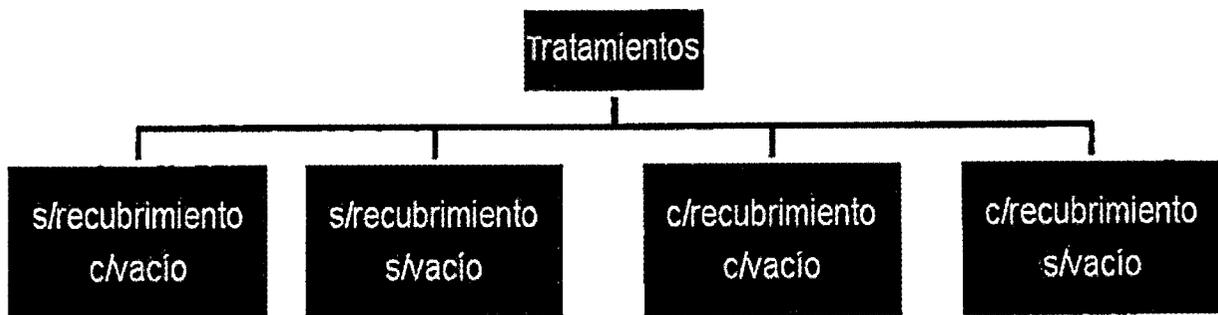


Figura 5. Diferentes tratamientos aplicados en superficie de queso fresco.

V.2.8 Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

Con un hisopo se frotó la pieza de queso panela, por ambas partes y se colocó en un tubo que con 9 mL de diluyente, de aquí se realizó diluciones decimales hasta obtener una suspensión completa y homogénea. El número de diluciones efectuadas dependió del tiempo transcurrido de la vida de anaquel (NOM-110-SSA1-1994).

#### V.2.9 Determinación de *S. aureus* en queso panela

Se depositó 0.1 mL de la dilución de la muestra elegida para el análisis; sobre la superficie de las placas de agar Baird-Parker. Se distribuyó el inóculo sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, utilizando una varilla para cada dilución. Se incubaron de 45 a 48 h a 35 °C de las cuales se seleccionaron las placas que mostraron entre 15 y 150 colonias típicas de *S. aureus*. Las colonias típicas son negras, circulares, brillante, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2 mm y muestran una zona opaca y un halo claro alrededor de la colonia (NOM-115-SSA1-1994).

## VI. RESULTADOS

### VI.1 Evaluación del espectro antimicrobiano de $\epsilon$ -polilisina-L

Existen diferentes características que componen un alimento, brindando a cada uno de ellos interacciones propias, es por ello que se adicionan antimicrobianos que en base a sus propiedades, conserven por periodos mucho más largos el alimento, dando con esto una vida de anaquel mucho más prolongada y una carga microbiana reducida.

Se analizó la hoja técnica (Handary, 2004), de  $\epsilon$ -polilisina-L, para seleccionar diferentes microorganismos tanto Gram (+), Gram (-), hongos y levaduras que estuvieran disponibles en el cepario del Laboratorio de Biotecnología. La actividad antimicrobiana en este espectro se comparó contra la de otro antimicrobiano natural, nicon-LQ\*<sup>®</sup> (Argarza, 2004), utilizado ya industrialmente.

Se seleccionó una concentración de 1500 ppm, la cual fue elegida después de observar el efecto mostrado con diferentes concentraciones. En estudios preliminares se evaluaron concentraciones de 500 ppm, 700 ppm, 900 ppm, 1200 ppm y 1500 ppm, en donde a la concentración de 1500 ppm el microorganismo utilizado, *M. luteus* NCIB8166, mostraba sensibilidad la cual se determinó por el halo de inhibición formado, expresado en milímetros (Cuadro 14). La técnica utilizada para esta evaluación fue difusión en agar (Bhunja y col., 1988).

Dentro de los microorganismos seleccionados para la evaluación de los dos agentes antimicrobianos se encuentran Gram (+): *L. plantarum* 9L, *L. plantarum* 18L, *L. plantarum* 35L, *M. Luteus* NCIB8166, *S. aureus* 8443; Gram (-): *E. coli* O157:H7, *Salmoella spp.*, *P. aeruginosa*; Hongos: *A. niger* ATCC9642, *P. funiculosum* ATCC9645, *T. virens* ATCC9645 y Levaduras: *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *P. membranifaciens*, *S. boulardii*.

Cuadro 14. Cantidades de  $\epsilon$ -polilisina-L para determinar la concentración a utilizar, usando como microorganismo indicador *M. luteus* NCIB8166 mediante la técnica de difusión en agar.

Concentración de $\epsilon$ -polilisina-L (ppm)	Halo de inhibición (mm)
500	SE <sup>a</sup>
700	SE <sup>a</sup>
900	SE <sup>a</sup>
1200	SE <sup>a</sup>
1500	(2.5 $\pm$ 0.92)

<sup>a</sup>SE: Sin efecto observado

El agente antimicrobiano  $\epsilon$ -polilisina-L no presentó ningún efecto en el caso de los microorganismos Gram (+), caso contrario al observado con el nicon-LQ\*<sup>®</sup>, para *L. plantarum* 9L (9.23 mm  $\pm$  2.26), *L. plantarum* 18L (9.23 mm  $\pm$  0.92), *L. plantarum* 35L (6.63 mm  $\pm$  0.42), *M. Luteus* NCIB8166 (25 mm  $\pm$  1.41), *S. aureus* 8443 (8.68 mm  $\pm$  0.30).

En el caso de los microorganismos Gram (-) ni nicon-LQ\*<sup>®</sup> ni  $\epsilon$ -polilisina-L mostraron efecto alguno contra *E. coli* O157:H7 y *Salmoellella spp.*, excepto con *P. aeruginosa* contra nicon-LQ\*<sup>®</sup>, se observa efecto el cual fue de 6.0  $\pm$  0.80 mm.

El efecto del antimicrobiano nicon-LQ\*<sup>®</sup>, frente a levaduras mostró efecto antagónico para *S. cerevisiae* (10.95 mm  $\pm$  0.22), *S. carlsbergensis* (10 mm  $\pm$  0.05), *P. membranifaciens* (12.48 mm  $\pm$  0.65), *S. boulardii* (15.98 mm  $\pm$  .170), *Torulasporea spp* (6.75 mm  $\pm$  0.95). Se observó un efecto mayor con  $\epsilon$ -polilisina-L donde los halos de inhibición fueron mayores: *S. cerevisiae* (28.5 mm  $\pm$  0.19), *S. carlsbergensis* (32.5 mm  $\pm$  0.34), *P. membranifaciens* (23.35 mm  $\pm$  2.67), *S. boulardii* (24.7 mm  $\pm$  0.98), *Torulasporea spp* (16.75 mm  $\pm$  0.50).

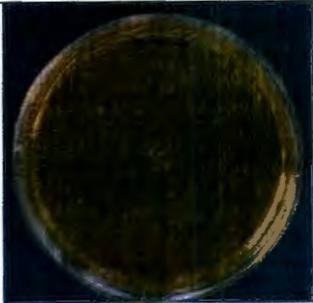
En los hongos el antimicrobiano nicon-LQ\*<sup>®</sup> mostró efecto inhibitorio para *A. niger* ATCC9642 (12.38 mm  $\pm$  0.40), *P. funiculosum* ATCC9645 (12 mm  $\pm$  0.37), *T. virens* ATCC9645 (6.15 mm  $\pm$  0.26). El efecto es mayor si hablamos del agente  $\epsilon$ -polilisina-L donde los halos de inhibición fueron: *A. niger* ATCC9642 (32 mm  $\pm$  0.43), *P. funiculosum* ATCC9645 (30 mm  $\pm$  0.16), *T. virens* ATCC9645 (9.28 mm  $\pm$  0.53).

En resumen, el antimicrobiano  $\epsilon$ -polilisina-L no presentó efecto inhibitorio sobre microorganismos Gram (+) ni Gram (-). En el Cuadro 15, se observa el diámetro en milímetros que se obtuvo para los diferentes microorganismos analizados, el cual pudo ser influenciado por diferentes factores como: la sensibilidad mostrada por la cepa, el tipo de microorganismo y la técnica utilizada. En la fosa superior se observa el efecto de  $\epsilon$ -polilisina-L y en la inferior el del nicon-LQ\*<sup>®</sup> o viceversa según el caso.

De acuerdo a los resultados, el efecto mostrado por  $\epsilon$ -polilisina-L tanto para hongos como para levaduras utilizados en esta prueba es de dos a tres veces mayor que el mostrado por el nicon-LQ\*<sup>®</sup>, excepto para *T. virens*, donde el efecto es 50% mayor únicamente.

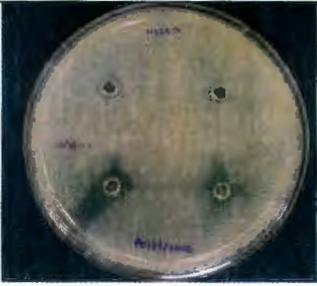
VI.2 Cinética de crecimiento de *P. aeruginosa* usando  $\epsilon$ -polilisina-L y nicon-LQ\*<sup>®</sup>  
En la hoja técnica de  $\epsilon$ -polilisina-L, se menciona un amplio espectro de inhibición frente a microorganismos Gram (-), Gram (+), hongos y levaduras, haciendo énfasis en el efecto sobre microorganismos Gram (-). Es por ello que se seleccionó un microorganismo Gram (-) *P. aeruginosa* para evaluarlo en medio líquido por ser esta una técnica que nos permite una interacción más directa entre el microorganismo y el antimicrobiano.

Cuadro 15. Efecto mostrado por microorganismos Gram (+), Gram (-), hongos y levaduras frente a dos antimicrobianos naturales  $\epsilon$ -polilisina-L y nicon-LQ\*® en una concentración de 1500 ppm, mediante la técnica de difusión en agar.

Microorganismo	$\epsilon$ -polilisina-L 1500ppm (mm)	nicon-LQ*® 1500ppm (mm)	Difusión en Agar (Halo de inhibición)
<b>Microorganismos Gram positivo</b>			
<i>Lactobacillus plantarum</i> 9L	SE <sup>a</sup>	9.225 ± 2.26	
<i>Lactobacillus plantarum</i> 18L	SE <sup>a</sup>	9.225 ± 0.92	
<i>Lactobacillus plantarum</i> 35L	SE <sup>a</sup>	6.625 ± 0.42	

<p><i>Micrococcus luteus</i> NCIB8166</p>	<p>SE<sup>a</sup></p>	<p>25 ± 1.41</p>	
<p><i>Staphylococcus aureus</i> 8443</p>	<p>SE<sup>a</sup></p>	<p>8.675 ± 0.30</p>	
<p><b>Microorganismos Gram negativos</b></p>			
<p><i>Escherichia coli</i> O157:H7</p>	<p>SE<sup>a</sup></p>	<p>SE<sup>a</sup></p>	
<p><i>Salmonella</i> spp.</p>	<p>SE<sup>a</sup></p>	<p>SE<sup>a</sup></p>	

<i>Pseudomona aeruginosa</i>	SE <sup>a</sup>	6.0 ± 0.80	
<b>Levaduras</b>			
<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	28.5 ± 0.19	10.95 ± 0.22	
<i>Sacharomyces carlsbergensis</i>	32.5 ± 0.34	10 ± 0.05	
<i>Pichia membranifaciens</i>	23.35 ± 2.67	12.475 ± 0.65	

<i>Saccharomyces boulardii</i>	$24.7 \pm 0.98$	$15.975 \pm .170$	
<i>Torulaspota spp.</i>	$16.75 \pm 0.50$	$6.75 \pm 0.95$	
<b>Hongos</b>			
<i>Aspergillus niger</i> ATCC9642	$32 \pm 0.43$	$12.38 \pm 0.40$	
<i>Penicillium funiculosum</i> ATCC9645	$30 \pm 0.16$	$12 \pm 0.37$	
<i>Trichoderma virens</i> ATCC9645	$9.275 \pm 0.53$	$6.15 \pm 0.26$	

<sup>a</sup>SE: Sin efecto observado

Se realizó una cinética de crecimiento de *P. aeruginosa* usando los agentes antimicrobianos  $\epsilon$ -polilisisina-L y nicon-LQ\*<sup>®</sup>. Para determinar las concentraciones, nos apoyamos en la hoja técnica, donde se indicaba para *P. aeruginosa* a una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 3 ppm. Al consultar la norma número GRN 000135 donde el aditivo obtuvo su estatus GRAS (FDA, 2004), se reporta como dosis máxima permitida hasta 50 ppm. En base a esto, se establecieron tres concentraciones 3 ppm, 25 ppm y 50 ppm, y un control al cual no se le aplicó el antimicrobiano.

La cinética de crecimiento de *P. aeruginosa* usando diferentes concentraciones de nicon-LQ\*<sup>®</sup> se muestra en la Figura 6. El control presenta un crecimiento exponencial desde las primeras horas, hasta alcanzar una población máxima de  $10^9$  ufc/mL. En concentraciones de 3 ppm, 25 ppm y 50 ppm, se observa un efecto bactericida, en concentraciones de 25 ppm y 50 ppm se observa un empalme, presentando ambas un efecto inhibitorio desde las primeras horas.

La cinética de crecimiento de *P. aeruginosa* usando diferentes concentraciones de  $\epsilon$ -polilisisina-L se muestra en la Figura 7. El control presenta un crecimiento exponencial hasta alcanzar una población máxima de  $10^9$  ufc/mL, en concentraciones 25 ppm y 50 ppm el comportamiento es similar al control sin importar las diferentes concentraciones de  $\epsilon$ -polilisisina-L. En la concentración de 3 ppm se observa un ligero retraso en el crecimiento alcanzando la población máxima similar al control.

En la Figura 8 se observa al ser incubados la comparación del efecto antimicrobiano de los agentes nicon-LQ\*<sup>®</sup> y  $\epsilon$ -polilisisina-L, usando 3 ppm, la concentración mínima inhibitoria (MIC) de  $\epsilon$ -polilisisina-L, contra *P. aeruginosa*. Esto confirma que para las cepas utilizadas y condiciones de incubación tanto en medio sólido como medio líquido, no se observó efecto sobre bacterias Gram (-) por el agente antimicrobiano  $\epsilon$ -polilisisina-L.

### VI.3 Evaluación el efecto combinado de los antimicrobianos naturales $\epsilon$ -polilisina-L y natamicina

Para potenciar el efecto antimicrobiano de  $\epsilon$ -polilisina-L se seleccionó y combinó con natamicina, ambos agentes cuentan con la característica de ser naturales. Se realizó una cinética de crecimiento usando *P. membranifaciens* como microorganismos indicador para ambos antimicrobianos. El agente antimicrobiano  $\epsilon$ -polilisina-L mostró muy buen efecto contra está cepa, observado en pruebas anteriores (Cuadro 15), mientras que natamicina es efectiva contra hongos y levaduras (Davidson y col., 2005).

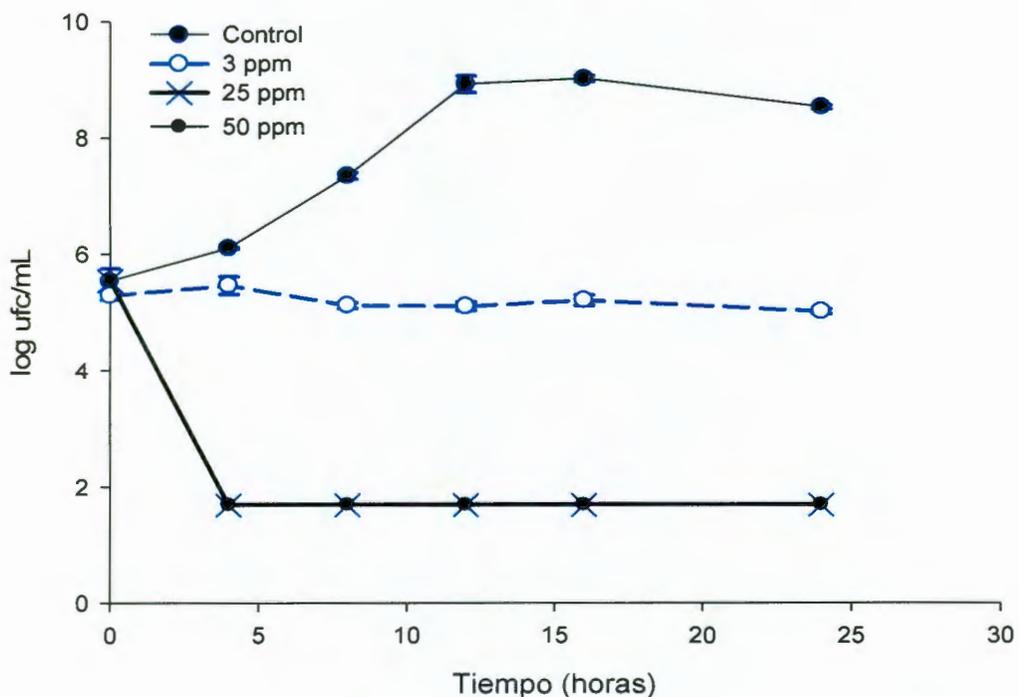


Figura 6. Cinética de crecimiento de *P. aeruginosa*, usando diferentes concentraciones de nicon-LQ\*®, en caldo infusión cerebro corazón (BHI), a una temperatura de 30 °C durante 24 horas.

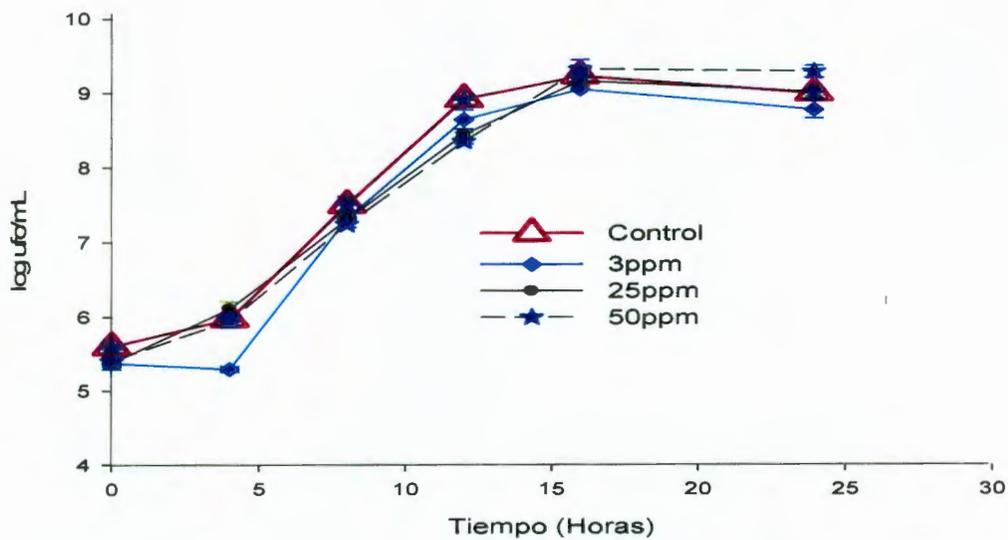


Figura 7. Cinética de crecimiento de *P. aeruginosa*, usando diferentes concentraciones de  $\epsilon$ -polilisina-L en caldo infusión cerebro corazón (BHI), a una temperatura de 30 °C durante 24 horas.

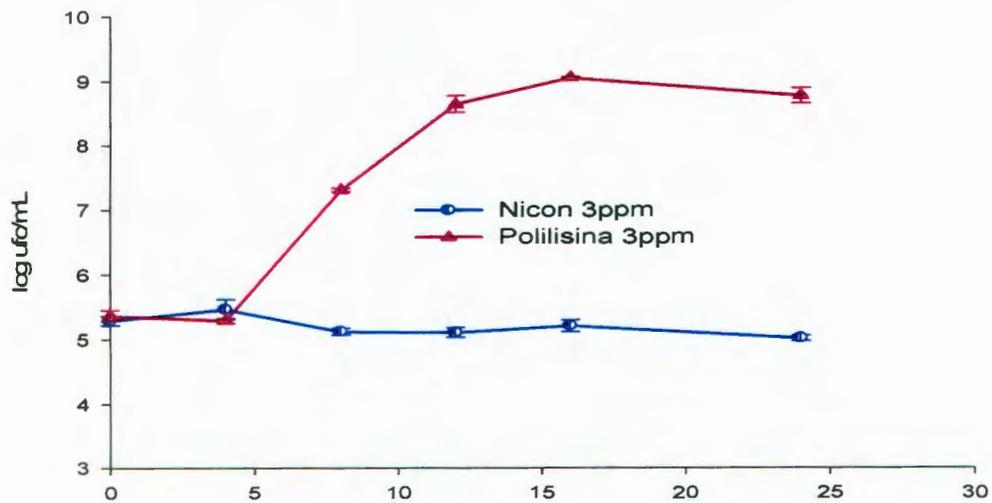


Figura 8. Cinética de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a nicon-LQ\*® y  $\epsilon$ -polilisina-L en una concentración de 3 ppm, en caldo infusión cerebro corazón (BHI), incubado a una temperatura de 30 °C durante 24 horas.

En la cinética de crecimiento de *P. membranifaciens* se utilizaron tres concentraciones de  $\epsilon$ -polilisina-L en base a: la cantidad máxima permitida por la norma 50 ppm (FDA, 2004), la cantidad mínima inhibitoria (MIC) obtenida de la hoja técnica 150 ppm la cual es mayor a la dosis máxima permitida, y una cantidad menor, que se seleccionó de 25 ppm. Los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 28 °C por un lapso de 24 horas.

Se observa en la Figura 9 que las tres concentraciones de  $\epsilon$ -polilisina-L, ejercen un efecto fungistático. A 25 ppm se presenta un crecimiento elevado a las ocho horas alcanzando una población de  $10^6$  ufc/mL, seguida de una reducción en la población de las 12 a las 16 horas, de aquí en adelante se adapta y alcanza su población máxima de  $10^9$  ufc/mL, a las 36 horas de incubación. En la concentración de 50 ppm se presenta un crecimiento hasta alcanzar una población de  $10^5$  ufc/mL, de aquí en adelante se observa una adaptación y comienza un crecimiento exponencial hasta alcanzar una población  $10^9$  ufc/mL a las 36 horas de incubación. En la concentración mas elevada 150 ppm se observa que se inhibe el crecimiento hasta las 16 horas, pero de ahí en adelante muestra un crecimiento exponencial hasta alcanzar su máxima población  $10^9$  ufc/mL a las 36 horas de incubación.

En la cinética de crecimiento de *P. membranifaciens* con diferentes concentraciones de natamicina (Figura 10), se usaron las mismas condiciones de incubación 28 °C y 24 horas, pero diferentes concentraciones 1 ppm, 3 ppm y 8 ppm ya que se apegó a la norma NOM-121-SSA-1994, la cual nos indica la adición de natamicina sobre superficie de 10 mg/kg, equivalente a 10 ppm.

En el efecto observado, en la cinética de *P. membranifaciens* con diferentes concentraciones de natamicina (Figura 10), dicho antimicrobiano es fungicida para las tres concentraciones utilizadas de natamicina 1 ppm, 3 ppm y 8 ppm. El control muestra un crecimiento exponencial hasta alcanzar su población máxima de  $10^9$  ufc/mL a las 24 horas. Tanto la concentración de 1 ppm como la de 3 ppm,

muestran un comportamiento similar inhibiendo el crecimiento desde las primeras horas, sin embargo la concentración de 8 ppm muestra un crecimiento exponencial alcanzando su población máxima  $10^3$  ufc/mL, a las cuatro horas y manteniéndose hasta concluir la incubación de 24 horas.

En base a los resultados descritos anteriormente se realizaron cuatro diferentes mezclas de  $\epsilon$ -polilisina-L con natamicina sin exceder los límites marcados por su norma para ambos antimicrobianos. La mezcla M1 (50 ppm  $\epsilon$ -polilisina-L y 5 ppm natamicina), M2 (50 ppm  $\epsilon$ -polilisina-L y 10 ppm natamicina), M3 (25 ppm  $\epsilon$ -polilisina-L y 3 ppm natamicina) y M4 (50 ppm  $\epsilon$ -polilisina-L y 3 ppm natamicina).

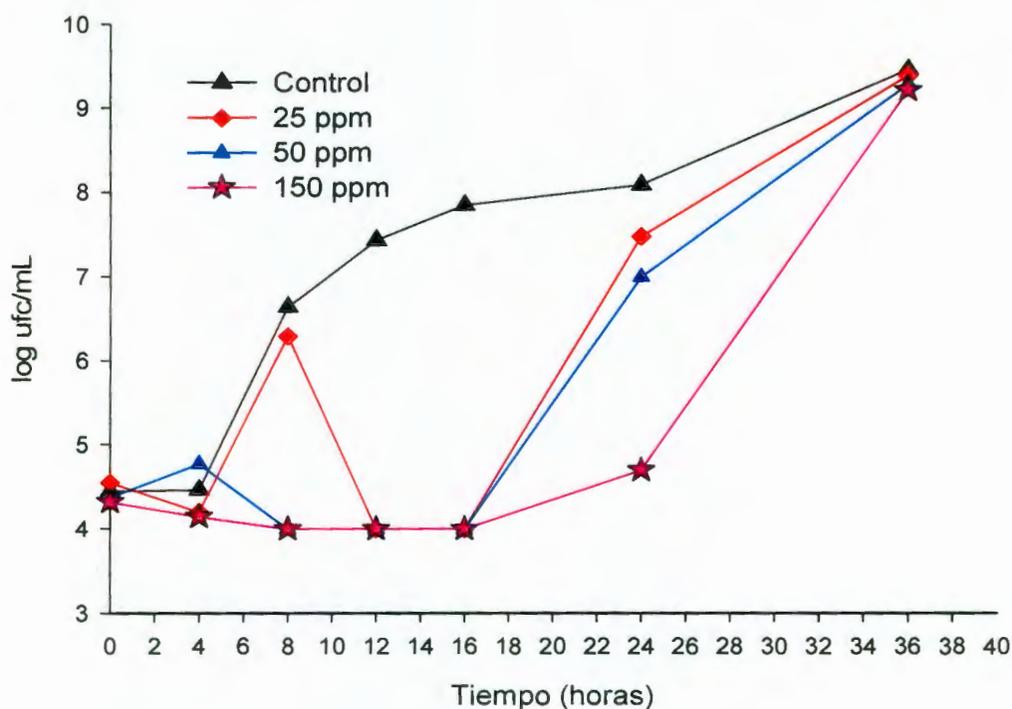


Figura 9. Cinética de crecimiento de *P. membranifaciens* con diferentes concentraciones de  $\epsilon$ -polilisina-L, en caldo NYDA, incubado a 28°C por 24 horas.

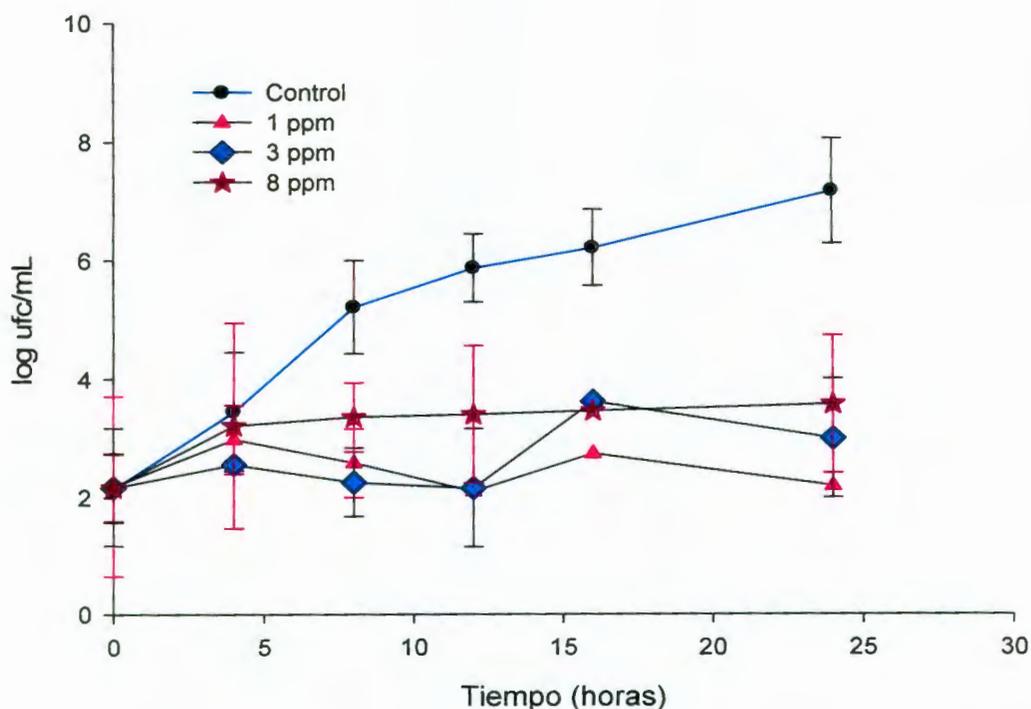


Figura 10. Cinética de crecimiento de *P. membranifaciens* con diferentes concentraciones de natamicina, en caldo NYDA, incubado a 28°C por 24 horas.

Se evaluó el efecto, mediante la técnica de difusión en agar, frente al microorganismo *M. Luteus* NCIB8166. No se obtuvo efecto usando las mezclas M3 y M4 (Cuadro 16). Por lo tanto se eligió la mezcla M1 (50 ppm  $\epsilon$ -polilisina-L y 5 ppm natamicina), y M2 (50 ppm  $\epsilon$ -polilisina-L y 10 ppm natamicina), para realizar pruebas posteriores. Estas dos mezclas se analizaron contra dos microorganismos Gram (+): *M. luteus* NCIB8166 (Figura 11) y *S. aureus* (Figura 12) y dos Gram (-): *Salmonella spp.*, (Figura 13) y *P. aeruginosa* (Figura 14).

Se estudió el efecto combinado de dos agentes antimicrobianos, en las mezclas M1 y M2, contra el microorganismo *M. Luteus* NCIB8166 en medio assay. En la Figura 11, se observa un control y las dos mezclas M1 y M2, el control alcanza su población máxima de  $10^9$  ufc/mL a las 24 horas de incubación. En la mezcla M1 su

población máxima llega hasta  $10^4$  ufc/mL a las 12 horas, después de ese tiempo es inhibido el crecimiento. En la mezcla M2 el crecimiento es inhibido a lo largo de las 24 horas. Ambos tratamientos muestran un efecto bactericida.

La cinética crecimiento de *S. aureus* (Figura 12), usando las mezclas M1 y M2, nos permite observar su desarrollo. El control alcanza su máxima población a las 12 horas hasta llegar a  $10^9$  ufc/mL, a partir de aquí se observa una fase estacionaria hasta las 24 horas, de aquí en adelante se presenta su fase de muerte. En la mezcla M1 se observa un crecimiento hasta  $10^6$  ufc/mL a las 16 horas, y a partir de ese punto se inhibe su crecimiento hasta las 24 horas. La mezcla M2 resultó más efectiva ya que su población máxima alcanzada la presenta a las cuatro horas con un crecimiento hasta  $10^4$  ufc/mL, y de las doce horas en adelante inhibe su crecimiento. Ambos tratamientos muestran un efecto bactericida.

Para *Salmonella spp.* (Figura 13), el control tiene un crecimiento exponencial hasta alcanzar su máxima población de  $10^9$  ufc/mL a las 24 horas. La mezcla M1 inhibe el crecimiento desde las primeras cuatro horas, manteniéndose hasta el final del tiempo de incubación, la mezcla M2 presenta un crecimiento exponencial alcanzando una población máxima de casi  $10^5$  ufc/mL, con una fase estacionaria desde las cuatro hasta las ocho horas comenzando aquí su periodo de muerte. Ambas mezclas presentan un efecto bactericida resultando más efectiva la mezcla M1.

De igual forma se analizó el crecimiento de *P. aeruginosa* en caldo infusión cerebro corazón (BHI) (Figura 14), la cual muestra un crecimiento logarítmico desde  $10^3$  ufc/mL, hasta alcanzar su máxima población de  $10^9$  ufc/mL a las 32 horas de incubación, sin importar la adición de la mezcla M1 o M2, es decir ambas combinaciones no tuvieron efecto sobre su crecimiento.

En resumen, de los dos microorganismos Gram (-) analizados, se observó mejor actividad inhibitoria de la mezcla M1 (5 ppm natamicina y 50 ppm  $\epsilon$ -polilisina-L), con respecto a *Salmonella spp.*, ya que para *P. aeruginosa*, como se muestra en la Figura 14, no se observa efecto inhibitorio de las mezclas M1 y M2.

#### VI.4 Incorporación de $\epsilon$ -polilisina-L a materiales de empaque

De acuerdo a V.2.5, se incorporó  $\epsilon$ -polilisina-L en la solución filmogénica en dos diferentes concentraciones 500 ppm y 1500 ppm, posteriormente se realizó la película, la cual se vertió sobre una superficie de vidrio para después de su secado, desprenderlas y cortarlas en discos de 5 mm de diámetro. Se evaluó su actividad antimicrobiana mediante dos métodos; en el primero la película fue esterilizada mediante radiación ultravioleta para posteriormente evaluar su efecto antimicrobiano y en el segundo aplicando la solución filmogénica directamente a los pozos realizados en placas, inoculadas con dos microorganismos, la bacteria Gram (+) *M. luteus* NCIB8166 y la levadura *Torulaspota spp.*

Cuadro 16. Mezclas de natamicina y  $\epsilon$ -polilisina-L, utilizando *M. luteus* NCIB8166 como microorganismo indicador mediante la técnica de difusión en agar. Se indica el promedio  $\pm$  de desviación estándar.

Mezclas	Halo de inhibición (mm)
M1 (5 ppm natamicina y 50 ppm $\epsilon$ -polilisina-L)	12.25 $\pm$ 0.92
M2 (10 ppm natamicina y 50 ppm $\epsilon$ -polilisina-L)	10.75 $\pm$ 0.95
M3 (3 ppm natamicina y 25 ppm $\epsilon$ -polilisina-L)	SE <sup>a</sup>
M4 (3 ppm natamicina y 50 ppm $\epsilon$ -polilisina-L)	SE <sup>a</sup>

<sup>a</sup>SE: Sin efecto observado

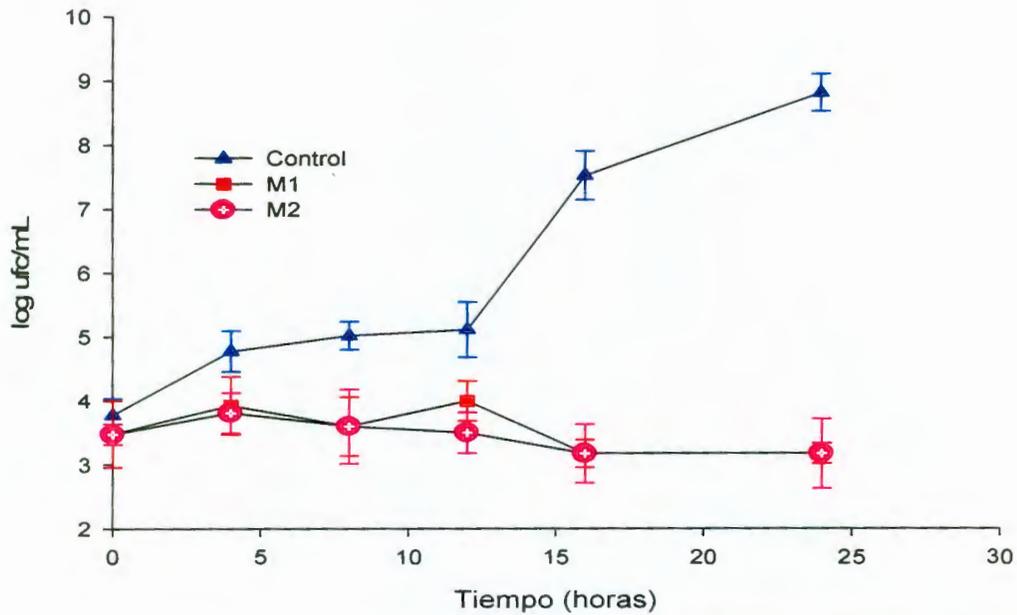


Figura 11. Cinética de crecimiento de *M. luteus* NCIB8166 usando la mezcla a M1 (50 ppm de  $\epsilon$ -polilisina-L y 5 ppm de natamicina) y M2 (50 ppm de  $\epsilon$ -polilisina-L y 10 ppm de natamicina), incubado a 30°C por 48 horas en caldo Assay.

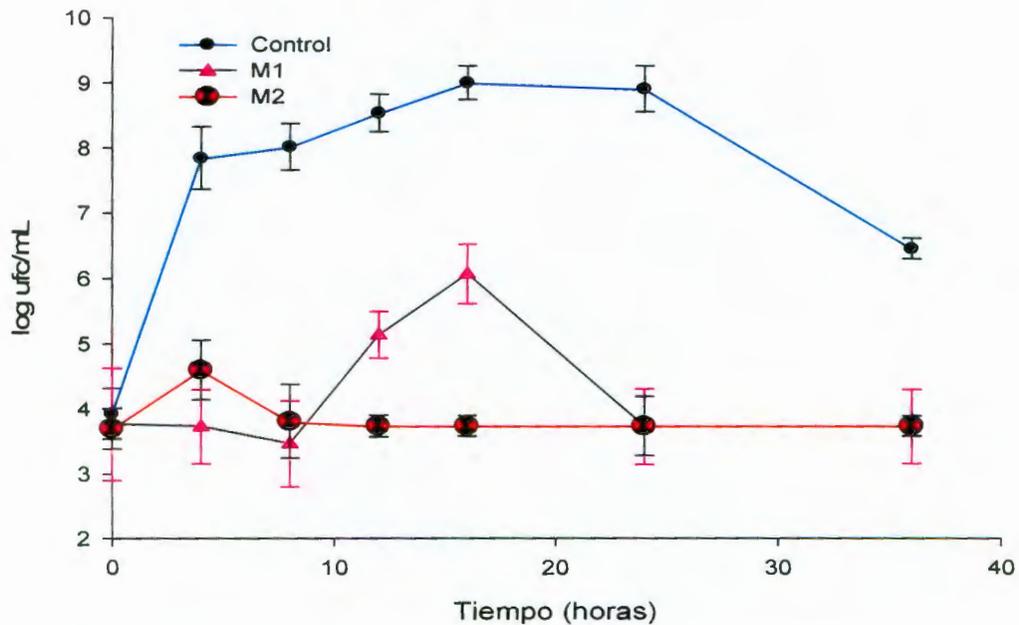


Figura 12. Cinética de crecimiento de *S. aureus*, usando las mezclas M1 y M2 incubado a 37°C por 24 horas en medio infusión cerebro corazón (BHI).

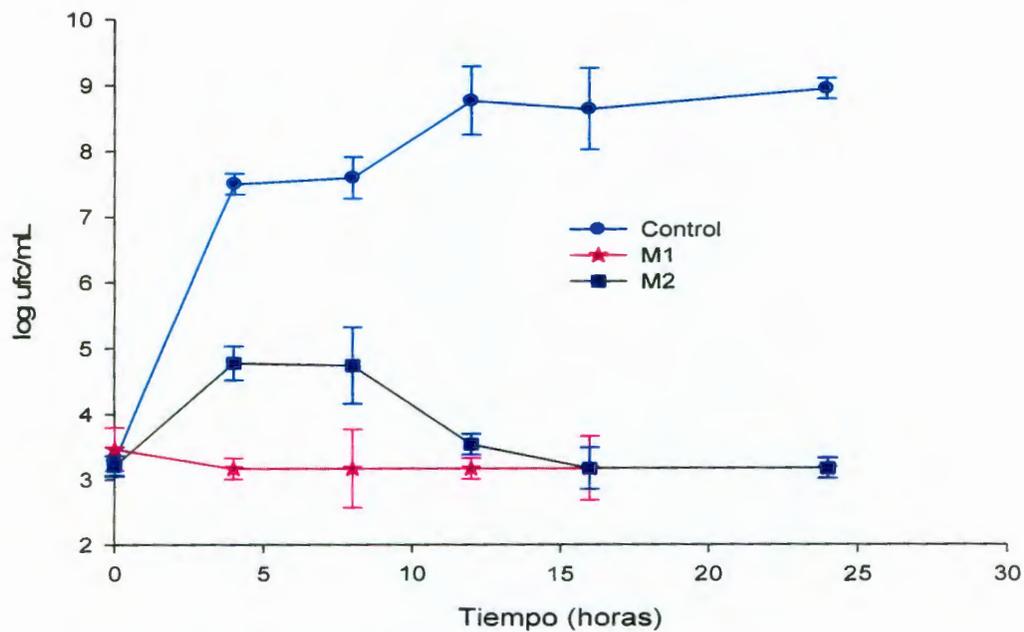


Figura 13. Cinética de crecimiento de *Salmonella spp.*, frente a M1 y M2 incubado a 30°C por 24 horas en medio infusión cerebro corazón (BHI).

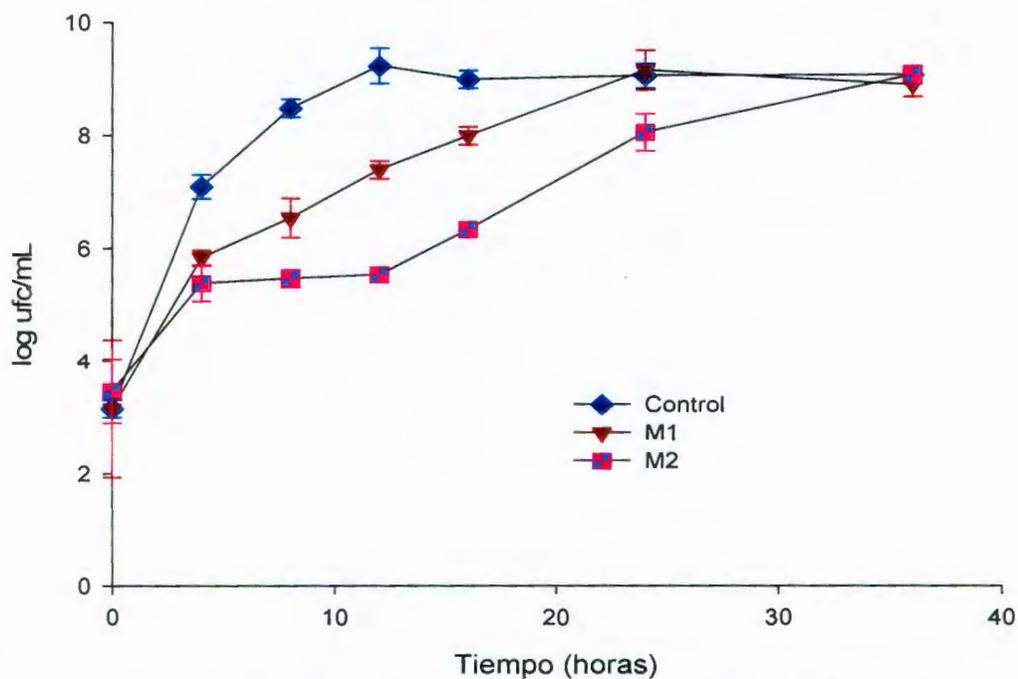


Figura 14. Cinética de crecimiento de *P. aeruginosa* frente a M1 y M2 incubado a 30°C por 24 horas en medio infusión cerebro corazón (BHI).

Usando el primer método, en el Cuadro 17 se observa que la  $\epsilon$ -polilisina-L no presenta efecto alguno contra el *M. luteus* NCIB8166, en ninguna de las dos concentraciones evaluadas 500 ppm y 1500 ppm, sin embargo la mismas concentraciones muestran buen efecto contra *Torulaspota spp.*, ya que como se había analizado anteriormente la  $\epsilon$ -polilisina-L, es activa contra hongos y levaduras (Cuadro 15). Los resultados del segundo método tuvieron un comportamiento muy similar al primero.

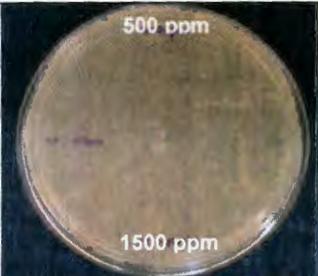
#### VI. 5 Mezcla de antimicrobianos naturales $\epsilon$ -polilisina-L y natamicina incorporado a queso fresco

Las diferentes condiciones a las que se encuentra expuesto un producto fresco en este caso el queso panela, son numerosas ya que después de haber sido pasteurizada la leche durante el proceso de elaboración, el producto es ampliamente manipulado hasta llegar a su empaçado.

Es por esto que se buscaron nuevas alternativas para garantizar la calidad microbiológica del queso, utilizando como recubrimiento una solución filmogénica adicionada con la mezcla M2 (10 ppm natamicina y 50 ppm  $\epsilon$ -polilisina-L), combinación de dos agentes antimicrobianos, y utilizando empaques con dos diferentes condiciones: con vacío y sin vacío. Con esto se pretendió dar al producto una serie de barreras de protección.

Se seleccionó *S. aureus*, para ser incorporado en queso ya que es uno de los principales microorganismos asociados con brotes en queso (Lund y col., 2000). En base a los resultados de la cinética de crecimiento de *S. aureus* se seleccionó la mezcla M2 (10 ppm natamicina y 50 ppm  $\epsilon$ -polilisina-L) (Figura 15), para ser incorporada sobre el queso.

Cuadro 17. Efecto de  $\epsilon$ -polilisina-L, adicionado a películas activas a base de proteína de suero, en concentración de 500 ppm y 1500 ppm. Se muestra el promedio  $\pm$  desviación estándar.

Microorganismo	$\epsilon$ -polilisina-L 500ppm (mm)	$\epsilon$ -polilisina-L 1500ppm (mm)	Difusión en agar
<i>Micrococcus luteus</i>	<sup>a</sup> SE	<sup>a</sup> SE	
<i>Torulaspota spp.</i>	18.75 $\pm$ 1.07	21.8 $\pm$ 1.44	

<sup>a</sup>SE= sin efecto

La mezcla de los agentes antimicrobianos natamicina y  $\epsilon$ -polilisina-L, resulta una buena opción para su aplicación sobre queso fresco, debido a que los principales deterioradores son hongos y levaduras, para lo cual ambos antimicrobianos resultan muy efectivos. La mezcla M2 (10 ppm natamicina y 50 ppm  $\epsilon$ -polilisina-L), cubre a una serie de microorganismos mencionados en el espectro de inhibición de  $\epsilon$ -polilisina-L, que por sí solo no mostró efecto en este estudio, incluyendo ahora microorganismos Gram (+).

El queso fresco panela (marca comercial empacado al vacío), fue inoculado con una población de  $10^7$  ufc/mL, con el microorganismo *S. aureus* (Figura 15). La solución que contiene el antimicrobiano llamada solución filmogénica, se aplicó de igual forma por extensión sobre la superficie del queso fresco, previamente inoculado con el microorganismo. Con el fin de evaluar el efecto antimicrobiano de

la mezcla M2 (10 ppm natamicina y 50 ppm  $\epsilon$ -polilisina-L), se usaron diferentes condiciones de almacenamiento.

Se evaluaron cuatro tratamientos de almacenamiento, T1: con recubrimiento / sin vacío; T2: con recubrimiento / con vacío; T3: sin recubrimiento / con vacío; T4: sin recubrimiento / sin vacío; empleando barreras múltiples de protección (Figura 16), buscando la mejor opción para brindarle al queso fresco mayor vida de anaquel.

Se realizó la cuenta de la carga microbiana inicial, a los siete, quince, veintiuno y treinta días, por duplicado utilizando la técnica de extensión en superficie sobre medio selectivo Baird Parker (Figura 17). Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4°C.

En la Figura 18, se encuentran los resultados de los cuatro tratamientos, en donde el tratamiento T4 (sin recubrimiento / sin vacío), funciona como control de los demás tratamientos, ya que tiene un crecimiento logarítmico hasta alcanzar una población de  $10^9$  ufc/mL. El tratamiento T3 (sin recubrimiento / con vacío) no muestra un crecimiento, mas bien mantiene su carga inicial de  $10^7$  ufc/mL observándose que disminuye un logaritmo hasta alcanzar un tiempo de almacenamiento de 30 días. El tratamiento T2 (con recubrimiento / con vacío) muestra un mejor efecto ya que existe inhibición del crecimiento y la carga microbiana disminuye dos logaritmos, de  $10^7$  ufc/mL a  $10^5$  ufc/mL.

El mejor tratamiento resulta T1 (con recubrimiento / sin vacío) ya que existe una inhibición del crecimiento desde los primeros 15 días manteniéndose durante el transcurso del tiempo de almacenamiento, disminuyendo tres logaritmos respecto a la carga inicial  $10^7$  ufc/mL, y cinco logaritmos respecto al control  $10^9$  ufc/mL, brindándole a nuestro producto mayor vida de aquel, y en caso de encontrarse contaminado disminuyendo la carga microbiana, logrando así que el producto se conserve por un periodo más largo hasta llegar a manos del consumidor.

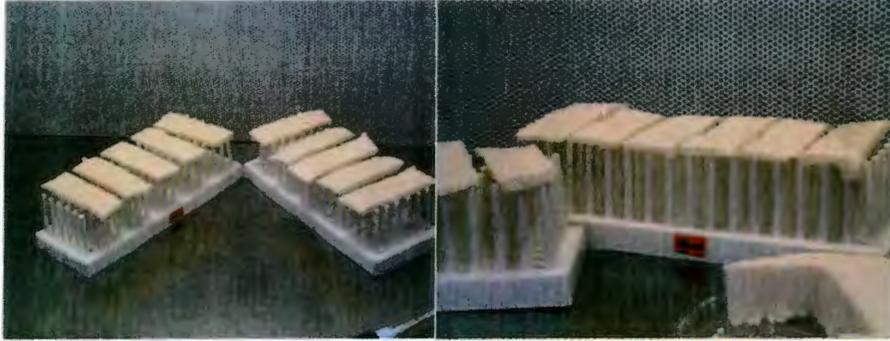


Figura 15. Trozos de queso fresco panela de 7cm x 3 cm, con un peso de 15 g, inoculados con 500  $\mu$ L de *S. aureus* con una población de  $10^7$  ufc/mL.



Figura 16. Tratamientos aplicados sobre queso fresco panela T1: con recubrimiento / sin vacío; T2: con recubrimiento / con vacío; T3: sin recubrimiento / con vacío; T4: sin recubrimiento / sin vacío.



Figura 17. Recuento de población de *S. aureus* utilizando la técnica de extensión en superficie usando medio selectivo Baird Parker.

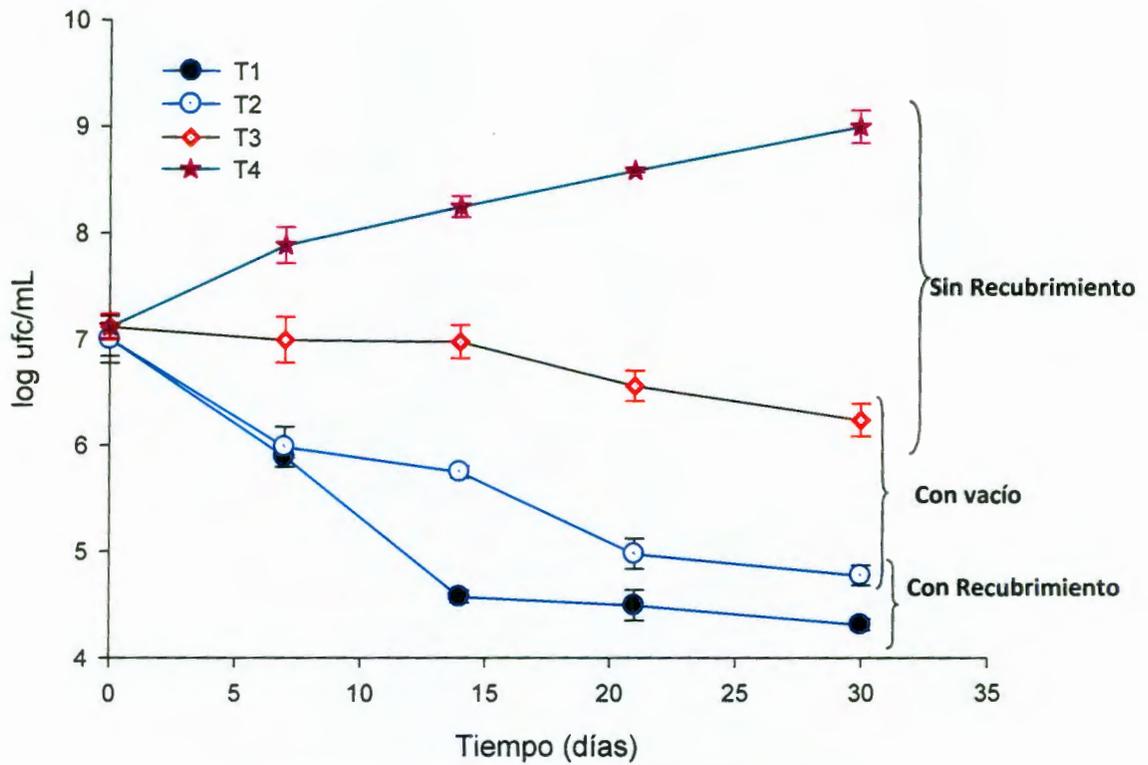


Figura 18. Efecto de diferentes tratamientos (T1: con recubrimiento / sin vacío; T2: con recubrimiento / con vacío; T3: sin recubrimiento / con vacío; T4: sin recubrimiento / sin vacío), sobre queso fresco inoculado con *S. aureus* con  $10^7$  ufc/mL e incubado a 35 °C en medio Baird Parker.

## VII. DISCUSION

Se evaluó el espectro de inhibición de  $\epsilon$ -polilisina-L y se comparó contra el reportado en la hoja técnica (Handary, 2004). En ésta se menciona que existe un gran efecto contra microorganismos Gram (-), Gram (+), hongos y levaduras. Sin embargo, no concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio ya que solo fue activo contra las cepas de hongos y levaduras utilizadas, es decir no se usaron los mismos fenotipos. Esto puede ser debido a la diversidad de cepas que existen, ya que la diferencia les atribuye características especiales que influyen en el ataque del antimicrobiano contra el microorganismo.

Hiraki en 1995, reportó el uso de  $\epsilon$ -polilisina-L como antimicrobiano natural aplicado en diferentes alimentos, sus limitaciones de uso estuvieron asociadas al sabor amargo que adquiere el alimento. Sin embargo, debido a su alto poder antimicrobiano, es adicionado en bajas concentraciones. De igual forma realizó estudios de toxicidad en ratas, reportando una nula toxicidad. También se reporta el efecto con otros compuestos como glicina, etanol y tiamina indicando, que la actividad antimicrobiana es fuertemente reforzada, al combinar glicina con  $\epsilon$ -polilisina-L. Se realizó una cinética de crecimiento en donde aplicaron una mezcla de  $\epsilon$ -polilisina-L y glicina, y cada uno de ellos por separado, en leche condensada y al final reportan un efecto sinérgico en esta mezcla. Las patentes y la mayoría de los estudios de  $\epsilon$ -polilisina-L como antimicrobiano natural se han realizado en Japón, el presente estudio concuerda con el artículo (Hiraki, 1995), en que la mezcla con otros antimicrobianos puede potenciar el efecto antimicrobiano de  $\epsilon$ -polilisina-L, de igual forma ayuda a disminuir el sabor amargo que adquiere al utilizarse en grandes concentraciones.

De igual forma, Jeng-Leun y col. (2001), realizaron mezclas de antimicrobianos, en este caso utilizaron extractos de cebollín (forma parte de la familia del ajo y la cebolla) y canela (rica en aceites esenciales que contiene taninos que inhiben el crecimiento microbiano). Sus limitaciones de uso, están asociados con los sabores,

ya que alteran el sabor del alimento. La evaluación del efecto mixto se realizó para una serie de microorganismos Gram (+), Gram (-), hongos y levaduras (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium sp.*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Kloeckera apiculata* CCRC 20539, *Pichia membranifaciens* CCRC 20859, *Debaromyces hansenii* CCRC 21945, *Penicillium italicum* CCRC 30567, *Aureobasidium pullulans* CCRC 3198, entre otros), llegando a un resultado sumamente favorables. El espectro de inhibición comprendió una serie de microorganismos que cada uno de los extractos por sí solos no mostraron efecto alguno como en el caso de *Escherichia coli* y *Pichia membranifaciens* CCRC 20859. También llevaron a cabo evaluaciones de la mezcla en jugo, carne y leche, encontrando estabilidad en pH básicos y ácidos, y un efecto bactericida.

En la actualidad se busca conservar los alimentos por periodos mucho más largos, garantizando la calidad microbiológica del alimento, brindando al consumidor seguridad al ingerirlo. Por tal motivo se busca mediante la ciencia y la tecnología de los alimentos, combinar la interacción de los antimicrobianos naturales con los componentes y características del alimento; ofreciendo una mejor opción para su conservación.

En la industria actualmente se busca implementar el uso de antimicrobianos naturales. En un estudio realizado por Belletti y col. (2004), se evaluaron diferentes antimicrobianos extraídos de cítricos, para lo cual se midió cantidad de CO<sub>2</sub> producido por *Saccharomyces cerevisiae* en jugo, medido por medio de un cromatógrafo de gases. Los extractos de cítrico como antimicrobianos, resultaron activos contra *E. coli* mostrando un buen efecto y evitando en el jugo un desagradable sabor a conservador.

El nicon-LQ\*<sup>®</sup>, utilizado en el estudio presente también es extraído de cítricos como la toronja, pero su desventaja es que a grandes concentraciones adquiere el alimento un sabor amargo. Sin embargo, en la actualidad se buscan nuevas opciones de antimicrobianos que no alteren las características sensoriales del alimento y prolonguen su vida de anaquel.

Jong-Whan y col. (2006), evaluaron la actividad de diferentes tratamientos como recubrimientos activos a base de quitosano (como agente antimicrobiano) y nanocompuestos orgánico e inorgánico, así como su incorporación en empaques activos y su biodegradabilidad. La evaluación se realizó con los microorganismos *S. aureus* y *L. monocytogenes*, mediante el método de disco, donde la actividad antimicrobiana estaba determinada por el diámetro del disco, resultando activo contra ambos microorganismos. Se aplicó en cinéticas de crecimiento contra estos microorganismos dando como resultado una baja en la carga microbiana hasta de seis logaritmos.

López y col. (2007), evaluaron la actividad en recubrimientos activos, con el objetivo de alargar la vida de anaquel de alimentos perecederos a base de extractos de productos naturales clasificados como GRAS por la FDA. Las esencias de canela, clavo y orégano, se adicionaron sobre polipropileno (PP) y polietileno (PE). Su actividad fue evaluada con diferentes microorganismos Gram (+): *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* CECT 495, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644; Gram (-) *Escherichia coli* ATCC 29252, *Yersinia enterocolitica* CECT 4315, *Salmonella choleraesuis* CECT 4000, y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; Levaduras: *Candida albicans* ATCC 64550, *Debaryomyces hansenii* CECT 10353, y *Zygosaccharomyces rouxii* CECT 11928; y Hongos: *Penicillium islandicum* CECT 2762NT, *Aspergillus flavus* CECT 2687, *Penicillium*. En donde su nivel máximo estuvo determinado por factores organolépticos adquiridos por el alimento. Se obtuvo un buen efecto frente a hongos en concentraciones aceptables 4% (p/p), fue

activo contra bacterias Gram (+) y Gram (-) en concentraciones altas, tales que alteraban el sabor del alimento. El satisfacer la necesidad del consumidor, lleva a la investigación científica a la búsqueda de diferentes opciones para alargar la vida de anaquel de alimentos perecederos. Los dos grupos de investigación antes mencionados evaluaron el efecto antimicrobiano de compuestos naturales. En el presente estudio se evalúa de igual manera la actividad de agentes antimicrobianos naturales, con el fin de alargar la vida de anaquel de queso fresco. Se incorporan a recubrimientos activos, probando su efectividad contra *S. aureus*, es un estudio muy similar a lo realizado. Sin embargo, ellos utilizan técnicas donde observan interacción de los cationes con los componentes de la película. Lo que nos da un panorama más amplio de las posibles interacciones y efectos tanto con los componentes del recubrimiento como del microorganismo. Este trabajo de investigación podría ser de utilidad para una continuación del estudio, profundizando las interacciones del agente antimicrobiano con el recubrimiento, brindándonos más información que puede ser muy aplicable en la industria alimentaria. Debe destacarse que como complemento a la evaluación de las mezclas, el realizar isobogramas nos proporcionaría la tendencia, del efecto, ya sea sinérgico, antagónico o aditivo.

Sun y col. (2009), realizaron una investigación de biopelículas formadas en materiales industriales. Se evaluó la efectividad de diferentes antimicrobianos sintetizados a partir de aminos y amidas. Probaron los antimicrobianos para inhibir el desarrollo de microorganismos, frente a *S. aureus* y *E. coli*; ellos lo realizaron mediante la inoculación de los microorganismos sobre la superficie, en una población de  $10^8$  ufc/mL, y después del lavado son desinfectados con los antimicrobianos. De la superficie se recuperan por medio de hisopos, para determinar la carga microbiana. Como resultados obtuvieron muy buen efecto de sus antimicrobianos sobre *S. aureus*, en biopelículas. Este tipo de investigaciones podrían servir posteriormente, evaluando la efectividad de nuestra mezcla M2 (10 ppm natamicina y 50 ppm  $\epsilon$ -polilisisina-L), en la desinfección del equipo para la

elaboración del queso fresco, evitando la contaminación de materia prima y adicionándolo al producto dándole mayor seguridad al consumidor de adquirir un alimento libre de microorganismos formadores de biopelículas, dañinos para la salud.

Kenawy y col. (2007), evaluaron los antimicrobianos de bajo peso molecular, los cuales son utilizados ampliamente en la industria alimentaria y en la desinfección de agua presentando como inconveniente su toxicidad residual, la solución es crear polímeros con actividad antimicrobiana. También analizaron el efecto de los homopolímeros y como es que su elevado peso molecular influye en la actividad antimicrobiana. Realizaron estudios sobre el quitosano agente natural muy abundante que se obtiene de la concha de crustáceos y las cutículas de insectos, el cual cuenta con un gran efecto antimicrobiano. El quitosano fue mezclado con sales de amonio aumentando su cadena lo cual le proporcionó un efecto cinco veces mayor a su poder antimicrobiano. Concluyeron que el aumento en la cadena proporciona un efecto antimicrobiano mayor siendo los polímeros y homopolímeros la mejor opción. En la actualidad se evalúan diferentes opciones de antimicrobianos naturales, efectos combinados e interacciones entre componentes antimicrobiano-alimento como antimicrobiano-microorganismos, buscando la mejor opción para los diferentes tipos de alimentos, atacando el riesgo de contaminación y alargando la vida de anaquel de diferentes alimentos.

Sebti y col. (2007), evaluaron materiales de empaque, comestibles a base de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), y quitosano incorporadas con y sin nisina. Su actividad es evaluada sobre *M. luteus* ya que es un microorganismo sensible a la nisina. Se busca responder a las preocupaciones que demanda el consumidor, con un empaque biodegradable y que cuide el medio ambiente, lo cual no es parte de los empaques de polietileno y polipropileno. Tratan de responder a la demanda de la industria de alimentos, empleando varios polímeros biodegradables, que puedan servir como material de empaque. Se llegó a la conclusión que la incorporación de

hidroxi-propil-metil-celulosa (HPMC), y quitosano, adicionando nisina era la mejor opción ya que mostraba una mejor actividad contra diferentes microorganismos, tales como: *M. luteus* IP 270, *Staphylococcus aureus* IP 58156 y *L. monocytogenes* ATCC18156. En dicha investigación se evalúa la actividad de películas comestibles y biodegradables, como en el presente estudio buscando en ambos satisfacer las necesidades del consumidor y del medio ambiente incorporando los agentes antimicrobianos en empaques biodegradables. El asegurar la inocuidad y calidad microbiológica del alimento, brinda al consumidor la seguridad de ingerir un alimento apto para el consumo. Para ello se han evaluado agentes antimicrobianos naturales, que junto con una serie de barreras tales como el empaque con y sin vacío, una cadena de refrigeración adecuada y el recubrimiento activo adicionado de la mezcla de los dos agentes antimicrobianos aquí probados, le den al alimento mayor calidad de conservación.

Geornaras y col. (2007), evaluaron la actividad de  $\epsilon$ -polilisisina en extractos de comida leche, arroz, verdura (brócoli y coliflor) y carne. El agente antimicrobiano  $\epsilon$ -polilisisina fue probado en una concentración de 0.05% y 0.02% p/v contra *Escherichia coli* O157:H7, y *Listeria monocytogenes* para *Salmonella Typhimurium* en una concentración de 0.02% y 0.04% p/v, las muestras se analizaron periódicamente durante un 6 días a una temperatura de 12°C. El mejor efecto fue observado en extractos de arroz y verduras ya que aquí se presentó una reducción hasta de cinco logaritmos en la carga microbiana. En la investigación se encontró un buen efecto de  $\epsilon$ -polilisisina en sus extractos y propusieron que en investigaciones futuras se realicen sobre alimentos reales, tal fue lo que se realizó en el presente estudio donde se analizó la actividad de una bacteria patógena en queso fresco, fue evaluada mediante el recubrimiento activo adicionado de la mezcla de los agentes antimicrobianos  $\epsilon$ -polilisisina y natamicina, sin embargo aunque el estudio se halla realizado en un alimento real y no sobre un extracto, queda mucho que agregar sobre el efecto de los antimicrobianos naturales ya que cada alimento cuenta con características propias.

## VIII. CONCLUSIONES

El agente antimicrobiano  $\epsilon$ -polilisina-L no es activo contra los microorganismos Gram (+) *L. plantarum* 9L, *L. plantarum* 18L, *L. plantarum* 35L, *M. Luteus* NCIB8166, *S. aureus* 8443; Gram (-) *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., y *P. aeruginosa*, utilizados en esta investigación realizada mediante la técnica de difusión en agar.

El efecto mostrado por el agente antimicrobiano  $\epsilon$ -polilisina-L para las cepas utilizadas de hongos: *A. niger* ATCC9642, *P. funiculosus* ATCC9645, *T. virens* ATCC9645 y levaduras: *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, *P. membranifaciens* ,y *S. bouldarii*, es de dos a tres veces mayor que el mostrado por el nicon-LQ\*®.

No se observó efecto sobre *P. aeruginosa* tanto en medio sólido como en medio líquido, usando  $\epsilon$ -polilisina-L. Caso contrario para el agente antimicrobiano nicon-LQ\*®, ya que con este se observó un efecto bactericida en medio líquido, y un halo de inhibición con un diámetro de  $6.0 \pm 0.80$  mm en medio sólido.

Se determinó de la cinética de crecimiento de *P. membranifaciens*, en presencia de los antimicrobianos  $\epsilon$ -polilisina-L y natamicina, observándose que el efecto antimicrobiano de  $\epsilon$ -polilisina-L fue fungistático, mientras que el de natamicina resultó ser fungicida.

La mezcla de  $\epsilon$ -polilisina-L y natamicina, mostró efecto sobre varios microorganismos mencionados en el espectro de inhibición de  $\epsilon$ -polilisina-L (*M. luteus*, *S. aureus* 8443 y *Salmonella* spp.), que por sí solo no mostró. Esto se observó mediante la aplicación de las mezclas M1 (50 ppm  $\epsilon$ -polilisina-L y 5 ppm natamicina), y M2 (10 ppm natamicina y 50 ppm  $\epsilon$ -polilisina-L), en diferentes cinéticas de crecimiento de dichas bacterias.

En la cinética de crecimiento de *S. aureus* ambos tratamientos M1 y M2 muestran un efecto bactericida, la mezcla M2 resultó mas efectiva ya que su población maxima es de  $10^4$  ufc/mL.

Dentro de las bacterias Gram (-), para *Salmonella spp.*, tanto la mezcla M1 como M2 mostraron efecto inhibitorio, siendo mas efectiva M1 aunque ambas mezclas presentaron un efecto bactericida. Por otro lato para *P. aeruginosa* no se observó efecto inhibitorio en ninguna de las mezclas adicionadas M1 y M2.

La mezcla M2 (10 ppm natamicina y 50 ppm  $\epsilon$ -polilisina-L), se incorporó en queso fresco, mediante una prueba de reto con *S. aureus* aplicándose en cuatro tratamientos, siendo T1 (con/recubrimiento-sin/vacío), el mejor tratamiento, ya que disminuyó cinco logaritmos la carga microbiana.

El uso de antimicrobianos naturales en esta investigación disminuyó en gran medida el desarrollo de microorganismos en un alimento fresco. La búsqueda e implementación de nuevos métodos y técnicas, para la conservación de alimentos, es hoy en día una medida necesaria para prolongar la vida de anaquel de alimentos frescos.

La mezcla de  $\epsilon$ -polilisina-L y natamicina pueden contribuir a una mejor calidad de conservación ya que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos Gram (+) y promotores del deterioro como hongos y levaduras, dentro de nuestro alimento.

Es fundamental el estudio constante e implementación de nuevos métodos y agentes antimicrobianos, para alargar la vida de anaquel de los diferentes productos alimentarios frescos ó de mínimo procesamiento.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Argarza S. A. de C. V.**, Ficha técnica **2004**. Nicon-LQ\*<sup>®</sup> aditivo-sanitizante para la formulación de alimentos. [www.argarza.com](http://www.argarza.com), 25/02/2009.
- Aristippos, D.** **2002**. Protein-Based Films and Coatings. 1ra. ed., CRC., Boca Raton: 4-7.
- Belletty, N.**, Ndagijumana, M., Sisto, C. **2004**. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essence on *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Agriculture and Food Chemistry. Vol. 52: 6932-6938.
- Bhunja, A.**, Johnson, M., Ray, B. **1988**. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidolactic*. Journal of Bacteriological Application. Vol. 65: 261-268.
- Brock, M.**, Martinko, J., Parker, J. **2004**. Biología de los Microorganismos. 10a. ed., Pearson, Madrid: 137-166, 942-956.
- Codex Alimentarius**, **1999**. Norma general para Queso – CODEX STAN A-61978.
- Davidson, P.**, Sofos, J., Branen, A. **2005**. Antimicrobials in Food. 3ra. ed., CRC., Boca Raton: 275-287.
- Davis, N.**, Diner, U. **1987**. Mycotoxins, in foods and beverage mycology van. Nostrand Reinhold, New York: 517-519.
- Díaz, R.**, González, G. **2001**. *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. Revisión de Salud Pública y Nutrición. Vol. 2(3): 15-24.
- Doyle, P.**, Beuchat, R., Montville, T. **2005**. Food microbiology fundamentals and frontiers. ASM Press, Washington: 100-115, 353-355.
- FDA**. U. S. Food and Drug Administration **2004**. Gras Notice No. GRN 000135.
- Geornaras, I.**, Yoon, Y., Belk, K., Smith, C. **2007**. Antimicrobial activity of  $\epsilon$ -polylysine against *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella tphymurium*, and *Listeria monocytogenes* in various food extracts. Journal of Food Science. Vol. 72(8): M330-M334.
- Hamilton-Miller, T.** **1974**. Fungal sterols and the mode of action of the polyene antibiotics. Advances in Application Microbiology. Vol. 17: 109-115.

- Han, J. 2000.** Antimicrobial food packaging. *Food Technology*. Vol. 54(3): 56-57.
- Handary Bio-Engineering B.V., Ficha técnica 2004.**  $\epsilon$ -Polylysine: microbial production, biodegradation and application potential. Handary for better forever. [www.handary.com](http://www.handary.com), 28/09/2008.
- Hiraki, J. 1995.** Basic and applied studies on  $\epsilon$ -polylysine. *Journal of Antibacterial Antifungal Agents*. Vol. 23: 349–354.
- Jeng-Leun, M., Chiu-Ping, C., Pao-Chuan, H. 2001.** Antimicrobial effect of extracts from chinese chive, cinnamon, and corni fructus. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. Vol. 49: 183-188.
- Jong-Whan, R., Seok-In, H., Hwan-Man, P. 2006.** Preparation and characterization of Chitosan-Based nanocomposite films with antimicrobial activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. Vol. 54: 5814-5822.
- Kenawy, R., Worley, D., Broughton, R. 2007.** The chemistry and applications of antimicrobial polymers: A State-of-the-Art Review. Published by the American Chemical Society. Vol. 8(5): 1360-1382.
- Lancelin, J., Beau, J. 1995.** Structure of glycosylated polyene macrolides: the example of pimaricin. *Bulletin de Societe Chimique de France*: Vol. 132: 215.
- Leistner, L. 2000.** Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *Journal Food Microbiology*. Vol. 55: 181-186.
- Leistner, L., Gorris, L. 1995.** Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science and Technology*. Vol. 6: 41-46.
- Lemus, E., Maniscalchi, M., Hassoun, M., Vizcaya, H. 2007.** Estafilococos oxacilino resistentes en queso blanco fabricado en el estado Anzoátegui, Venezuela. *Sociedad Venezolana de Microbiologia*. Vol. 28: 48-54.
- Lin, Y., Krochta, J. 2003.** Plasticizer effect on grease barrier and color properties of Whey-Protein coatings on paperboard. *Food Engineering and Physical Properties*. Vol. 68: 229-233.
- López, P., Sánchez, C., Batlle, R. 2007.** Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. Vol. 55: 8814-8824.

**Lund, B., Parker, T., Gould, G. 2000.** The Microbiological Safety and Quality of Food. 2da. ed., Aspen Publishers, Gaithersburg: 184-190.

**NOM-110SSA1-1994.** Norma Oficial Mexicana de Bienes y Servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

**NOM-115-SSA1-1994.** Norma Oficial Mexicana de Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.

**NOM-121-SSA1-1994.** Norma Oficial Mexicana de Bienes y Servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados.

**Parrilla, M., Vazquez, J., Saldade, O., Nava, L. 1993.** Brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. Salud Pública México. Vol. 35(5): 456-463.

**Ramírez, S., Santos, E., Zuñiga, A. 2002.** VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos. México, Guanajuato, Gto. 25-30, Noviembre: 279-284.

**Roller, S. 2003.** Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. 1ra. ed., Woodhead, Cambridge: 83-97, 176.

**Sebti, I., Chollet, E., Degraeve, P. 2007.** Water sensitivity, antimicrobial, and physicochemical analyses of edible films based on HPMC and/or Chitosan. Journal of Agriculture and Food Chemistry. Vol. 55(3): 693-699.

**Snayder, O., Poland, D. 2000.** America "safe" food. Dairy Food and Environment Sanit. Vol. 18(2): 1-24.

**Sun, X., Cao, Z., Sun, Y. 2009.** N-Chloro-alkoxy-s-triazine-based antimicrobial Additives: preparation, characterization, and antimicrobial and Biofilm-Controlling functions. Industrial & Engineering Chemistry Research. Vol. 67: 607-612.

**Vanderzant, C., Splittstoesser, D. 1992.** Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3a ed., American Public Health Association. Washington: 75-97.

**Walzem, R. 2001.** Aditivos funcionales. Propiedades saludables de las proteínas de suero y fracciones de suero. Industria Alimentaria. Vol. 1: 19-23.

## XII. ANEXO

### Soluciones para preparar medio Baird-Parker

#### Medio base Baird-Parker

Ingredientes: triptona 10.0 g, extracto de levadura 1 g, extracto de carne 5 g, glicina 12 g, cloruro de litio 5 g, piruvato de sodio 10 g, agar 20 g y 1L de agua. Disolver los ingredientes o el agar base en agua y calentar hasta hervir durante 1 minuto con agitación constante. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos enfriar y mantener el medio a 45°C.

#### Solución de telurito

Ingredientes: telurito de potasio 1 g, agua 100 mL, disolver el telurito de potasio en agua y esterilizar. La solución puede ser almacenada por varios meses a temperatura de 0 a 5 °C.

#### Emulsión de yema de huevo

Lavar con agua y jabón los huevos frescos que sean necesarios y limpiarlos con una solución de tintura de yodo o solución alcohólica al 2%. Enjuagar con agua estéril y secar con gasa estéril. En una campana de flujo laminar, abrir los huevos y separar la clara de la yema mediante un separador en condiciones estériles. Trasferir las yemas a una probeta hasta un volumen de 60 mL y completar a 90 mL con solución salina isotónica. Verter la emulsión en un matraz erlenmeyer con perlas de vidrio estéril y agitar fuertemente para formar una emulsión. Filtrar a través de gasas.

#### Solución isotónica

Para 100 mL de agua adicionar 0.85 g de cloruro de sodio, disolver por completo y esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.