



**Universidad Autónoma de Querétaro**  
**Facultad de Química**  
**Programa de Posgrado en Alimentos del**  
**Centro de la República**  
**(PROPAC)**

“Microencapsulación de nisina a partir de *Lactococcus lactis* UQ2 y su incorporación en queso tipo panela”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:  
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

PRESENTA

IBQ. Honorio Patiño Galván

DIRIGIDA POR

Dra. Blanca E. García Almendárez

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO. DICIEMBRE, 2014

Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

“Microencapsulación de nisina a partir de *Lactococcus lactis* UQ2 y su incorporación en queso tipo panela”

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:  
Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Presenta:**

IBQ. Honorio Patiño Galván

**Dirigido por:**

Dra. Blanca E. García Almendárez

SINODALES

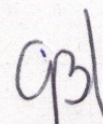
Dra. Blanca E. García Almendárez  
Presidente

Dr. Carlos Regalado González  
Secretario

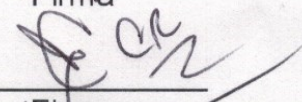
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Vocal

Dr. Eduardo Castaño Tostado  
Suplente

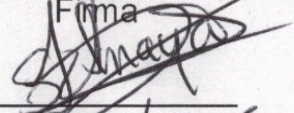
Dr. Eleazar Barboza Corona  
Suplente



Firma



Firma



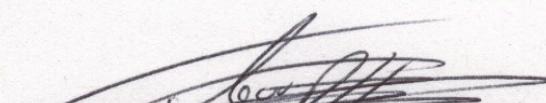
Firma



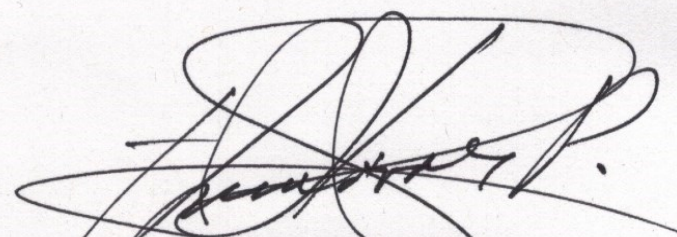
Firma



Firma



M.S.P. Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad



Dr. Irineo Torres Pacheco  
Director de Investigación y  
Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Diciembre, 2014  
México

## Resumen

La industria de productos lácteos es una de las más importantes en México, entre los productos más consumidos se encuentra el queso tipo panela. Sin embargo, por su alta humedad, presenta el riesgo a ser contaminado por microorganismos patógenos y deterioradores. La Bioconservación es un método que implica el uso de bacterias y/o sus metabolitos. La nisina producida por la cepa *Lactococcus lactis*, puede disminuir su actividad antimicrobiana cuando es agregada directamente al alimento. El objetivo de esta investigación se centró en la producción y microencapsulación de nisina y *Lactococcus lactis* UQ2, lo que permite su protección, evitando la interacción con los componentes del alimento y favoreciendo su liberación controlada dentro del queso, para asegurar su actividad durante un tiempo más prolongado. Se obtuvo la nisina en biorreactor instrumentado utilizando la cepa de *Lactococcus lactis* UQ2 controlando pH, temperatura y agitación usando suero lácteo como medio de cultivo alternativo. La bacteriocina y la bacteria se microencapsularon usando secado por aspersión y almidones modificados como materiales de pared. Para evaluar la actividad antimicrobiana de la nisina agregada y producida *in situ* por el cultivo protector, se agregó nisina y *L. lactis* UQ2 separadas y en combinación durante el proceso de elaboración de queso tipo panela, inoculado previamente con 4 log UFC/g de *L. monocytogenes* EGDe y se elaboró un queso control sin tratamiento. Para evaluar la capacidad probiótica de la cepa, se llevó a cabo la digestión gástrica simulada. Se realizó el análisis sensorial del queso con cultivo protector y nisina. La producción de nisina fue de 790 UI/mL a la hora 10 de fermentación. En el microencapsulado de nisina se obtuvo una recuperación de sólidos del 77.6 % con una actividad de 6730 UI/g. Se logró obtener una población de 10.3 log UFC/g de *L. lactis* UQ2 en el microencapsulado de la bacteria, lo que representa una sobrevivencia del 43.5 %, con una recuperación de sólidos del 72.85%. En el reto contra *L. monocytogenes* el queso inoculado con el cultivo protector mostró una reducción de 3 log UFC/g de *L. monocytogenes* y en la combinación con nisina microencapsulada hubo una reducción de 5 log UFC/g con respecto al control. El resultado anterior es asociado con una población de 8.4 log UFC/g del cultivo protector y una producción *in situ* de nisina de 465 UI/g después de 21 días a 4 °C. El cultivo protector agregado en queso mostró buena resistencia a la digestión simulada, manteniéndose viable en aproximadamente 9 log UFC/g durante la digestión simulada. En el análisis sensorial se obtuvo una aceptación del 80 %. La bioconservación representa un método adecuado para la conservación de queso tipo panela, ya que además de garantizar una mejor calidad microbiológica, también confiere mejores características sensoriales obteniendo un producto más atractivo al consumidor.

**Palabras clave:** nisina, *Lactococcus lactis*, queso, microencapsulación.

## Abstract

The dairy industry is one of the most important in Mexico. One of the most consumed product is the panela cheese type. However, for its high humidity it presents the risk of being contaminated by pathogens and spoilage microorganisms. The bioconservation is a method that involves the use of bacteria and/or its metabolites. Nisin produced by *Lactococcus lactis*, can decrease their antimicrobial activity when added directly to food. The objective of this research focused on the production and microencapsulation of nisin and *Lactococcus lactis* UQ2, allowing its protection and avoiding interaction with food components, promotes its controlled release within the cheese, to ensure its activity for longer. Nisin was obtained using *Lactococcus lactis* UQ2 using an alternative culture medium, controlling pH, temperature, and agitation in instrumented bioreactor. Bacteriocin and the bacteria were microencapsulated by spray drying. Modified starches were used as wall materials. To evaluated microbial activity of added nisin and *in situ* nisin produced by protective culture, microencapsulated bacteria and nisin were added together and separately during Panela type cheese process previously inoculated with 4 log *L. monocytogenes* EGDe and a control cheese was elaborated without treatment. To test the ability of the probiotic strain, simulated digestion was performed. It was performant a sensory analysis of cheese with protective culture and nisin. Nisin production was 790 IU/ml at 10 hours fermentation. In the microencapsulated nisin, a recovery of 77.6% solids was obtained with an activity of 6730 IU/g. A population of 10.3 log CFU/g of *L. lactis* UQ2 in microencapsulation was obtained. It represents a 43.5 % survival, with a recovery of 72.85 % solids. In the challenger again *L. monocytogenes* the cheese inoculated with protective culture showed reduction of 3 log CFU/g of *L. monocytogenes* population while combined with microencapsulated nisin, population reduction increased to 5 log CFU/g, compared with the control. The latter result is associated to a population of 8.4 log CFU/g of protective culture and *in situ* nisin production of 465 UI/g, after 21 day storage at 4°C. Bacteria added in cheese showed strong resistance to simulated digestion remained a population of 9 log CFU/g approximated. It was obtained an acceptability of 80 % in sensory analysis. Biopreservation represent an excellent method to conservation of panela type cheese, besides guaranteed the microbiology characteristic, also provide better sensory qualities, obtained an attractive product to the consumer.

**Key words:** nisin, *Lactococcus lactis*, cheese, microencapsulation

## DEDICATORIAS

A mis padres **Hermelinda Galván Corona** y **Honorio Patiño Rodríguez** que sin dudarlos desde que nací lo han dado todo por mí, por la confianza que me tienen y el apoyo que me han otorgado, no solo en mis estudios, sino también en la vida, gracias a ustedes puedo tener otro logro más en mi carrera. Siempre estaré infinitamente agradecido con ustedes.

A mis compañeros de generación por permitirme conocerlos y compartir esta aventura en Querétaro con ustedes, por esa amistad desinteresada y por esos momentos dentro del salón de clases donde no solo aprendíamos de nuestros profesores, sino también de nuestros compañeros. Muy en especial a **Eli, Diana, Daniel, David** y **Luis** mis hermanos de maestría.

Y por supuesto a mis compañeros de laboratorio **Eli, Irais, Tere, Martha, Ale, Karen, Ivana, Flor, Rodrigo, Víctor, Ray, Cesar** y **Ángel**, muchas gracias por sus consejos y su amistad.

## *AGRADECIMIENTOS*

A la **Universidad Autónoma de Querétaro** por abrirme las puertas y permitirme desarrollarme como profesional.

A la **Dra. Blanca García Almendárez** y **Dr. Carlos Regalado González** por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y pertenecer a un gran laboratorio.

A la **Dra. Silvia Amaya Llano**, al **Dr. Eduardo Castaño Tostado** y al **Dr. Eleazar Barboza Corona** por formar parte de mi comité evaluador así como también por todo el apoyo brindado a lo largo de este proceso.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por la beca otorgada.

A todos ustedes que colaboraron en pequeña o gran medida **MUCHAS GRACIAS.**

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
Resumen .....	i
Abstract .....	ii
ÍNDICE GENERAL .....	v
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISION DE LA LITERATURA.....	3
II. 1 Productoslácteos.....	3
II.1.2 Queso .....	3
II.2 Barreras múltiples .....	4
II.2.1 Bioconservación .....	5
II.3 Bacteriocinas .....	8
II.3.1 Propiedades bioquímicas. ....	10
II.3.2 Producción de bacteriocinas .....	10
II.4 Nisina .....	12
II.4.1. Biosíntesis. ....	15
II.4.2 Mecanismo de acción.....	17
II.4.3. Toxicidad .....	20
II.4.4 Aplicación de nisina en productos lácteos .....	20
II.5 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	21
II.5.1 Brotes asociados al consumo de queso por <i>L. monocytogenes</i> .....	22
II.6 Microencapsulación.....	24
II.6.1 Secado por aspersion.....	27
II.7 Probióticos .....	28
II.7.1 Bacterias probióticas .....	28
II.7.2 Productos lácteos y probióticos .....	29
III. JUSTIFICACIÓN .....	30
IV. OBJETIVOS .....	31
V. HIPÓTESIS .....	32
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	33
VI.1 Cepas microbianas, antimicrobianos y materiales de pared .....	33
VI.2 Soluciones y medios de cultivo .....	33
VI.3 Producción de nisina a nivel biorreactor.....	36
VI.4 Secado y microencapsulación de nisina. ....	36
VI.5 Microencapsulación de <i>L. lactis</i> UQ2 .....	37
VI.5.1 Activación de <i>L. Lactis</i> UQ2 para microencapsulación .....	37

VI.5.2	Recuperación del cultivo.....	38
VI.5.3	Preparación del agente encapsulante .....	38
VI.5.4	Secado por aspersión.....	38
VI.5.5	Estudio de la estabilidad del microencapsulado de <i>L. lactis</i> UQ2.....	39
VI.6	Morfología de las microcápsulas de <i>L. lactis</i> UQ2 .....	39
VI.7	Elaboración de queso tipo Panela con el cultivo protector, nisina y <i>L. monocytogenes</i> EGDe.....	39
VI.7.1	Cuantificación de <i>L. lactis</i> UQ2 en queso.....	40
VI.7.2	Cuantificación de <i>L. monocytogenes</i> EGDe en queso.....	41
VI.7.3	Cuantificación de nisina en queso .....	41
VI.8	Visualización por microscopía de epifluorescencia del queso control y los tratamientos.....	43
VI.9	Digestión simulada.....	43
VI.9.1	Digestión simulada en células libres de <i>L. lactis</i> UQ2 .....	43
VI.9.2	Digestión simulada del queso con <i>Lactococcus lactis</i> UQ2.....	44
VI.10	Análisis sensorial del queso tipo panela adicionado con nisina y <i>L. lactis</i> UQ2 microencapsuladas.....	44
VII.	Resultados y discusión.....	45
VII.1	Fermentación con la cepa nativa de <i>L. lactis</i> UQ2.....	45
VII.2	Fermentación con la cepa transformada de <i>L. lactis</i> UQ2 .....	47
VII.3	Microencapsulación de nisina.....	50
VII.4	Microencapsulación de la cepa transformada de <i>Lactococcus lactis</i> UQ2 .....	52
VII.5	Estudio de la estabilidad de <i>L. lactis</i> UQ2 microencapsulado.....	55
VII.6	Morfología de las microcápsulas de <i>L. lactis</i> UQ2 .....	56
VII.7	Elaboración de queso tipo Panela adicionado con <i>Lactococcus lactis</i> UQ2 y nisina y su efecto en <i>Listeria monocytogenes</i> EGDe.....	57
VII.8	Visualización por microscopía de epifluorescencia del queso inoculado con <i>L. monocytogenes</i> EGDe .....	67
VII.9	Digestión simulada de las células libres.....	68
VII.10	Digestión simulada del queso adicionado con la cepa microencapsulada de <i>L. lactis</i> UQ2.....	72
VII.11	Análisis sensorial del queso Tipo Panela adicionado con la cepa microencapsulada de <i>L. lactis</i> UQ2.....	75
VIII	CONCLUSIONES.....	77
IX	LITERATURA CITADA.....	78



## INDICE DE FIGURAS

1. Estructura de la nisina (Chatterjee <i>et al.</i> , 2005). .....	12
2. Estructura y función del lípido II (Hsu <i>et al.</i> , 2002). .....	14
3. Síntesis y regulación de la biosíntesis de nisina (Chaterjee <i>et al.</i> , 2005). ....	16
4. Síntesis de la nisina (Xie <i>et al.</i> , 2004). .....	17
5. Modo de acción de la nisina (Breukink y de Kruijff, 2006).....	20
6. Procedimiento de activación de la cepa de <i>L. lactis</i> UQ2.....	37
7. Técnica viabilidad de <i>L. lactis</i> UQ2 por la técnica de Miles-Misra. ....	41
8. Actividad de nisina y crecimiento de <i>L. lactis</i> UQ2 durante la fermentación	45
9. Producción de nisina por <i>L. lactis</i> UQ2, pH, temperatura constante, se muestra el porcentaje de oxígeno disuelto durante la fermentación .....	47
10. Actividad de nisina y población de <i>L. lactis</i> UQ2 durante la fermentación .	49
11. Crecimiento de <i>L. lactis</i> nativa y modificada y actividad de nisina .....	50
12. Viabilidad de <i>L. lactis</i> UQ2 microencapsulado en un periodo de 80 días de almacenamiento a 4°C. ....	56
13. Microscopia electrónica de barrido de las microcápsulas de <i>L. lactis</i> UQ2 obtenidas mediante secado por aspersion. ....	57
14. a) Quesos tratamiento T1 y T2: <i>L. lactis</i> UQ2 y <i>L. monocytogenes</i> EGDe almacenados durante 21 días y b) Producción de nisina en T1. ....	59
15. a) Poblaciones de <i>L. lactis</i> UQ2 y <i>L. monocytogenes</i> EGDe en el queso T4 con ambas bacterias y b) producción de nisina.....	60
16. a) Poblaciones de <i>L. lactis</i> UQ2 y <i>L. monocytogenes</i> EGDe y b) producción de nisina en queso T5. ....	61
17. Población de <i>L. lactis</i> UQ2 en los quesos T1, T3, T4 y T5 almacenados durante 21 días a 4 °C.....	62
18. Población de <i>L. monocytogenes</i> EGDe en los quesos T2, T4 y T5 durante los 21 días de almacenamiento a 4 °C .....	63
19. Producción de nisina en los quesos T1, T3, T4 y T5 almacenados durante 21 días a 4°C.....	64

20. Crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> EGDe en los queso T2, T6 y T7 usando nisina comercial y nisina microencapsulada producida por <i>L. lactis</i> UQ2 .....	65
21. Micrografías con microscopio de fluorescencia del queso inoculado con <i>L. monocytogenes</i> EGDe. a) queso control T2 <i>L. monocytogenes</i> b) queso T4 <i>L. lactis</i> UQ2 y <i>L. monocytogenes</i> c) queso T5 <i>L. lactis</i> UQ2, nisina y <i>L. monocytogenes</i> d) queso T6 nisina y <i>L. monocytogenes</i> .....	68
22. Sobrevivencia de <i>L. lactis</i> UQ2 en células libres a la exposición a condiciones gástricas e intestinales simuladas. ....	70
23. Sobrevivencia de <i>L. lactis</i> UQ2 en queso expuesto a condiciones gástricas e intestinales simuladas. ....	74
24. Características evaluadas en el análisis sensorial del queso en una escala hedónica de 10 puntos. ....	75

## ÍNDICE DE CUADROS

1. Parámetros óptimos de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> . (Mead <i>et al.</i> , 2006). .....	21
2. Parámetros de sobrevivencia de <i>L. monocytogenes</i> (Mead <i>et al.</i> , 2006). ....	22
3. Materiales usados como pared para la microencapsulación (Pedroza <i>et al.</i> , 2002). .....	26
4. Población de <i>L. lactis</i> UQ2 y actividad de nisina .....	46
5. Población de <i>L. lactis</i> UQ2 transformada y actividad de nisina .....	48
6. Resultados de la microencapsulación de nisina usando diferentes temperaturas de entrada y de salida. ....	51
7. Resultados de la microencapsulación de <i>L. lactis</i> UQ2, en base a temperatura de entrada, temperatura de salida y porcentaje de alimentación. ....	53
8. Población de <i>L. lactis</i> UQ2, <i>L. monocytogenes</i> EGDe y concentración de nisina en los quesos. ....	58
9. Digestión simulada en células libres de <i>L. lactis</i> UQ2 a pH 2. ....	69
10. Digestión simulada en células libres de <i>L. lactis</i> UQ2 a pH 3. ....	70

## I. INTRODUCCIÓN

El queso tipo panela es un queso fresco que ocupa el primer lugar de consumo en México y Latinoamérica con un estimado de 45,000 toneladas anuales en México, pero por sus características fisicoquímicas en especial por su alta humedad y actividad de agua es muy susceptible a ser contaminado por microorganismos patógenos y deterioradores.

Entre estos patógenos se destaca *Listeria monocytogenes*, una de las bacterias Gram positiva que se le ha dado mucha importancia por su alta letalidad y resistencia en gran variedad de ambientes como: temperaturas de refrigeración, pH bajo, y altas concentraciones de sal.

Para combatir ésta y otras bacterias se han usado diversos métodos de conservación de alimentos, como tratamientos térmicos, uso de aditivos, uso de empaques bioactivos entre otros, pero actualmente los consumidores se preocupan por el uso de aditivos químicos y ha aumentado la preferencia por el uso de conservadores naturales.

La bioconservación ha venido a representar una opción muy atractiva para la conservación de alimentos, y es ampliamente utilizada en países en desarrollo, donde la refrigeración es limitada por su costo y disponibilidad. La bioconservación implica el uso de bacterias en especial BAL y/o sus metabolitos como medio de protección de los alimentos.

Entre las bacterias más utilizadas en la bioconservación se encuentra *Lactococcus lactis*, que es una cepa capaz de producir compuestos antimicrobianos como ácidos orgánicos, diacetilo, peróxido de hidrógeno, CO<sub>2</sub> y bacteriocinas, entre ellas la más importante es la nisina. La nisina es una bacteriocina utilizada durante décadas por su poder antimicrobiano. Su mecanismo dual es muy eficiente a nivel nanomolar, inicialmente tiene una gran afinidad por lípido II que es un compuesto clave en la formación de la pared celular, posteriormente se forma un complejo nisina-lípido II que induce

la formación de poros en la membrana. La nisina actúa como un agente desacoplador causando un desbalance en la fuerza protón-motriz que puede ocasionar la muerte de la bacteria.

En el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Química se aisló la cepa de *Lactococcus lactis* UQ2, que fue posteriormente modificada por conjugación para favorecer su desarrollo en leche, la cepa resultante *L. lactis*UQ2 rif L<sup>+</sup> muestra un buen crecimiento en leche y sintetiza la bacteriocina genéticamente identificada como nisina A.

En este trabajo se tiene como objetivo la producción de la nisina usando la cepa *L. lactis*UQ2, a nivel biorreactor, posteriormente realizar su microencapsulación para incorporarla al queso tipo panela en combinación con la cepa microencapsulada.

## II. REVISION DE LA LITERATURA

### II. 1 Productos lácteos.

En la sociedad moderna, ha habido un incremento en productos libre de aditivos, y la industria de los alimentos se ha enfocado en investigar técnicas novedosas y alternativas de conservación de alimentos, con el objetivo de mantener la calidad y seguridad de sus productos (Cosentino, 2012).

La demanda del consumidor se enfoca en productos naturales, con apariencia y sabor fresco, fácil de consumir y seguros. Los compuestos naturales han sido explotados por años por su efecto contra microorganismos deterioradores y patógenos (Sobrino-López *et al.*, 2008).

En la microflora natural presente en productos lácteos fermentados se han podido encontrar algunas cepas con la habilidad de producir nuevos compuestos de aroma, diferentes a los producidos por cultivos iniciadores comerciales. De hecho algunas características de sabor solo se llegan a observar en productos lácteos artesanales y se detectan en muy bajas cantidades en quesos procesados industrialmente (Centeno *et al.*, 2002).

#### II.1.2 Queso

El queso se define como un producto elaborado de la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida de la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior, por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado.

Quesos frescos, son aquellos que además de cumplir con la descripción general de queso se caracterizan por su alto contenido de humedad, y por no tener corteza o tener corteza muy fina, pudiendo o no adicionarles aditivos e ingredientes opcionales (NOM-243-SSA1-2010).

La calidad del queso está determinada por su sabor, aroma, propiedades reológicas y su apariencia visual (Garde *et al.*, 2007). El sabor es el más importante parámetro para el consumidor de aceptación y comercialización (Carunchia *et al.*, 2005).

Algunas cepas de *L. lactis* productoras de bacteriocinas han sido evaluadas en la manufactura de diferentes variedades de queso. Seguido de su adición el microorganismo comienza su actividad peptidolítica y de transaminación, que son factores claves en la formación de compuestos de aroma y sabor (Alegría *et al.*, 2010).

El queso panela es un queso fresco, de pasta blanda, autoprensado elaborado con leche pasteurizada de vaca (ocasionalmente de vaca/cabra), entera, parcialmente descremada. Como todos los quesos frescos mexicanos su composición incluye un porcentaje elevado de agua (hasta 58%) y por ello es altamente perecedero, de ahí que tiene que conservarse bajo refrigeración desde el momento de su elaboración (Cervantes *et al.*, 2006).

Uno de los rasgos característicos de este queso es el moldeo de la cuajada que se efectúa en típicos cestos o canastos de mimbre, palma o carrizo (aunque actualmente ya se hace también en cestos de plástico, u otros moldes) en donde adquiere su forma característica por autoprensado durante varias horas. Durante esta fase las piezas se voltean varias veces (Cervantes *et al.*, 2006).

En 2012 hubo una producción de aproximadamente 90, 000 toneladas de queso fresco del cual la mitad fue queso panela, lo que lo hace el queso más consumido en México (Boletín de la leche, 2013).

## **II.2 Barreras múltiples**

La tecnología de barreras múltiples también llamada, métodos combinados, procesos combinados, o tecnología de barreras, busca mediante una 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, entre otras.

El concepto de barreras múltiples se ha aplicado en una gran variedad de alimentos; frutas, verduras, productos de panadería, lácteos, pescado, entre otros. Varios factores para conservar los alimentos se siguen estudiando e implementando como al producción de bacteriocinas, el uso de empaques activos, altas presiones, tratando de mantener la vida de anaquel del alimento por un periodo mucho más largo. La aplicación de este concepto ha sido muy exitosa, ya que el uso de barreras múltiples en el alimento logra la estabilidad microbiana y seguridad del consumidor (Leistner y Gorris, 1995).

En países en vías de desarrollo este tipo de tecnologías son aplicadas con particular interés, principalmente en alimentos frescos y mínimamente procesados. El efecto de barrera nos indica que un alimento es estable y seguro, si estas barreras no son sobrepasadas por los microorganismos presentes. A partir de la comprensión del efecto de barrera se han desarrollado las tecnologías de barreras antimicrobianas (Leistner, 2001)

### **II.2.1 Bioconservación**

La industria tiene la alternativa de emplear conservadores biológicos o bioconservadores, para satisfacer el interés de los consumidores para obtener alimentos inocuos y naturales, es decir, elaborados con estricto control de calidad sanitaria y sin la adición de aditivos químicos (Devlieghere *et al.*, 2004).

Entre las alternativas de las tecnologías de conservación de alimentos, se ha puesto particular atención a la bioconservación para extender la vida de anaquel y para mejorar la calidad microbiológica, minimizando el impacto en las propiedades nutricionales y organolépticas de los alimentos (García *et al.*, 2010).

La bioconservación se refiere a la extensión de la vida de anaquel y el mejoramiento de la seguridad alimentaria usando microorganismos y/o sus metabolitos (Settanni y Moschetti, 2010). La bioconservación explota racionalmente el potencial antimicrobiano de los microorganismos naturalmente



presentes en el alimento y/o sus metabolitos con un largo historial de uso seguro (García *et al.*, 2010).

Se consideran cultivos protectores a los microorganismos que confieren factores de seguridad adicionales que resultan en la estabilidad microbiológica del alimento, reduciendo el riesgo de desarrollo de microorganismos patógenos o deterioradores. El desarrollo de BAL por sí mismas determina la inhibición de microorganismos indeseables, sin embargo, su habilidad de producir bacteriocinas es de importancia básica en las estrategias de conservación biológica de alimentos (Settanni y Moschetti, 2010).

La incorporación de bacterias productoras de bacteriocinas en la manufactura de alimentos fermentados provee una económica y atractiva alternativa a la adición de bacteriocinas purificadas (Alegría *et al.*, 2010).

#### **II.2.1.1. Bacterias ácido lácticas**

Las bacterias ácido-lácticas son microorganismos Gram-positivos, muy heterogéneos desde el punto de vista morfológico y fisiológico, y cuya característica principal es la producción de ácido láctico como producto mayoritario de un metabolismo fermentativo de los carbohidratos. En general, las BAL son microorganismos de morfología bacilar o cocoide, no esporulados, microaerófilos o anaerobios facultativos. Actualmente, el grupo de las BAL comprende microorganismos de los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloio-coccus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Cintas *et al.*, 2001; Rojas y Vargas, 2008).

Las BAL pueden crecer en medio de cultivos alternativos sin perder su habilidad para producir una gran variedad de metabolitos antimicrobianos, incluyendo bacteriocinas (Guerra y Pastrana, 2002)

Las BAL son parte autóctona de la microbiota de la leche y productos lácteos (Franciosi *et al.*, 2009) y son capaces de producir el mayor número de sustancias con actividad antimicrobiana, como ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, diacetilo, CO<sub>2</sub>, y bacteriocinas (Deegan *et al.*, 2006). La principal

función de las BAL en la elaboración de productos lácteos fermentados es la descomposición de la lactosa a ácido láctico, generación de sabor, y en el caso del queso, la modificación de la textura (Morales *et al.*, 2003).

La adición de BAL como cultivos adjuntos en la manufactura de queso incrementa el nivel de aminoácidos libres, péptidos, y ácidos grasos libres, asociados a la intensidad de sabor y compuestos de aroma (Leroy y De Vuyst, 2004).

En una amplia variedad de quesos, las bacterias ácido lácticas contribuyen al sabor mediante la acción de las células vivas y, cuando ocurre lisis, mediante la liberación de material intracelular que incluye enzimas como peptidasas y enzimas catalíticas a la matriz del queso (Garde *et al.*, 2007).

El uso de cultivos adjuntos productores de bacteriocinas ha demostrado un desarrollo más rápido de la intensidad de sabor (Garde *et al.*, 2007). Existen reportes del aislamiento de BAL de diferentes quesos artesanales con el objetivo de seleccionar cepas específicas para la elaboración de queso industrializado de leche pasteurizada para garantizar un sabor semejante al del queso artesanal elaborado con leche cruda (Gutierrez-Mendez *et al.*, 2008).

El uso de microorganismos y/o sus metabolitos naturales para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y deterioradoras ha aparecido como una herramienta promisorio y también percibido por los consumidores como una conservación de bajo riesgo (Pual *et al.*, 2002).

En particular, las bacterias ácido lácticas han adquirido relevancia considerable en la industria de los alimentos y en la salud pública, desde que son usadas ampliamente en productos fermentados, tienen una larga historia de su uso seguro (Carr *et al.*, 2002).

#### **II.2.1.1.1 *Lactococcus lactis***

Las cepas de *L. lactis* son las principales BAL que constituyen los cultivos iniciadores utilizados en la industria láctea para la manufactura y

maduración de quesos y otros productos lácteos fermentados (Alegría *et al.*, 2010).

*Lactococcus lactis* es una BAL con propiedades bioconservadoras, ya que algunas cepas son capaces de producir nisina, una bacteriocina ampliamente usada en la industria alimentaria y generalmente reconocida como por la FAO (Thomas *et al.*, 2000). Fundamentalmente, el éxito de cualquier estrategia de bioconservación basada en bacteriocinas depende de su eficiencia antimicrobiana *in situ* (Settanni y Corsetti, 2008).

*Lactococcus lactis* UQ2, es una cepa aislada de un queso mexicano, productora de la bacteriocina genéticamente identificada como nisina A (García-Almendárez *et al.*, 2008).

Las bacteriocinas son péptidos sintetizados a nivel ribosomal con actividad antibacteriana dirigida a bacterias relacionadas taxonómicamente (Gram-positivas), mientras que las células productoras son inmunes a sus propias bacteriocinas (Collins *et al.*, 2009).

### **II.3 Bacteriocinas**

Las bacteriocinas son sustancias peptídicas con actividad antimicrobiana, producidas por diferentes cepas bacterianas, resistentes al calor e hidrolizadas por las proteasas gástricas, lo que permite su posible utilización como conservadores naturales de los alimentos. El empleo de productos biológicos como las bacteriocinas para inhibir o destruir a microorganismos patógenos, es un método de gran interés en la industria alimentaria que tiene como objetivo final la obtención de alimentos más seguros para el consumidor (González-Martínez *et al.*, 2003).

Muchos grupos microbianos producen bacteriocinas, que son péptidos y proteínas con actividad bactericida. Las bacteriocinas de algunas bacterias inhiben el crecimiento de bacterias relacionadas taxonómicamente, mientras que otras inhiben un amplio rango de microorganismos, incluidos patógenos transmisibles por alimentos y deterioradores como *Listeria monocytogenes*,

*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium tyrobutyricum* (Gálvez *et al.*, 2008).

Estas sustancias antimicrobianas difieren de los antibióticos tradicionales por su mecanismo de síntesis, modo de acción, espectro antimicrobiano, toxicidad y mecanismos de resistencia. Algunos estudios han demostrado que la aplicación de bacteriocinas en quesos pueden ser una barrera adicional para reducir los niveles de *L. monocytogenes*. Sin embargo, la aplicación directa de bacteriocinas puede resultar en una reducción de la pérdida de la actividad antimicrobiana, por la interacción con los componentes del alimento (Jung *et al.*, 1992; Aasen *et al.*, 2003; Chllet *et al.*, 2008).

Las bacteriocinas son un grupo de péptidos o proteínas son sintetizados ribosomalmente por las bacterias con actividad antimicrobiana. Fueron inicialmente descritas en *Escherichia coli* como colicinas. Así como los péptidos que se sintetizan ribosomalmente, las bacteriocinas son codificadas por un plásmido o un gen estructural que están agrupados en un operon que contiene los entre otros genes codificantes de proteínas que le confieren inmunidad al microorganismo productor (García *et al.*, 2010).

Las bacteriocinas derivadas de BAL en particular tienen un gran rango de aplicaciones como, por ejemplo, como bioconservadores y quizá más interesante, como alternativa para uso médico y veterinario (Cotter *et al.*, 2005).

Hay varios factores que influyen en la producción de bacteriocinas: pH, temperatura, y otras condiciones de crecimiento (Cotter *et al.*, 2005; Rojo-Bezares *et al.*, 2007).

Estos compuestos pueden ser utilizados de tres formas; como aditivos antimicrobianos purificados o semipurificados, como ingredientes en alimentos fermentados o mediante la incorporación del microorganismo productor como cultivo indicador (Sobrino-López *et al.*, 2008).

Estas sustancias con frecuencia actúan frente a las bacterias más estrechamente relacionadas. Sin embargo estudios recientes afirman que también pueden actuar frente a otras especies bacterianas, hongos y algunos parásitos (Eijsink *et al.*, 1998; Cotter *et al.*, 2005; Svetoch *et al.*, 2008).

### **II.3.1 Propiedades bioquímicas.**

Debido a la naturaleza proteica todas las bacteriocinas se inactivan por una o más enzimas proteolíticas, incluyendo a aquellas de origen pancreático (tripsina y  $\alpha$ -quimotripsina) y algunas de origen gástrico, como la pepsina. Esta característica es muy interesante con respecto a la utilización de bacteriocinas en productos alimentarios, puesto que serían inactivadas durante su paso por el tracto intestinal, sin ser absorbidos como compuestos activos y sin causar, por tanto, los riesgos relacionados con el uso de antibióticos (Lloyd y Drake, 1975).

La termotolerancia de las bacteriocinas de las BAL es generalmente elevada y parece estar relacionada con su estructura molecular, normalmente compuesta por péptidos pequeños que no presentan estructura terciaria. Por otro lado, algunas bacteriocinas son termolábiles, poseen una estructura más compleja. La termoresistencia generalizada de las bacteriocinas permite que permanezcan activas después de tratamientos térmicos equivalentes a la pasteurización de la leche (63 °C, 30 min; 72 °C, 15 s) lo que supondría una ventaja adicional en productos pasteurizados. Las bacteriocinas son generalmente estables al pH ácido o neutro. La máxima solubilidad y estabilidad de la nisina A es pH 2.0, disminuyendo estas propiedades conforme aumenta el pH. La estabilidad a pH ácido o neutro de las bacteriocinas indica una adaptación al entorno natural de las bacterias que las producen (Piard y Desmazeaud, 1992).

### **II.3.2 Producción de bacteriocinas**

Las BAL son microorganismos nutricionalmente muy exigentes y sus bacteriocinas normalmente se producen en medios de cultivo complejos pero crecen bien en leche y otros compuestos orgánicos (Pongtharangkul y Demirci, 2006). Aun cuando los medios de cultivo tradicionales promueven un elevado crecimiento y una relativamente alta concentración de la bacteriocina, sus

elevados costos los hacen inadecuados para producción a gran escala (de Arauz *et al.* 2008), además de que se dificulta la purificación de la bacteriocina debido a la acumulación de altas concentraciones de nitrógeno, especialmente proteínas y péptidos (González, 2009).

Uno de los inconvenientes que tiene el uso de nisina como aditivo en alimentos es su elevado costo como materia prima, por lo que la utilización de cultivos microbianos productores de bacteriocinas, puede ser una alternativa prominente para mejorar localización e inocuidad de los alimentos manteniendo bajos costos de producción (Castro, 2009).

Para que las bacteriocinas presenten una aplicación comercial efectiva, es necesario obtener mayores rendimientos en su producción, modificando las condiciones de crecimiento o por regulación genética. La producción de bacteriocinas puede incrementarse, bajo ciertas condiciones de crecimiento, como la temperatura, el pH y el tiempo de incubación, así como también la composición del medio de cultivo, influyen fuertemente en el rendimiento de las bacteriocinas (De Vuyst, 1995).

Se ha reportado que algunos materiales más económicos como el suero de leche y otros desechos industriales orgánicos sirven como medios de cultivo para la producción de bacteriocinas (de Arauz y *et al.*, 2008). Otros autores han utilizado leche para lograr la expresión de la nisina por *L. lactis* encontrando que este medio de cultivo permite el crecimiento del microorganismo así como la expresión de la bacteriocina (Jozala *et al.*, 2005).

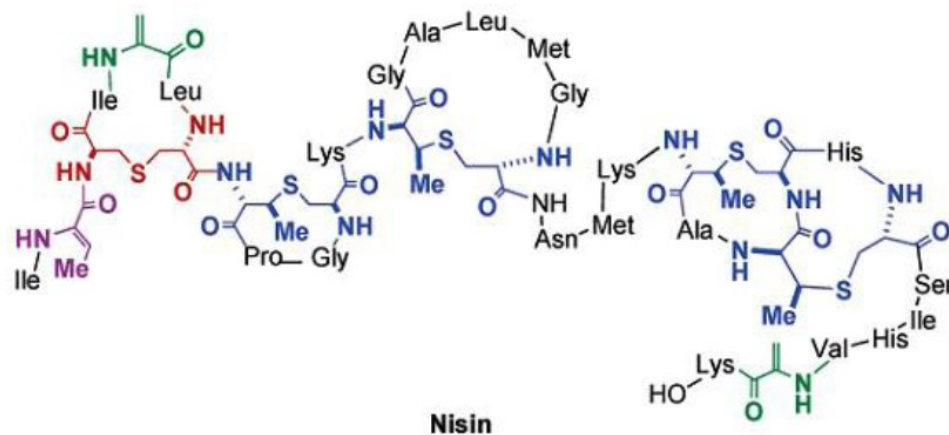
Se ha demostrado que la adición de algunos azúcares simples (sacarosa, glucosa, manitol) y extracto de levadura, al medio de cultivo así como la concentración de algunos iones, el pH y la temperatura del medio, la fuerza iónica y el potencial de óxido reducción, influyen en la producción de bacteriocinas como sakacina, sugiriendo que la presencia de las moléculas de NaCl interfieren con la unión del receptor con la molécula del microorganismo antagonista, reduciendo la actividad antimicrobiana.

Otras investigaciones en las cuales se ha incrementado el rendimiento en la producción de bacteriocinas, suplementando los medios de cultivo preparados comercialmente, tales como APT, el MS, MS10, suplementando estos medios de cultivo con componentes como peptonas, extracto de carne, extracto de levadura y  $MgSO_4$  (Kim, 1997), así como el medio comercial más utilizado el MRS el cual se suplementa con diferentes fuentes de nitrógeno (Leroy y De Vuyst, 1999).

#### II.4 Nisina

Es la primera bacteriocina aislada de *L. lactis*, un antibiótico compuesto de 34 aminoácidos, tiene una masa molar de 3.4 kDa. Actualmente está aprobada y utilizada en cerca de cincuenta países como aditivo alimentario. A la fecha, se ha identificado cinco variantes naturales de la nisina; A, Z, Q, U y F (Alegría *et al.*, 2010).

La nisina es un péptido antimicrobiano que pertenece a la clase de los antibióticos (clase I) y ha sido empleado como conservador de alimentos en alrededor de 50 países (Cotter *et al.*, 2005).



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

La nisina, descrita en 1928, fue la primer bacteriocina aislada a partir de la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis subs. lactis*. Es la bacteriocina mejor caracterizada y es utilizada como conservador de alimentos; es la única reconocida por la FDA con la categoría GRAS (Generally Recognized As

Safe). Se produce de forma natural en algunos productos lácteos y se utiliza en la producción de alimentos y como un aditivo en productos lácteos para prevenir el crecimiento de bacterias Gram positivas, especialmente de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria* (Maldonado y Llanca, 2007).

También es la bacteriocina que tiene el historial más largo de uso seguro en alimentación y la que ha sido más estudiada. En 1953 se comercializó por primera vez en Inglaterra, en 1969 se aprobó su uso en alimentación por la OMS (Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives) y en 1983 se incluyó en la lista de aditivos de la Unión Europea; poco después, en 1988, fue aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) (Cotter *et al.*, 2005).

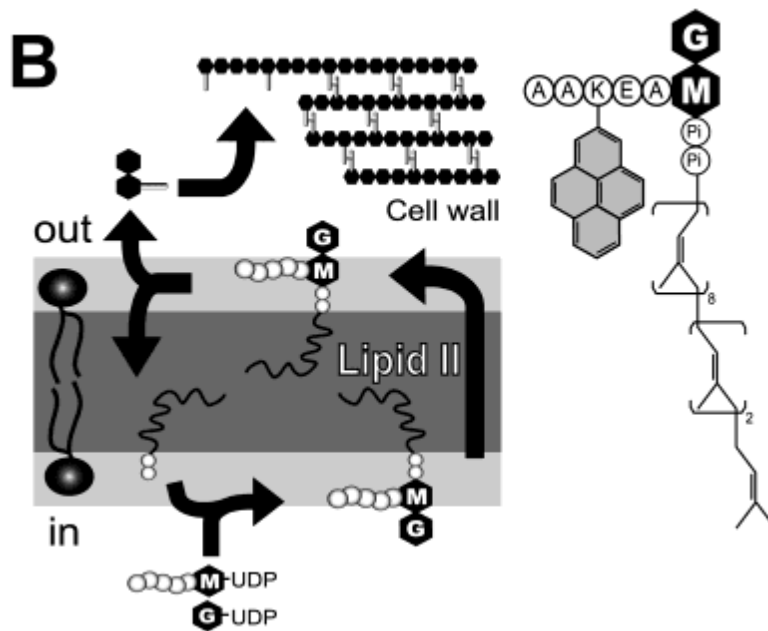
Los lantibioticos, incluyendo nisina, pueden tener múltiples mecanismos de acción, facilitado por la unión con el lípido II y la inserción dentro de la membrana de la bacteria (Brotz *et al.*, 1998). Los lantibioticos son caracterizados por la presencia de residuos de aminoácidos inusuales, incluyendo la lantioninas las cuales le dan el nombre a estos péptidos (Chatterjee *et al.*, 2005).

Tiene una alta estabilidad a bajo pH, y exhibe una toxicidad selectiva, la cual es altamente efectiva (a concentraciones nanomolares) contra bacterias sensibles. Por su alta estabilidad en diferentes ambientes y baja toxicidad en humanos, la nisina ha sido usada por décadas como conservador de alimentos (Delves-Broughton *et al.*, 1996).

La solubilidad de la nisina A aumenta con la temperatura y al disminuir el pH. Se ha demostrado que la nisina es rápidamente inactivada en el intestino por las enzimas digestivas y no puede detectarse en la saliva de humanos diez min después de haber consumido un líquido que la contenga (Simova *et al.*, 2006).



La nisina, es un péptido formador de poros, que usa un objetivo específico, llamado, lípido II. Este péptido está presente en todas la membranas de las bacterias (Brotz *et al*, 1998), el cual está involucrado en transportar subunidades de peptidoglicano (van Heijenoort, 1994). Cuando la nisina se une al lípido II, esta permeabiliza la membrana por la formación de poros, lo cual causa el colapso de la fuerza protón motriz. Adicionalmente, esta unión interfiere con la síntesis de la pared celular. La nisina contiene cinco anillos denominados como A-E, su mecanismo involucra los tres primeros anillos A-C y el ácido N-acetilmurámico así como el pirofosfato del Lípido II (Hsu *et al.*, 2002).



**Figura 2.** Estructura y función del lípido II (Hsu *et al.*, 2002).

Esta bacteriocina es comercialmente usada como un agente natural de bioconservación de alimentos y es considerada segura por la FDA, dado que no es toxica y sus aminoácidos se metabolizan junto con los procedentes de otras proteínas (García- Parra *et al.*, 2009).

Es capaz de prevenir el crecimiento de microorganismos Gram-positivos, pero una de las limitaciones de su uso es su alto costo. El empleo de cultivos iniciadores productores de bacteriocinas, representa una alternativa para la elaboración de quesos con mejor calidad microbiológica (Castro *et al.*, 2009).

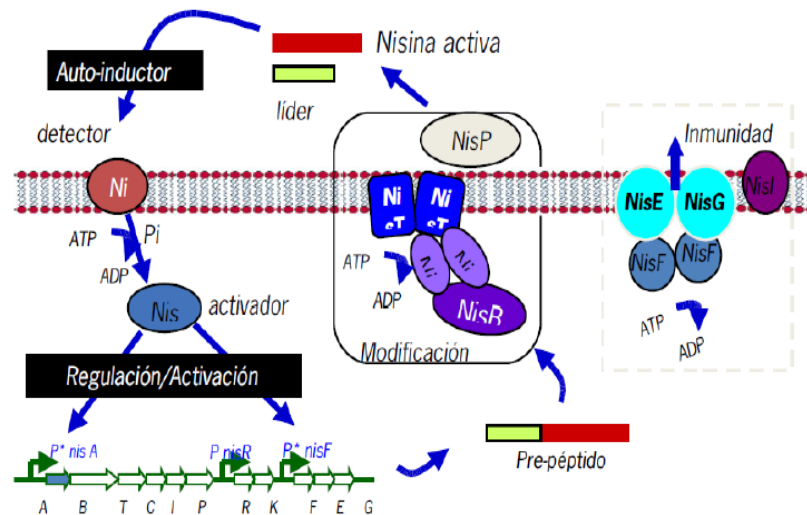
La nisina se usa comercialmente en una forma parcialmente purificada, en forma de ingrediente cultivando la cepa productora en diversos medios de cultivos, o bien el uso de la cepa productora como cultivo en alimentos fermentados y es la única bacteriocina disponible comercialmente para agregarse a los alimentos, por lo que su demanda se ha incrementado en los últimos años (González, 2009).

Este agente antimicrobiano también puede ser adicionado a formulaciones alimentarias directamente o mediante su incorporación en los materiales de empaque, convirtiéndolos en empaques activos (Jin y Zhang, 2008). Otros usos de la nisina incluyen su aplicación en productos de cuidado dental, productos farmacéuticos para controlar úlceras estomacales o tratamiento de infecciones de colon (Jozala *et al.*, 2007).

#### **II.4.1. Biosíntesis.**

Los lantibióticos constituyen una familia de péptidos de los cuales el precursor es sintetizado ribosomalmente seguido por modificaciones postraduccionales. Estas modificaciones incluyen la introducción de estructuras insaturadas poco comunes como dehidroalanina, dehidrobutirina, y la formación del típico enlace tioéster intracelular llamado lantionina. Dichas estructuras están formadas de un derivado de cisteína, de un grupo sulfhídrico para el doble enlace y de un residuo deshidratado, dando origen a las características policíclicas estructurales propias de los lantibióticos (Willey y van der Donk, 2007).

La producción de nisina por *Lactococcus lactis* está regulada por un mecanismo denominado percepción en *quórum* (*Quorum sensing*) a nivel transcripcional en el que la nisina actúa como una molécula inductora (Pongtharangkul y Demirci, 2006). Este proceso permite a los microorganismos monitorear el ambiente de otras bacterias y alterar el comportamiento de una población, de este modo la información es integrada, procesada y traducida para controlar la expresión genética (Waters y Bassler, 2005).



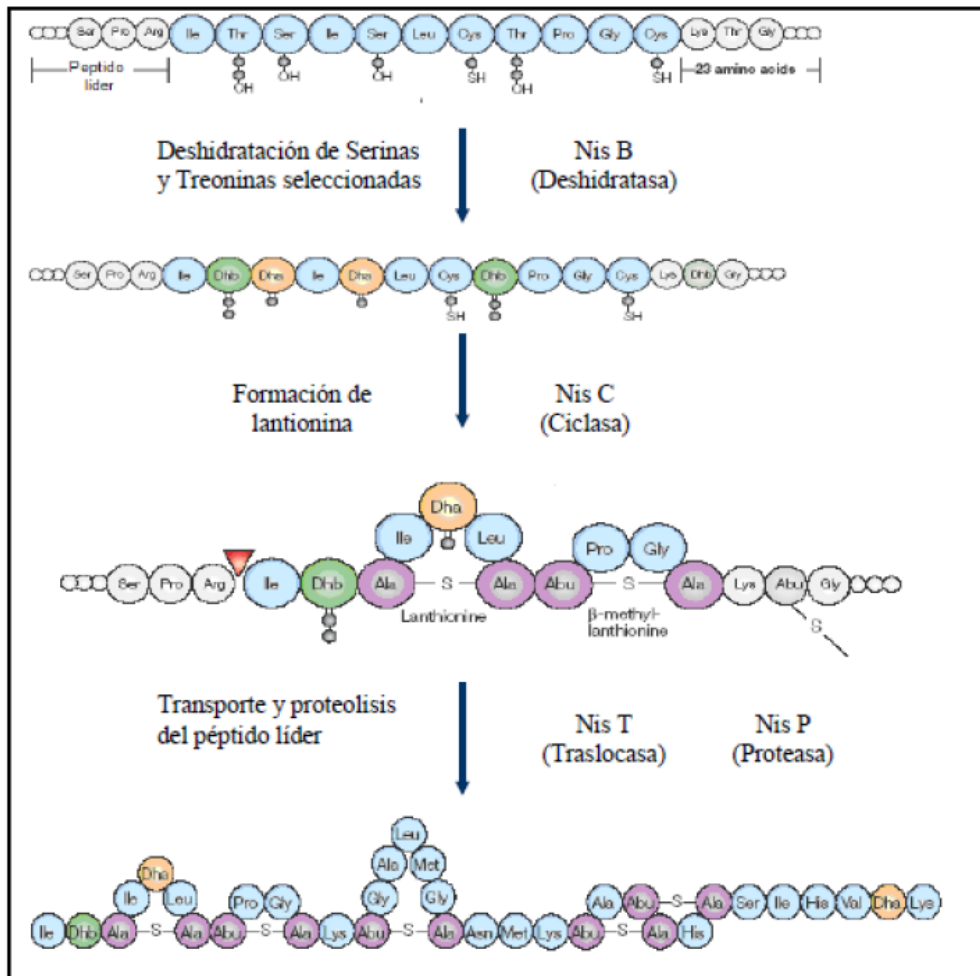
**Figura 3.** Síntesis y regulación de la biosíntesis de nisina (Chaterjee et al., 2005).

El fenómeno de la percepción en *quórum* ha sido identificado en bacterias Gram-negativas, donde la molécula comunicadora es la N-acil-homoserina-lactona (AHL) (García, 2009). Se sabe que muchos de los procesos de bacterias Gram-positivas son regulados de manera dependiente respecto a la densidad celular. Ejemplos de estos sistemas de percepción en *quórum* son diversas funciones celulares; esporulación, formación de biopelículas, simbiosis, transferencia de plásmidos conjugativos, regulación de la virulencia. Toda la maquinaria biosintética para la producción de nisina se encuentra localizada en un transposón de 70 kb que también contiene los determinantes de la utilización de sacarosa (Horn *et al.*, 1991).

En este proceso regulatorio, el grupo fosforilo de NisK, la proteína sensora, se transfiere a un aspartato de NisR, la reguladora de respuesta, lo cual inicia su enlazamiento a los operones *nisA* y *nisF*. Esto activa la transcripción del operon *nisABTCIP*, para la biosíntesis de nisina, y del *nisFEG*, para la autoinmunidad (González, 2009).

En la biosíntesis de la nisina (Figura 3), el gen estructural codifica para un prepeptido de 57 aminoácidos que presenta un péptido señal, necesario para la correcta biosíntesis y secreción de la nisina. Las proteínas NisB y NisC

son las enzimas responsables de las reacciones de deshidratación y de la formación de los puentes de tioéter, respectivamente. NisT es el transportador que reconoce al péptido señal, éste es liberado por acción de la serín proteasa NisP, que tiene la secuencia consenso LPXTGX (donde X representa cualquier aminoácido) de unión covalente al peptidoglicano en su extremo carboxilo. Éste sería el último paso en la biosíntesis de la nisina necesario para la liberación de la nisina madura al medio de cultivo (Willey y van der Donk, 2007).



**Figura 4.** Síntesis de la nisina (Xie et al., 2004).

#### II.4.2 Mecanismo de acción

Se ha demostrado que en bacterias Gram-positivas la nisina actúa a nivel de la membrana perturbando la movilidad iónica, inhibiendo la captación de aminoácidos y causando liberación de aminoácidos acumulados (Gujarathi *et al.*, 2008). La membrana citoplasmática de la célula bacteriana es el primer

objetivo de la actividad de la nisina. Se ha visto que este lantibiótico se asocia a liposomas no energizados con la mayor interacción observada con fosfolípidos cargados negativamente. Esto indica que la asociación inicial de éste péptido cargado positivamente con la membrana es en parte dependiente de la carga (Gujarathi *et al.*, 2008).

La acumulación de nisina en la monocapa externa de lípidos de la membrana, conduce a la agregación de nisina en monómeros, seguido de la formación de estructuras porosas de corta duración. La relajación de dichas estructuras permite la translocación de los péptidos a través de la bicapa lipídica (Breukink y de Kruijff, 2006). Otro mecanismo de acción de la nisina consiste en un mecanismo mucho más eficiente que depende del enlazamiento del precursor del peptidoglicano, el Lípido II, con la consecuente formación de poros. El lípido II y la nisina forman un poro híbrido, compuesto de ocho moléculas de nisina y cuatro moléculas de lípido II (Figura 4), lo cual causa pérdida de pequeños componentes citoplasmáticos como aminoácidos y ATP. Además, se colapsa el gradiente de iones, lo cual causa un desbalance del gradiente de pH y de la fuerza protón motriz (Lubelski *et al.*, 2007).

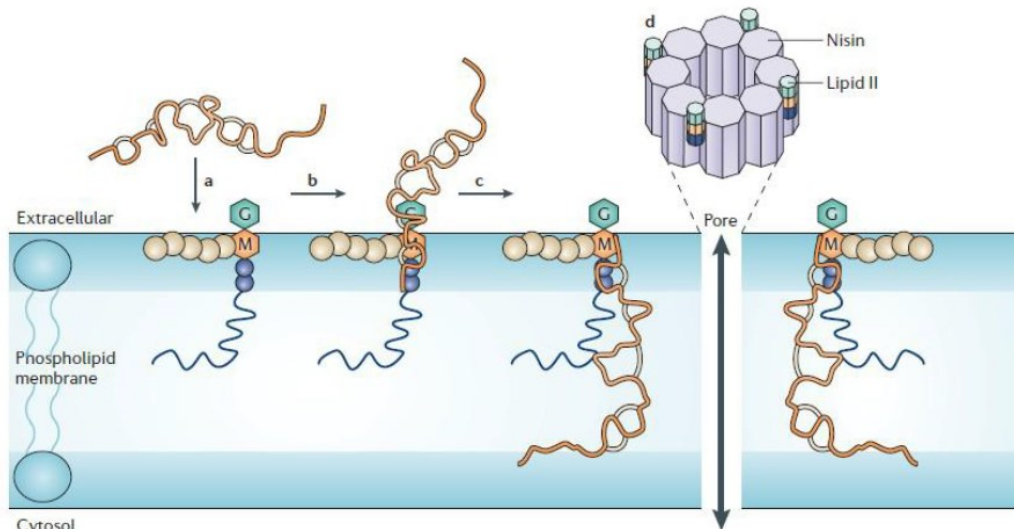
La formación de poros ocasiona pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana provocando la disipación, total o parcial, de la fuerza protón motriz (PMF) causando muerte celular (Moll *et al.*, 1999). La PMF es un gradiente electroquímico generado por la expulsión de protones necesaria para llevar a cabo ciertas funciones celulares dependientes de energía como la síntesis de ATP. Consta de dos componentes: el potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ , negativo en el interior) y un gradiente de pH ( $\Delta\text{pH}$ , alcalino en el interior). La nisina disipa tanto el  $\Delta\Psi$  como el  $\Delta\text{pH}$  (Molly *et al.*, 1996).

El espectro antimicrobiano incluye microorganismos deterioradores y patógenos de alimentos principalmente bacterias Gram-positivas como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. Se ha encontrado actividad contra bacterias Gram-negativas como *E. coli* y *Salmonella* pero solo cuando ha sido comprometida la integridad de la membrana externa, por ejemplo, por un choque osmótico o un tratamiento a bajo pH, o con agentes quelantes como

EDTA (de Vuyst y Leroy, 2007). Estudios recientes han mostrado que la nisina es capaz de inhibir la germinación de esporas de especies de *Bacillus* y *Clostridium*, esto podría deberse a una modificación covalente de la molécula blanco, presente en el recubrimiento de la espora, mediante un ataque nucleofílico al residuo de la dehidro-alanina, la cual se encuentra en la posición 5 (Dha-5) (Chatterjee *et al.*, 2005).

La pared celular bacteriana está formada por un heteropolímero de los mucopolisacáridos, N-acetilglucosamina (GlcNac), y por ácido N-acetilmurámico (MurNac). Las cadenas de estos polímeros se encuentran entrecruzadas por un pentapéptido típico con la secuencia L-alanil-γ-D-glutamildiaminopimelil (o L-lisil)-D-alanil-D-alanina, el cual está acoplado al ácido N-acetilmurámico (MurNac) (García, 2009). Este entrecruzamiento es lo que le confiere a la célula su rigidez y fuerza mecánica. El ensamblaje de estas subunidades comienza en el lado citoplasmático de la membrana celular, donde la cadena pentapéptido-UDP-MurNac se acopla al bactoprenil-fosfato para obtener el Lípido II. Posteriormente el acoplamiento del azúcar N-acetilglucosamina (GlcNac) por la proteína periférica MurG, asociada a la membrana, produce el Lípido II, el cual contiene la sub-unidad completa del peptidoglicano, unida vía un pirofosfato al ancla poliisoprenoide embebida en la membrana (García, 2009).

El Lípido II es posteriormente trasladado hacia el exterior de la membrana (espacio periplasmático). Existe un reconocimiento y unión específica al lípido II, seguida de un ensamblaje y la formación del poro (Figura 4) (García, 2009). En presencia del Lípido II, la actividad de la nisina no depende ni de la composición de lípidos presentes en la membrana, ni de la cantidad de lípidos aniónicos en un rango amplio de concentraciones de nisina. Se ha demostrado que, en presencia de Lípido II, la nisina adquiere una orientación transmembranal menos variable, lo que da lugar a poros más estables que aquellos formados en ausencia de dicho receptor (Breukink *et al.*, 2006).



**Figura 5.** Modo de acción de la nisina (Breukink y de Kruijff, 2006)

### II.4.3. Toxicidad

La nisina ingerida es destruida rápidamente durante la digestión y sus aminoácidos constituyentes se metabolizan junto con los procedentes de otras proteínas. Prácticamente carece de toxicidad o de poder alergénico. Se han realizado estudios de toxicidad de nisina en ratas, y se determinó que la dosis letal media LD50, es similar a la sal común, que es alrededor de 7 g/kg (Davison y Branen, 1993).

La secretaria de salud en México, establece de manera reciente una concentración máxima permisible de nisina del 0.00125 % en quesos frescos (Diario Oficial, 2012).

### II.4.4 Aplicación de nisina en productos lácteos

La incorporación de cepas productoras de bacteriocinas como cultivos adjuntos en la manufactura de los alimentos provee una atractiva y económica alternativa a la adición de bacteriocinas purificadas, ya que los metabolitos producidos durante una fermentación no se consideran como aditivos (Alegria *et al.*, 2010).

Los posibles usos de bacteriocinas como la nisina están en estudio para una amplia variedad de productos alimenticios, ya que por su origen lácteo

también sugiere la posibilidad de mejorar y aumentar las características de los productos lácteos de los que han sido aislados (Sobrino-López., 2008).

La nisina ha demostrado ser un agente efectivo en el control microbiano de numerosos productos lácteos y su uso ha sido ampliamente ensayado en la manufactura de quesos abajo pH. El uso de bacterias productoras y resistentes a nisina como cultivos iniciadores parece ser un medio viable de incorporar y mantener la actividad de esta bacteriocina, a través del proceso de fabricación de queso y para controlar deterioradores y patógenos transmitidos por los alimentos (Sobrino-López., 2008).

## II.5 *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* es un patógeno transmitido por los alimentos de particular atención en la industria de los alimentos por su naturaleza, y habilidad de crecer a temperaturas de refrigeración. También, ha sido aislada de ambientes donde se procesan alimentos (Martin y Fisher, 1999). Los quesos frescos mexicanos son un grupo heterogéneo de productos elaborados sin la adición de cultivos iniciadores (Villegas, 2004). Han sido reportados dos botes importantes de listeriosis por el consumo de estos productos (Linnan *et al.*, 1998; MacDonald *et al.*, 2005), el uso de leche no pasteurizada en la producción de quesos es un factor importante que contribuye a la contaminación con *Listeria*.

**Cuadro 1.** Parámetros óptimos de crecimiento de *L. monocytogenes* (Mead *et al.*, 2006).

Parámetro	Óptimo
Temperatura	30-37 °C
pH	7.0
Actividad de agua (aw)	0.97

Recientes brotes causados por patógenos transmitidos por los alimentos como *E. Coli O157:H7*, *Salmonella spp.*, y *L. monocytogenes* han encaminado a la búsqueda de formas innovadoras de inhibir el crecimiento microbiano en los alimentos mientras se mantiene la calidad, frescura y



seguridad. En la última década, *Listeria monocytogenes* se ha convertido en uno de los más significantes patógenos transmitidos por los alimentos, debido a su habilidad a tolerar ambientes de estrés como el bajo pH, bajas temperaturas y concentración de sal superior al 10% (Gandhi *et al.*, 2007 y Cole *et al.*, 1990).

**Cuadro 2.** Parámetros de sobrevivencia de *L. monocytogenes* (Mead *et al.*, 2006).

Parámetro	Mínimo	Máximo	Sobrevivencia
Temperatura	-1.5 a 3 °C	45 °C	-18 °C
pH	4.0	9.4-9.6	3.3-4.0
Actividad de agua (a <sub>w</sub> )	0.90 a 0.93	>0.99	<0.89
Sal (% NaCl)	<0.5	12-16	>20

Estas características permiten su frecuente contaminación de alimentos, particularmente los mínimamente procesados y refrigerados. La listeriosis transmitida por los alimentos es conocida por ser un serio peligro cuando ocurre en recién nacidos, mujeres embarazadas, y personas inmunocomprometidas (Mead *et al.*, 2006).

Desde que los productos lácteos han sido frecuentemente reportados como contaminados y asociados con brotes de listeriosis, se han desarrollado nuevas estrategias para el control de *Listeria monocytogenes*, incluyendo la aplicación directa de bacteriocinas como compuestos purificados o la inoculación de la bacteria productora de la bacteriocina (Liu *et al.*, 2008).

### **II.5.1 Brotes asociados al consumo de queso por *L. monocytogenes***

El queso fresco se ha visto involucrado en brotes por *Listeria monocytogenes* ya que es un producto altamente perecedero. El efecto de nisina contra *L. monocytogenes* ha sido ampliamente demostrado. Por tal su adición en leche para la elaboración de quesos como ricota, latino-americano, queso blanco y fresco es efectivo contra la contaminación por *L. monocytogenes*, conservando su calidad microbiológica. *Listeria monocytogenes* es un microorganismo patógeno ampliamente distribuido en el medio ambiente, frecuentemente detectado en alimentos mínimamente

procesados o listos para el consumo. Ha sido causa de numerosos brotes de listeriosis en Estados Unidos, Canadá y Europa. Es de gran importancia para la industria de alimentos debido a su ubicuidad (Harmark *et al.*, 1997).

Los quesos blancos y de pasta blanda frescos son productos mínimamente procesados y con corta vida de anaquel. Este tipo de productos han sido asociados con brotes de listeriosis. *Listeria monocytogenes* es el agente causal de la listeriosis, una de las enfermedades más importantes adquirida en el 99% de los casos por el consumo de alimentos contaminados. En el hombre se reconocen dos tipos de listeriosis: invasiva y no invasiva (Bell *et al.*, 2000). La primera produce la mayor tasa de hospitalización y de mortalidad (60%-80%) (Vazquez-Boland *et al.*, 2001), la segunda produce gastroenteritis con baja tasa de hospitalización y mortalidad (FAO-OMS, 2004).

Esta bacteria ha sido asociada a alimentos tales como la leche, quesos (particularmente variedades blandos madurados), helados y productos cárnicos. Afecta principalmente a los niños, ancianos, mujeres gestantes y personas inmunosuprimidas, ocasionando abortos, meningoencefalitis y meningitis. La contaminación del queso con *L. monocytogenes* puede abarcar todas las etapas de la cadena agroalimentaria por factores como la presencia de mastitis subclínica, el deterioro de la infraestructura, la contaminación de pisos y/o equipos, deficientes procedimientos de limpieza y desinfección, presencia de biopelículas, temperaturas de almacenamiento inadecuada, contaminación cruzada, entre otros (Bemramh *et al.*, 1998).

*L. monocytogenes* y la listeriosis fueron reconocidas por primera vez en estudios de laboratorio en animales en 1924 (Murray *et al.*, 1926). La listeriosis es una enfermedad que afecta a los humanos y en la década de los ochenta presentó un incremento en el número de casos en varios países, donde la transmisión por el consumo de alimentos contaminados fue completamente establecida (McLauchlin *et al.*, 1996).

El brote de listeriosis que elevó a un nivel más alto de preocupación entre los fabricantes de alimentos y los organismos reguladores ocurrió en

California, EUA, entre enero y agosto de 1985. Hubo 142 casos, de los cuales 93 eran mujeres embarazadas, con un total de 48 muertes (tasa de mortalidad de 34%). Entre los 49 casos de adultos, 48 eran inmunodeprimidos o personas de la tercera edad. Los estudios de los casos y controles implicados indican que se debió a queso blando estilo mexicano. Se confirmó la presencia de *L. monocytogenes* tipo 4b en este tipo de queso. La fábrica fue cerrada, y el queso de la marca implicada se recolectó. No se encontró *Listeria* en muestras de leche proveniente de 27 granjas que proveían de materia prima a la empresa. Este es el primer brote de listeriosis registrada en el que se identificó y recaudo el alimento que causó la epidemia (Linnan *et al.*, 1988).

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC) reportó uno de los brotes de mayor impacto por *L. monocytogenes* en el año 2000 (CDC, 2001) debido al consumo de queso fresco tipo mexicano, elaborado de forma artesanal con leche cruda contaminada. En este brote se reportaron 12 casos, 11 mujeres con edad promedio de 21 años y un hombre de 70 años que desarrolló un absceso cerebral. Del total de mujeres 10 estaban embarazadas, de ellas 5 abortaron, 3 tuvieron parto prematuro y en dos casos, se presentaron infecciones en los neonatos. La tasa de hospitalización fue del 100% (CDC, 2008; Mac Donald *et al.*, 2005). En este brote se puede observar que los afectados concuerdan con los grupos de riesgo reportados para la enfermedad. Es importante resaltar que, considerando los hábitos de consumo de las mujeres embarazadas, éstas consumían entre 2 y 3 porciones por día, aumentando el riesgo de exposición.

## **II.6 Microencapsulación**

La aplicación de componentes naturales como la nisina en alimentos, normalmente se evalúan dos aspectos; los cambios en las propiedades organolépticas y de textura cuando son adicionadas y la interacción con los ingredientes de los alimentos, incluyendo la influencia de esta interacción en su eficiencia (Devlieghere *et al.*, 2004).

El interés en la aplicación de metabolitos naturales como las bacteriocinas en la prevención del deterioro y la extensión de la vida de

anaquel se ha incrementado en las últimas décadas. Sin embargo, la interacción entre estos agentes antimicrobianos y los componentes de los alimentos, así como su distribución en ellos, reduce su eficiencia contra los patógenos cuando son directamente aplicados a los alimentos por lo tanto es necesario desarrollar una adecuada distribución o sistema de liberación para reducir estas interacciones y maximizar el potencial bioprotector de estos componentes (Ibarguren *et al.*, 2012).

La encapsulación y la liberación controlada de bacteriocinas y otros agentes bioactivos son una de las aplicaciones del campo emergente de la nanobiotecnología (da Silva *et al.*, 2010).

Gálvez *et al.* (2007), enfatizaron en las ventajas de la administración de enterocinas inmovilizadas como conservadores de alimentos. El portador podría actuar como un reservorio y difundir gradualmente la molécula de bacteriocina concentrada a través del alimento, y por lo tanto, asegurar una gradual y continua provisión de bacteriocinas. El agente inmovilizante también protege a las bacteriocinas de la interacción con los componentes del producto o su inactivación.

Existen reportes respecto a la conservación de la actividad de las bacteriocinas enfocadas en una variedad de superficies como silicatos y otros materiales como: alginatos, liposomas, niosomas y nanovesículas de fosfolípidos (Ibarguren *et al.*, 2012).

La microencapsulación es un proceso en el cual materiales sólidos líquidos o gaseosos son recubiertos para producir pequeñas capsulas. Esta técnica está basada en el efecto envolvente de una matriz polimérica, la cual crea un microambiente en la cápsula capaz de controlar las interacciones entre la parte interna y externa. La microencapsulación tiene limitadas aplicaciones en la industria de los alimentos y por lo general son usados como materiales de pared polímeros de grado alimenticio como alginato, quitosán, carboximetil celulosa (CMC), carragenina, gelatina y pectina (Anal y Singh, 2010).

Se han reportado varias técnicas para el encapsulamiento de ingredientes, la selección del método está en función del presupuesto, los costos, las propiedades del material a encapsular, el tamaño deseado de las macropartículas y de los mecanismos de liberación (Ré, 1998).

Independientemente del método elegido para preparar las microcápsulas, el primer paso en la encapsulación será la selección de una matriz de encapsulación adecuada.

**Cuadro 3.** Materiales usados como pared para la microencapsulación (Pedroza *et al.*, 2002).

<b>Tipo de cobertura</b>	<b>Cobertura específica</b>
<b>Hidrocoloides</b>	Agar, alginato de sodio, carraganina, goma arábica.
<b>Carbohidratos</b>	Almidón, dextranos, sacarosa, jarabes de maíz
<b>Celulosas</b>	Etilcelulosa, metilcelulosa, acetilcelulosa, nitrocelulosa, carboximetil-celulosa
<b>Lípidos</b>	Ceras, parafinas, diglicéridos, monoglicéridos, aceites, grasas, ácido esteárico, triestearina.
<b>Proteínas</b>	Gluten, caseína, albúmina
<b>Materiales inorgánicos</b>	Sulfato de calcio, silicatos

Entre los agentes encapsulantes que se utilizan destacan las proteínas aisladas del suero de la leche, utilizadas como cobertura en el secado por aspersión. Este material posee alta capacidad emulsificante y genera microcápsulas de tamaño inferior a 2 micrómetros. Pueden utilizarse solas o combinadas con carbohidratos para modificar las propiedades de la pared y el tamaño de las partículas. El uso de proteínas del suero de la leche tiene efectos sobre la morfología de las microcápsulas haciéndolas más esféricas y de superficie tersa en comparación con los polisacáridos. Los alginatos son uno de los polímeros más utilizados en la microencapsulación. Se extraen principalmente de tres especies de algas marrones (*Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera*). Han sido empleado como

agentes espesantes, gelificantes y estabilizantes coloidales en la industria alimentaria y gracias a sus propiedades, también se han podido aplicar en el entrapamiento y liberación de fármacos y microorganismos. Estas propiedades son: permitir que la encapsulación se lleve a cabo a temperatura ambiente, no requerir solventes orgánicos tóxicos, elevado grado de porosidad, permitir una alta velocidad de difusión para macromoléculas, y la posibilidad de controlar dicha difusión, disolverse y degradarse bajo condiciones fisiológicas normales. La liberación del contenido de las microcápsulas se puede llevar a cabo por disolución en agua, esfuerzos de cizalla, temperatura, reacciones químicas y enzimáticas o por cambios en la presión osmótica. No obstante, esta liberación puede controlarse por difusión a través de la pared de la microcápsula o bien por medio de una membrana que recubre la pared. (Pedroza *et al.*, 2002).

### **II.6.1 Secado por aspersion.**

El secado por aspersion es ampliamente usado en la industria como un método para microencapsular debido a que es económico y efectivo en la protección de materiales como sabores, vitaminas, aceites esenciales, colorantes y lípidos (Yañez *et al.*, 2002).

Los métodos de secado por aspersion han sido ampliamente descritos para la preparación de macropartículas en solución acuosa. Este método consiste en la atomización de líquidos en pequeñas gotas, seguido de un secado con aire caliente y la recolección de las partículas sólidas (Broichsitter *et al.*, 2011).

Se han usado diferentes tipos de agentes encapsulantes cuando se habla de secado por aspersion; estos incluyen polisacáridos (almidones, maltodextrinas, jarabes de maíz y goma arábica), lípidos (ácido esteárico, mono y diglicéridos) y proteínas (gelatina, caseína, soya y proteína de trigo). El material más usado comúnmente para micro encapsulación en la maltodextrina, son obtenidas por hidrólisis ácida de algunos almidones (maíz, papa y otros). En general las maltodextrinas tienen una alta solubilidad en agua, baja viscosidad, sin sabor e incoloras y son ampliamente usadas en la industria alimentaria (Gibbs *et al.*, 1999).

## II.7 Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que transitan el tracto gastrointestinal y tienen un efecto benéfico en el huésped durante su tránsito, mejorando el balance microbiano intestinal (Krasaekoopt *et al.*, 2003). Después de ingerirlos en número suficiente, brindan beneficios a la salud sobre una o más funciones del organismo, más allá de la nutrición general inherente (Picot y Lacroix, 2004; Taranto *et al.*, 2005).

Entre los efectos que los probióticos tienen sobre la salud se pueden nombrar:

- Control de las infecciones intestinales: Las bacterias lácticas, que colonizan el intestino humano, inhiben el crecimiento de microorganismos indeseables y de bacterias que contaminan los alimentos, como la *Salmonella* spp, que se puede encontrar en el tracto gastrointestinal (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

- Mejor utilización de la lactosa en personas con intolerancia: Los cultivos normales de yogurt, *Lactobacillus delbrueckii* spp, *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, producen  $\beta$ -galactosidasa en presencia de bilis, de lo cual se ha concluido que la producción de esta enzima intestinal mejora la digestión de la lactosa (Krasaekoopt *et al.*, 2003; Hui, 2007).

- Actividad anticarcinógena: Inhibición de bacterias que convierten procarcinógenos en carcinógenos, activación del sistema inmune, incremento de la peristalsis disminuyendo el tiempo de estancia de patógenos y carcinógenos al acelerar la velocidad de tránsito a través del intestino (Kailasapathy y Chin, 2000; Hui, 2007).

- Tratamiento en patologías gastrointestinales y terapia antibiótica: Actúan mediante la competencia de nutrientes y espacio, acidificando el colon o produciendo sustancias antibióticas activas frente a patógenos como *Clostridium difficile* y *Helicobacter pylori*, que impiden la multiplicación de los mismos y la producción de sus toxinas (Hui, 2007).

### II.7.1 Bacterias probióticas

Las bacterias más comúnmente utilizadas para la producción de alimentos probióticos se hallan dentro de las bacterias lácticas, como son

especies de lactobacilos y de bifidobacterias (Lyer y Kailasapathy, 2005) como son: *Lactobacillus acidophilus*, *L. lactis*, *L. casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. breve* y *B. infantis* (Mortazavian *et al.*, 2007)

### **II.7.2 Productos lácteos y probióticos**

La industria de la leche en México es una industria en expansión. La tendencia al consumo de derivados lácteos en México se ha incrementado en años recientes debido a factores como la modificación de la pirámide poblacional, la reducción de la natalidad, envejecimiento de la población, el aumento del ingreso *per capita*, entre otros (Trejo, 2009).

Los lácteos representan un vehículo ideal para el suministro de probióticos por las razones siguientes:

- Ofrecen protección para los probióticos al mantener un ambiente favorable durante su tránsito por el tracto digestivo, en especial por el estómago e intestino delgado.
- El tiempo corto y temperatura de almacenaje baja de los lácteos promueven la estabilidad de los probióticos y garantizan el efecto positivo al ser ingeridos.
- Los lácteos son ampliamente consumidos y tienen mayor aceptación al ser asociados con los beneficios de los probióticos. (DMI, 2004)

Además, gracias a la actividad metabólica de las bacterias lácticas que actúan durante el proceso de elaboración, la calidad nutritiva se mejora, ya que hay una predigestión de la lactosa y las caseínas. El metabolismo de la lactosa genera ácido láctico que da lugar a una disminución del pH, esto favorece la coagulación de las proteínas y determina la textura del producto, inhibe el desarrollo de microorganismos patógenos y facilita la digestión de la lactosa al consumidor. De igual manera, la degradación de la caseína genera péptidos y aminoácidos libres, más fácilmente asimilables (Sanz *et al.*, 2003; Cabeza, 2006).



### III. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años ha habido un gran interés por parte de los consumidores en consumir productos libres de aditivos químicos, es por ello que la bioconservación representa una posible respuesta no sólo para asegurar la inocuidad de los alimentos, sino que también como ayuda para desarrollar características sensoriales, que en muchos casos es la principal característica que busca el consumidor cuando compra un producto, en especial productos frescos como el queso tipo panela.

Uno de los grandes problemas del consumo de queso fresco es la contaminación por *Listeria monocytogenes*, una bacteria patógena Gram positiva responsable de brotes importantes en el mundo asociado al consumo de alimentos. La contaminación de productos lácteos por esta bacteria se debe principalmente al uso de leche no pasteurizada para la elaboración de queso fresco, promoviendo las condiciones adecuadas para su desarrollo, ya que es una bacteria psicrótrofa, y se adapta adecuadamente a condiciones de refrigeración.

El uso de antimicrobianos naturales es una alternativa muy atractiva para la conservación de alimentos frescos, ya que el consumidor demanda productos libres de aditivos químicos, entre estos antimicrobianos se encuentra la nisina, una bacteriocina producida por la bacteria *Lactococcus lactis* UQ2 que está ampliamente estudiada en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Dado que la nisina puede perder actividad por la interacción con los componentes del alimento, es necesario buscar formas de proteger su actividad y asegurar su presencia durante el almacenamiento del queso, esto se puede lograr mediante su microencapsulación, además de que la inoculación de la cepa *L. lactis* UQ2 puede ayudar a la conservación y también a generar sabores que hacen al queso más atractivo al consumidor.

## IV. OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

Microencapsular la nisina producida por *Lactococcus lactis* UQ2 y evaluar su efecto antimicrobiano al incorporarla en queso tipo panela.

### **Objetivos específicos:**

- Producir la bacteriocina nisina a partir de la cepa *Lactococcus lactis* UQ2 a nivel biorreactor usando suero lácteo como medio alternativo.
- Determinar las condiciones adecuadas de microencapsulación de la nisina y *L. lactis* UQ2.
- Evaluar el efecto de la incorporación de nisina y *L. lactis* UQ2 microencapsuladas sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* EGDe en queso durante su almacenamiento.
- Evaluar el efecto de la incorporación de nisina y *Lactococcus lactis* UQ2 microencapsuladas en queso y su aceptación por el consumidor.
- Determinar parcialmente la capacidad probiótica de la cepa *Lactococcus lactis* UQ2 sometiénola a digestión simulada.

## **V. HIPÓTESIS**

La incorporación de nisina microencapsulada en combinación con la cepa *Lactococcus lactis* UQ2 durante la elaboración de queso tipo panela, es capaz de favorecer la bioconservación y mejorar las características sensoriales.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.1 Cepas microbianas, antimicrobianos y materiales de pared

*Lactococcus lactis* UQ2 y *Micrococcus luteus* NCBI 8166, fueron proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química. La cepa bioluminiscente de *Listeria monocytogenes* EDGe resistente a cloranfenicol fue donada por el Dr. Collin Hill, Universidad de Cork, Irlanda.

#### Enzima coagulante

Se utilizó cuajo microbiano (Qualact, fuerza de cuajo 1:7500) enzima utilizada para la coagulación de la caseína de la leche.

#### Antimicrobianos

Se utilizó nisina comercial (MP Biomedical, LLC) para la elaboración de la curva estándar, rifampicina (Sigma-Aldrich) 10,000 µg/L para la preparación del medio púrpura de bromocresol (PBC) y cloranfenicol para preparar el medio LB para la cepa de *Listeria monocytogenes* EGDe.

#### Materiales de pared

Para la microencapsulación de *L. lactis* UQ2 se utilizó almidón modificado y concentrado de proteína de suero de leche (CPS) por sus siglas en inglés (WPC, whey protein concentrate).

### VI.2 Soluciones y medios de cultivo

- Solución de alcohol etílico (JT Baker) al 70% (v/v).
- Solución de sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>, Mallinckrodt) al 10% (p/v).
- Solución de sulfato de manganeso (MnSO<sub>4</sub>, Sigma-Aldrich) al 10% (p/v).
- Tween 20 (Hycel) al 50% (v/v).
- Solución de ácido clorhídrico (HCl, JT Baker) 0.02 N.
- Solución de hidróxido de sodio (NaOH, JT Baker) 0.1 N.
- Solución de ácido clorhídrico (HCl, JT Baker) 5 N.
- Solución de hidróxido de sodio (NaOH, JT Baker) al 2% (p/v).

- Solución de cloruro de sodio (NaCl, JT Baker) al 0.85% (p/v).
- Solución de peptona de caseína (Bioxon) al 0.1% (p/v).
- Solución de lactosa (Sigma-Aldrich) al 10% (p/v).
- Solución Ringer. Por 1 L de solución se pesaron 9 g de cloruro de sodio (JT Baker), 0.42 g de cloruro de potasio (JT Baker), 0.24 g de cloruro de calcio anhidro (Fermont), 0.20 g de bicarbonato de sodio (JT Baker).
- Solución Ringer ¼: se diluyó la solución Ringer 1:4 en agua.

## **Medios de cultivo**

### **Medio M17**

Se pesaron 39.2 g de medio M17 (Oxoid) y se disolvieron en 950 ml de agua destilada, se esterilizó por calor húmedo y se agregaron 50 ml de solución de  $\alpha$ -lactosa estéril al 10% (Sigma-Aldrich).

### **Agar Oxford**

Por cada 500 ml de medio se pesaron 29.25 g de agar Oxford (Oxoid), una vez estéril se agregó el tubo de suplementos Oxford (Oxoid) previamente disuelto en 5 ml de alcohol etílico (JT Baker) al 40% esterilizado por membranas de tamaño de poro de 45  $\mu$ m.

### **Agar MRS**

Se disolvieron 55 g de caldo MRS (Oxoid), 15 g de agar bacteriológico (Bioxon) en 1000 mL de agua destilada, se calentó hasta su dilución completa, se ajustó el pH del medio a  $6.5 \pm 0.2$ , se esterilizó en autoclave.

### **Agar assay**

Para 1000 mL se disolvieron 10 g de peptona bacteriológica (Oxoid), 3 g de extracto de carne (Bioxon), 3 g de cloruro de sodio (JT Baker), 1.5 g de extracto de levadura (Bioxon), 1 g de azúcar mascabado (Dillis, Técnica Mexicana de alimentación, México) y 10 g de agar bacteriológico (Bioxon). Se mezcló y se ajustó a un pH final de  $7.5 \pm 0.2$  posteriormente se calentó hasta disolver y se esterilizó en autoclave.

### **Medio de cultivo lactosa purpura de bromocresol con rifampicina (PBC)**

Se disolvieron 5 g de peptona de caseína, 3 g de extracto de carne, 10 g de lactosa (Sigma-Aldrich), 0.04 g de purpura bromocresol (Merck) y 15 g de

agar en 1000 mL de agua destilada. Se esterilizó a 121 °C por 15 min. Se agregaron 200 µg/mL de rifampicina cuando alcanzó una temperatura de 45 °C.

### **Caldo soya tripticasa**

Para 1000 mL de medio se pesaron 17 g de peptona de caseína, 3 g de peptona de soya, 5 g de cloruro de sodio, 2.5 g de fosfato dipotásico, se estandarizó a un pH de 7.3 ±0.2. Se calentó en agitación hasta disolver y hervir durante un minuto. Se esterilizó en autoclave 121 °C por 15 min.

### **Caldo LB**

Para 1 L de medio se pesaron 25 g y se disolvieron, se llevó a un pH de 7.5±0.2. Se esterilizo en autoclave a 121 °C por 15 min.

### **Agar LB**

Para 1 L de medio se pesaron 25 g de medio, 15 g de agar bacteriológico, se llevó a un pH de 7.5±0.2., se calentó la solución hasta ebullición y se esterilizo en autoclave a 121 °C por 15 min.

## **Soluciones microbiológicas**

### **Diluyente de peptona al 0.1 %**

Se pesó 1 g de peptona bacteriológica (Oxoid), por cada 1000 mL de agua destilada, se distribuyó en frascos de vidrio y se esterilizó en autoclave.

### **Tween 20 al 50%**

Se disolvió Tween 20 (Hycel, México) en agua destilada en partes iguales 1:1, y se esterilizó en autoclave.

### **Solución Ringer**

Se pesaron 9 g de cloruro de sodio (JT Baker), 0.42 g de cloruro de potasio (JT Baker), 0.24 g de cloruro de calcio anhidro (Fermont), 0.2 g de bicarbonato de sodio (JT Baker). Se aforó a 1000 mL y se esterilizó en autoclave.

### **VI.3 Producción de nisina a nivel biorreactor**

Para la producción de nisina en biorreactor se realizaron dos diferentes fermentaciones usando la cepa nativa de *L. lactis* UQ2 y por otro lado la cepa transformada *Lactococcus lactis* UQ2 rif L<sup>+</sup>. Se utilizaron ambas cepas para comprobar cuál es la mejor productora de nisina. Se siguió el mismo procedimiento de activación para ambas cepas con la diferencia que para activar la cepa transformada se utilizó caldo M17 y el conteo se llevó a cabo en agar PBC, y la cepa nativa se activó en caldo MRS y el conteo se llevó a cabo en agar MRS. La bacteria proveniente de una conserva a -70°C, se colocó en un tubo con caldo M17/MRS y se incubó durante 24 h a 30°C. Una vez activada la cepa, se tomaron 100 µL y se inocularon en otro tubo conteniendo 10 mL de caldo M17/MRS que se incubó bajo las mismas condiciones. El cultivo del último tubo, se inoculó a un matraz conteniendo 20 mL de suero de leche a una concentración de 14.9 g/L suplementado con soluciones estériles de sulfato de magnesio 0.5 g/L, sulfato de manganeso 0.1 g/L, peptona de soya 13.8 g/L, Tween 20 a 0.02 g/L, y se incubó a 30°C durante 24 h. Este cultivo se usó como inóculo (1%, v/v) en 50 mL de otra solución de suero de leche suplementado de la misma manera y se incubó a 30°C por 10 h, de esta última solución se tomó un inóculo (1% v/v) que se administró a 2 L de medio suplementado y se procedió a realizar la fermentación por 12 h en el biorreactor. La nisina como inductor se administró a las 2 h de iniciada la fermentación. Las condiciones de fermentación en el biorreactor fueron: agitación de 200 rpm, flujo de aire de 1 L/min, temperatura a 30° C, el pH se controló a 6.5 con soluciones de HCl 1 M y NaOH 1 M; y se tomaron muestras de 10 mL cada 2 h para realizar análisis posteriores. Una vez terminada la fermentación, se removieron las células por centrifugación y filtración para obtener el extracto libre de células.

### **VI.4 Secado y microencapsulación de nisina.**

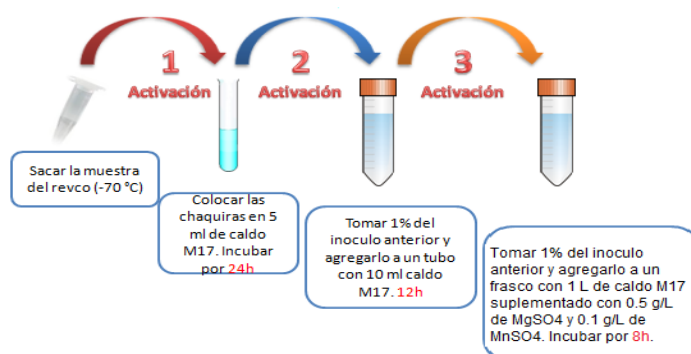
La microencapsulación de nisina se llevó a cabo usando el equipo BUCHI Mini Spray Dryer B-290 (Laboratoriums Technik, AG, Flawil, Switzerland) en el posgrado de alimentos de la Universidad Autónoma de Querétaro y se utilizó como materiales de pared almidones modificados. Una vez obtenido el extracto libre de células se agregaron los almidones en un porcentaje de 10 % de

sólidos. Una vez incorporados en el extracto libre de células se calentó la solución a 80 °C con agitación a máxima velocidad durante 10 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente continuando la agitación, para finalmente mantener en refrigeración de 6 a 8 h en agitación. Para conocer las mejores condiciones de microencapsulación se llevó a cabo un diseño unifactorial teniendo como factor la temperatura de entrada, siendo los niveles 130°, 145°, 160°, 175° y 190 °C , manteniendo la bomba a 35 % de su capacidad y el aspirador en 95 %.

## VI.5 Microencapsulación de *L. lactis* UQ2

### VI.5.1 Activación de *L. Lactis* UQ2 para microencapsulación

Para lograr una máxima población de la cepa transformada de *L. lactis* UQ2 fue necesario realizar 3 activaciones como se muestra en la figura 6. Para la primera activación se colocaron las chaquiras proveniente de una conserva a -70°C en un tubo con 10 mL de caldo M17 adicionado al 0.5% (p/v) de una solución de lactosa estéril al 10% y se incubó durante 24 h a 30°C. Para la segunda resiembra, el cultivo se inoculó al 1% (v/v) en 20 mL de caldo M17 adicionado al 0.5% (p/v) de lactosa y se incubó a 30°C durante 12 h. La tercera resiembra se realizó en 1 L de caldo M17 adicionado al 0.5% de lactosa y suplementado con soluciones estériles de sulfato de magnesio 0.5 g/L y sulfato de manganeso 0.1 g/L, posteriormente se incubó a 30°C por 8 h. Finalizado el periodo de incubación se tomó una muestra para determinar la población final del cultivo.



**Figura 6.** Procedimiento de activación de la cepa de *L. lactis* UQ2



### **VI.5.2 Recuperación del cultivo**

El cultivo de *L. lactis* UQ2 activado se centrifugó en botellas estériles para centrifuga Nalgene de 500 mL, la velocidad de centrifugación utilizada fue de 6000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en solución salina estéril al 0.85% (p/v) para ser centrifugado nuevamente bajo las mismas condiciones, esta operación de lavado se repitió una vez más. El producto final obtenido fue una pastilla (pellet) concentrado de bacterias.

### **VI.5.3 Preparación del agente encapsulante**

El agente encapsulante fue preparado en un buffer de fosfatos 0.1 mM estéril a pH 7, agregando la mezcla de polímeros (almidón modificado y concentrado de proteína de suero). Al momento de la adición de los agentes encapsulantes el amortiguador fue mantenido en agitación constante con un agitador magnético estéril. Una vez añadidos los almidones la suspensión se colocó en baño maría a 80°C por 10 min. Se enfrió a 4°C en una parrilla de agitación refrigerada (aproximadamente 4h) y una vez frío, se adicionó el pellet de bacterias, se homogenizó y se tomó una muestra de forma aséptica para la evaluación de la viabilidad en esta etapa.

### **VI.5.4 Secado por aspersión.**

Las microcápsulas fueron obtenidas mediante el proceso de secado por aspersión en un secador Mini Spray Dryer Büchi, Modelo B-290. Las condiciones de secado se variaron de una temperatura de entrada de 140° a 100°C y temperatura del aire de salida de 76° a 55°C. La capacidad de la bomba de alimentación se operó a 17-25 % y el porcentaje de aspiración de 95% y con un diámetro de boquilla de 0.7 mm. Las cápsulas fueron recolectadas del cilindro recolector de la muestra para posteriormente ser almacenadas en frasco de vidrio estéril con sello hermético a 4 °C hasta su uso. Para el aseguramiento de la inocuidad del equipo se tomaron ciertas medidas de higiene como; pasar agua destilada estéril por el equipo una vez estabilizadas las condiciones de operación, así como también la utilización de agua electrolizada neutra a 40 ppm de cloro total en la desinfección de las piezas del equipo.

Se realizaron pruebas de viabilidad de la bacteria tanto en el caldo de la última activación, como en la suspensión de almidón y en las microcapsulas para poder realizar los cálculos de rendimiento de proceso.

El % de viabilidad se calculó con la siguiente fórmula

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{(\text{Población ME}) (\text{Peso de cápsulas})}{(\text{Población en AE}) (\text{Volumen de activación})} \times 100$$

Donde:

Población AE; Población del *L. lactis* en los agentes encapsulantes

Población ME; Población del *L. lactis* microencapsulado

#### **VI.5.5 Estudio de la estabilidad del microencapsulado de *L. lactis* UQ2**

Se realizó un estudio de viabilidad de las microcápsulas por un periodo de varias semanas almacenadas en refrigeración a 4°C, tomando muestras cada semana de almacenamiento. La cuantificación de la población se llevó a cabo bajo la técnica de Miles-Misra en agar PBC.

#### **VI.6 Morfología de las microcápsulas de *L. lactis* UQ2**

La morfología de las microcápsulas se realizó mediante microscopía electrónica de barrido de acuerdo con la metodología descrita por Gunning *et al.*, (1999) con algunas modificaciones. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (ESEM Phillips, modelo XL30, Holanda), en condiciones de bajo vacío (0.7 mbar) con un voltaje de aceleración de 15.0-20.0 kV, aproximadamente 50 µA de corriente, un detector GSE (Gaseous Secondary Electron) y un spotsize del láser de 3.8-4.6. Las muestras de las bacterias microencapsuladas fueron fijadas en un portamuestras de aluminio con semicírculos de cinta adhesiva doble cara de grafito, expandidas por medio de aire comprimido y observadas a un aumento de 5000X.

#### **VI.7 Elaboración de queso tipo Panela con el cultivo protector, nisina y *L. monocytogenes* EGDe.**

Para elaborar el queso tipo panela se utilizó leche pasteurizada entera, se llevó a una temperatura de 35 °C y se le agregó el cloruro de calcio (0.4 ml/L, Baker). Posteriormente, se adicionó el cuajo microbiano, 0.05 g/L

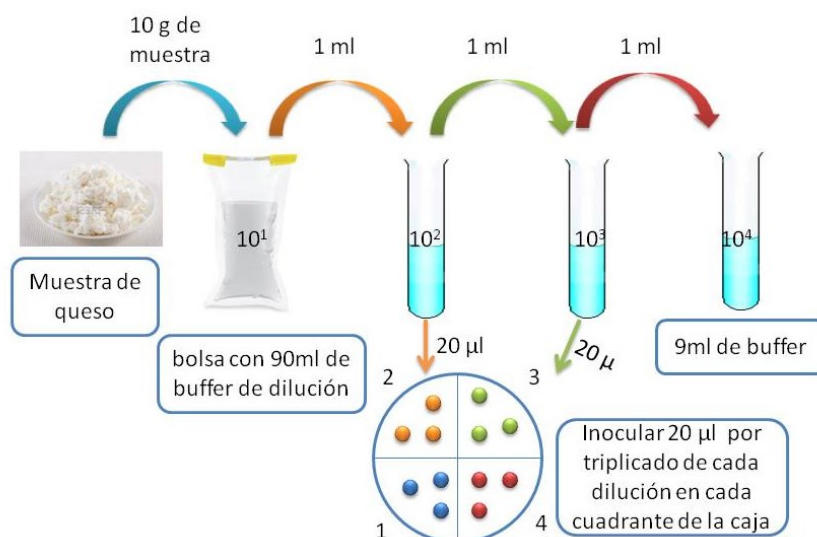
(QuaLact, México), se agitó constantemente para lograr su completa incorporación. Se dejó reposar por 30 min para favorecer la formación de la cuajada, para posteriormente realizar el corte. Se procedió a la eliminación parcial del suero (3/4 partes), seguido de la etapa de salado, empleando NaCl 0.6% (p/v) respecto al volumen inicial de leche. En este momento se inoculó el cultivo protector *L. lactis* UQ2 microencapsulado, la nisina y *Listeria monocytogenes* EGDe de acuerdo a las cantidades establecidas.

De la pasta obtenida fue tomada una muestra representativa para realizar los análisis correspondientes al tiempo cero de estudio ( $t_0$ ), el resto de la pasta fue colocada en moldes por un periodo de 8 a 12 h en refrigeración para favorecer un mejor desuerado, concluido este periodo el queso se desmoldó para posteriormente ser empacado al vacío. Como variables respuesta para el queso se monitoreó la población de *L. lactis* UQ2 y *L. monocytogenes* EGDe así como los niveles de nisina durante el almacenamiento en refrigeración por 21 días.

#### **VI.7.1 Cuantificación de *L. lactis* UQ2 en queso**

La determinación de la población se llevó a cabo por el método de Miles-Misra o método de la gota como se describe en la Figura 7 y mediante la técnica de extensión por superficie. De cada una de las muestras de queso se preparó una serie de diluciones decimales seriadas; para ello se tomaron 10 g de queso y se colocaron en una bolsa (Whirl-Pak®, Nasco) con 90 ml de agua peptonada al 0.1% (p/v). Se homogenizaron (Stomacher 400 Circulator, Seward, Inglaterra), se tomó 1 ml de la dilución anterior y se adicionó en un tubo con 9 ml de agua peptonada, se homogenizó y se repitió el procedimiento hasta obtener las diluciones necesarias dependiendo de la población microbiológica esperada (Vanderzant *et al.*, 1992).

Para realizar la cuenta por Miles-Misra se colocan tres gotas de 20  $\mu$ l de las diluciones correspondientes en un cuadrante de las placas de agar PBC al 1% adicionado con rifampicina y se deja secar a temperatura ambiente en la campana de flujo laminar, se incuban a 30°C y después de 24 h se procede a contar las colonias en las placas.



**Figura 7.** Técnica viabilidad de *L. lactis* UQ2 por la técnica de Miles-Misra.

Para realizar la cuenta por extensión en superficie se colocaron 100 µl en el centro de la placa y con una varilla estéril de vidrio se extendió sobre la superficie completa de la placa.

### VI.7.2 Cuantificación de *L. monocytogenes* EGDe en queso

Para la cuantificación de *L. monocytogenes* EGDe en queso se llevó a cabo el procedimiento que se describió anteriormente, con algunas modificaciones. Para hacer las diluciones se utilizó solución salina 0.85 % y se sembró en cajas con agar LB adicionada con cloranfenicol, se incubó a 37 °C por 24 h para posteriormente contar las colonias.

### VI.7.3 Cuantificación de nisina en queso

Para la extracción de nisina se pesaron 40 g de la muestra de queso en un matraz Erlenmeyer de 500 mL los cuales se disolvieron en 160 mL de ácido clorhídrico 0.02 N, se ajustó el pH a 2 con HCl 5 N, se calentó el extracto por 5 min en baño maría a ebullición. Se ajustó el volumen con HCl 0.02 N a 200 mL. La muestra se centrifugó 6500 rpm por 20 min a 4 °C, al finalizar se retiró la capa de grasa de la superficie y se decantó el líquido, la pastilla se desechó. El sobrenadante se clarificó y filtró mediante una membrana de 0.45 µm de tamaño de poro (Durapore, Millipore, Irlanda), obteniendo el extracto de nisina. La concentración de nisina se determinó de acuerdo al BS 4020 (1974), mediante pruebas de difusión de agar.

### **VI.7.3.1 Método de difusión en agar**

*Micrococcus luteus* proveniente de una conserva a  $-70^{\circ}\text{C}$  se coloca en un tubo con caldo assay y se incuba 48 h a  $30^{\circ}\text{C}$ . Finalizado el periodo de incubación, se siembra por estriado en un tubo inclinado y en placas con agar assay al 1% (p/v), para verificar la pureza de la cepa. De la cepa aislada se toma una azada y se siembra por estriado en tubos inclinados con agar assay al 1%. Para realizar los ensayos de actividad se toma el cultivo de los tubos, diluyendo con 1 ml de solución Ringer  $\frac{1}{4}$  y se guarda en un frasco estéril; de esta solución concentrada, se toman 5, 10, 20, 30, y 40  $\mu\text{L}$  y se llevan a 1 ml con la solución Ringer  $\frac{1}{4}$ , para ajustar la concentración del microorganismo a una absorbancia de  $0.30 \pm 0.01$ , leyendo a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 650 nm, la solución obtenida se denomina solución de trabajo.

Para la preparación del medio se utilizaron cajas Petri de 14 cm de diámetro, se adicionaron 40 mL del medio (agar assay 1%), previamente suplementado con 800  $\mu\text{L}$  de *Micrococcus luteus* (cultivo ajustado a una densidad óptica  $A_{650}$  de 0.3) y 800  $\mu\text{L}$  de solución de Tween 20 al 50%. Una vez solidificado el agar, se realizaron fosas de 8 mm de diámetro utilizando un horador estéril No. 4. Dentro de la fosa se colocaron 60  $\mu\text{L}$  del extracto de nisina. La caja se incubó a una temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  durante 48 h. La zona de inhibición se midió en mm y la concentración obtenida fue calculada mediante una curva estándar de nisina.

### **VI.7.3.2 Curva estándar de nisina.**

La curva estándar de nisina se realizó preparando una solución de 1000 UI/mL, para lo cual se pesaron 0.1 g de nisina (MP Biomedical, LLC) y se disolvieron en 80 ml de HCl (JT Baker) 0.02 N. Se sometió a un calentamiento de  $95^{\circ}\text{C}$  en baño de agua por 5 min. Se enfrió a  $20^{\circ}\text{C}$  y se dejó reposar durante 2 h. Se aforó la solución a 100 ml utilizando HCl 0.02 N.

De ésta solución se hicieron diluciones decimales en HCl 0.02 N hasta obtener una concentración de 10 UI/ml. De la última solución se tomaron 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 y 900  $\mu\text{L}$  y se aforaron a 1 ml con HCl 0.02 N para tener soluciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 UI/ml. Las diluciones se colocaron en pozos en placas de agar inoculado con 2% v/v de la solución de

trabajo de *M. luteus* y 2% de Tween 20 al 50% p/v. Las placas se incubaron a 30°C por 48 h. Después del tiempo de incubación se midieron los halos de inhibición utilizando un vernier. Se graficó el promedio de tres réplicas del halo de inhibición (mm) contra el log de UI/ml para generar la ecuación de la recta.

## **VI.8 Visualización por microscopía de epifluorescencia del queso control y los tratamientos.**

Los quesos se visualizaron en microscopio de fluorescencia (Zeiss Axio observer D1, Jena, Alemania) para monitorear la presencia de *L. monocytogenes* EGDe, se utilizó un filtro DAPI con una longitud de onda de excitación de 360 a 340 nm y una longitud de onda de observación por arriba de 410 nm con un aumento de 64x.

## **VI.9 Digestión simulada**

### **VI.9.1 Digestión simulada en células libres de *L. lactis* UQ2**

Se preparó saliva artificial diluyendo 6.2 g de cloruro de sodio, 2.2 g de cloruro de potasio, 0.22 g de cloruro de calcio y 1.2 g de bicarbonato de sodio en 1 L de agua destilada. La mezcla se esterilizó a 121°C durante 15 min. Los jugos gástrico e intestinal simulados se prepararon el día del experimento. Para el jugo gástrico simulado se resuspendieron 3 g de pepsina (Sigma-Aldrich) en 1 L de solución salina estéril al 0.5% acidificada a pH 2 con ácido clorhídrico 1 M. El jugo intestinal simulado se preparó con 1 g de pancreatina (JT Baker) y 1.5 g de sales biliares (Sigma-Aldrich) en 1 L de solución salina al 0.5% estéril, el pH se ajustó a 8 con solución de NaOH 1 M.

Para la digestión simulada se siguió la metodología reportada por Chartanis *et al.* (1998), con algunas modificaciones. Se partió de una conserva de la cepa a -70 °C la cual fue activada en 10 mL de caldo M17 suplementado con lactosa al 10% (5 %v/v), se incubó a 30 °C por 24 h. Transcurridas las 24 h se realizó una resiembra al 1 % (v/v) en un matraz conteniendo 50 mL de caldo M17 suplementado de igual manera. Se incubó durante 18 h para asegurar un crecimiento de aproximadamente 10<sup>9</sup> UFC/mL. Posteriormente se centrifugó el contenido del matraz en tubos Falcon estériles para centrifuga a 4500 rpm durante 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 10 mL de buffer de fosfatos 0.1 mM pH 7. Se colocaron 2 mL de esta

suspensión en 2 mL de saliva artificial y 16 mL de jugo gástrico simulado. Se incubó a 37 °C con agitación de 55 rpm en agitador orbital durante 2 h haciendo recuento bacteriano a las 0, 1 y 2 h. Pasadas las 2 h se centrifugó esta solución a 4500 rpm durante 10 min a 4°C y se decantó el sobrenadante. Al pellet se le agregaron 20 mL de jugo intestinal simulado. Se incubó bajo las mismas condiciones que la digestión gástrica tomando muestra a las 0 h, 2 h y 4 h de contacto.

#### **VI.9.2 Digestión simulada del queso con *Lactococcus lactis* UQ2**

A los 14 días de almacenamiento, se evaluó in vitro la sobrevivencia de las células encapsuladas agregadas en queso panela, en condiciones simuladas del tracto gastrointestinal, de acuerdo a lo reportado por Charteris *et al.* (1998), y Blazenka *et al.* (2000), con algunas modificaciones. Para la exposición de las muestras a condiciones gástricas simuladas se adicionaron 3 ml de saliva artificial y 24 ml de jugo gástrico simulado a 3 g de la muestra de queso panela, se homogenizaron las muestras manualmente por 1 minuto y fueron colocadas a 37°C durante 2 h. Se monitoreó la cuenta viable recién colocada la saliva y el jugo gástrico simulado a la hora y a las 2 h de residencia en estas soluciones. A continuación fueron expuestas las muestras a condiciones intestinales simuladas. Para ello se tomaron 25 ml de las suspensiones y se centrifugaron a 6000 rpm por 5 min. Se decantó el sobrenadante y sobre la pastilla se adicionó 1 ml del sobrenadante recién decantado más 27 ml de jugo intestinal simulado, las muestras se colocaron a 37°C durante 4 h. La cuenta viable de estas suspensiones se determinó recién agregado el jugo intestinal simulado, a las 2 h y a las 4 h de contacto.

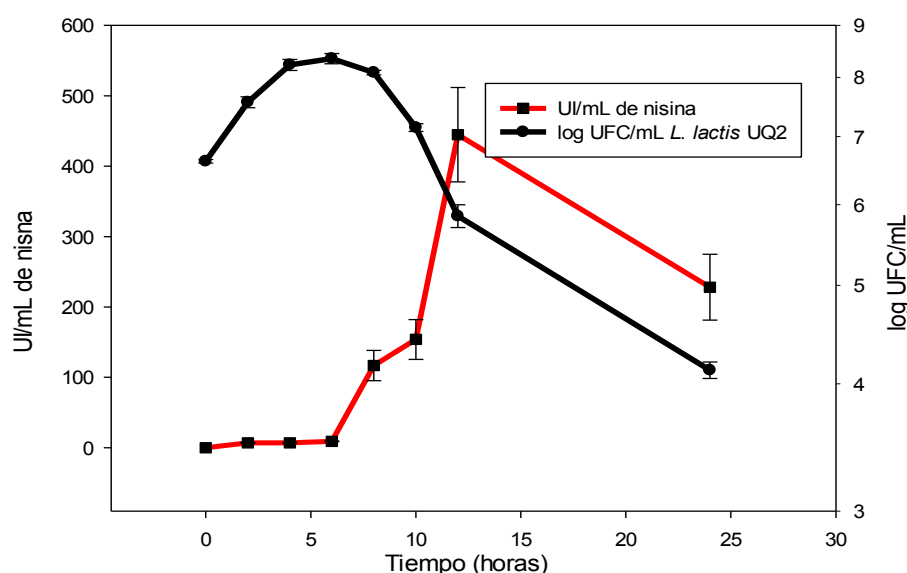
#### **VI.10 Análisis sensorial del queso tipo panela adicionado con nisina y *L. lactis* UQ2 microencapsuladas**

A los 10 días de elaborado el queso adicionado con el cultivo protector microencapsulado y nisina microencapsulada se llevó a cabo el análisis sensorial del queso. Se usó un panel no entrenado de 100 personas a las cuales se les pidió que evaluaran la aceptabilidad del queso en aroma, textura y sabor utilizando una escala hedónica de 10 puntos.

## VII. Resultados y discusión

### VII.1 Fermentación con la cepa nativa de *L. lactis* UQ2

La primera fermentación fue llevada a cabo a nivel biorreactor, usando la cepa nativa de *L. lactis* UQ2 siguiendo el procedimiento descrito por Piña *et al.* (2010), usando medio de cultivo alternativo a base de suero lácteo. En la figura 8 se observa una actividad máxima de nisina de 444 UI/mL a las 12 h y una población de 8.3 log UFC/mL a las 6 h de iniciada la fermentación donde se controló el pH en 6.5, la temperatura se mantuvo 30 °C con una agitación de 200 rpm y un flujo de aire de 1 L/min. González-Toledo *et al.* (2010), realizaron un diseño de experimentos para encontrar las condiciones óptimas de producción de nisina usando la misma cepa, variando la cantidad de suero de leche suplementado, diferentes cantidades de nitrógeno y diferentes condiciones de aireación, obteniendo una actividad de 178 UI/mL de nisina a las 6 h, lo que equivale a 0.74 mg/(L h). En nuestro estudio se logró una producción de 11.1 mg/L equivalente a 0.92 mg/(Lh) de nisina superando lo obtenido en el estudio inmediato anterior.



**Figura 8.** Actividad de nisina y crecimiento de *L. lactis* UQ2 durante la fermentación

Los resultados obtenidos en esta fermentación difieren de los obtenidos por Piña *et al.* (2010), ya que ellos reportaron una actividad máxima de 575 UI/mL de nisina a las 12 h con una población de 7.82 log UFC/mL, en este



reporte se evaluó el efecto del pH obteniendo que el óptimo fue de 6.5 después de realizar fermentaciones a valores de pH de 5.5, 6 y 6.5. Teniendo una diferencia de 131 UI/mL entre ambas fermentaciones, en nuestro estudio la población máxima se alcanzó a las 6 h de fermentación, donde comenzó la producción de nisina. Este es un comportamiento atípico en la producción de este metabolito, ya que está relacionado con la fase exponencial de crecimiento por tratarse de un metabolito primario. Un comportamiento similar lo reportan García-Parra *et al.* (2011), realizando el crecimiento en leche descremada, ellos corrieron varias fermentaciones usando diferentes cantidades de nisina como inductor y encontraron que administrando 1.86 UI/L se incrementa sustancialmente la producción de nisina, alcanzaron la fase estacionaria también a las 6 h, y una máxima actividad de nisina de 79 UI/mL. Este efecto se atribuye a la adición de nisina como inductor, estrategia también utilizada en nuestra fermentación.

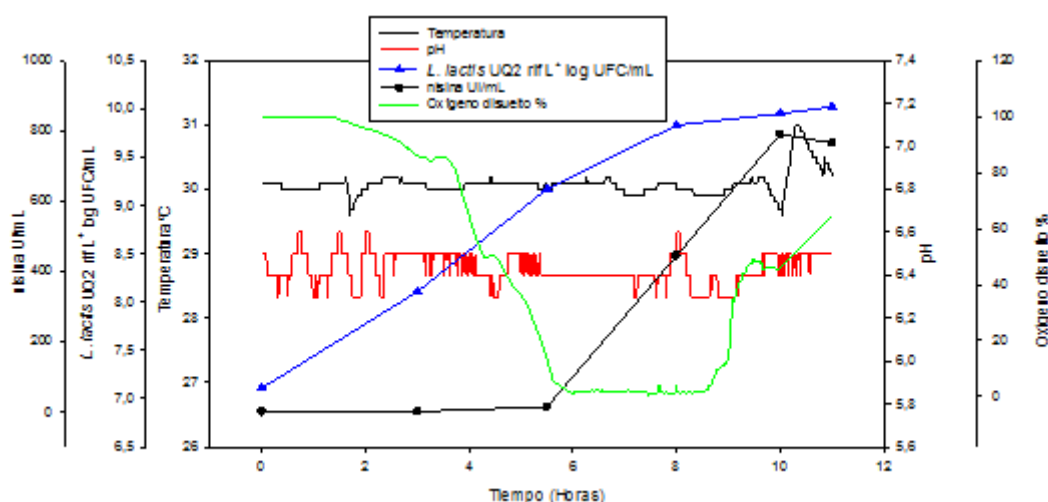
Se puede observar en el cuadro 4 que la fermentación inició con casi 7 log UFC/mL, lo que pudo impedir una producción mayor de nisina, ya que en las fermentaciones realizadas por Piña *et al.* (2010), la fermentación inicia con una población de 6 log UFC/mL aproximadamente. Considerando que la nisina es un metabolito primario, que se secreta al medio durante la fase exponencial, el corto periodo de esta fase en nuestra fermentación pudo ser la razón por la cual se obtuvo menor cantidad de nisina.

**Cuadro 4.** Población de *L. lactis* UQ2 y actividad de nisina

<b>Tiempo (h)</b>	<b><i>L. lactis</i>UQ2 log UFC/mL</b>	<b>Actividad UI/mL</b>
0	6.61±0.026	0
2	7.56±0.093	6.98±0.56
4	8.23±0.102	6.92±0.38
6	8.34±0.096	9.02±0.59
8	8.08±0.041	116.7±21.44
10	7.14±0.062	153.85±28.37
12	5.84±0.15	444.83±66.96
24	4.12±0.076	228.14±46.74

## VII.2 Fermentación con la cepa trasformada de *L. lactis* UQ2

En la figura 9 se muestran las variables que se controlaron durante la fermentación en el biorreactor instrumentado, la temperatura y pH se mantuvieron constantes en 30 y 6.5 respectivamente, la agitación se mantuvo en 200 rpm mientras que el porcentaje de oxígeno disuelto en el medio dependió del crecimiento microbiano, ya que se administró un flujo de aire de 1 L/min durante toda la fermentación. Podemos notar que en las primeras 4 h la cantidad de oxígeno en el medio se mantuvo constante y durante la fase exponencial se vio un decremento en el porcentaje de oxígeno disuelto. Jozala *et al.* (2007), demostraron que se requiere un flujo de aire para obtener una mayor producción de nisina. Esto se debe a una mayor demanda de oxígeno durante la fase exponencial.



**Figura 9.** Producción de nisina por *L. lactis* UQ2, pH, temperatura constante, se muestra el porcentaje de oxígeno disuelto durante la fermentación

Al analizar el crecimiento de la cepa modificada *L. lactis* UQ2 en el cuadro 5, se observa que el procedimiento de adaptación permitió que se alcanzara la fase exponencial desde las primeras h de la fermentación, y la fase estacionaria a las 10 h. La producción de nisina fue casi nula durante las primeras 5 h, pero la producción incrementó sustancialmente en la segunda fase de la fermentación. Esto concuerda con lo reportado por Piña *et al.* (2010), donde no hubo producción de nisina en las primeras 3 h de su fermentación.

De forma similar Nefise *et al.* (2011), reportaron poca producción de nisina usando la cepa *L. lactis subsp MA23*, durante las primeras 5 h, la máxima actividad 13,000 UA/mL, se alcanzó a las 8 h.

Por otro lado Gujarathi *et al.* (2008), reportan una actividad máxima de nisina de 6,800 UA/mL usando un cultivo optimizado de *L. lactis* MTCC 440. Es importante mencionar, que estos trabajos se reportan las unidades de actividad arbitrarias como UA/mL, por lo que no es posible compararlos con nuestro estudio.

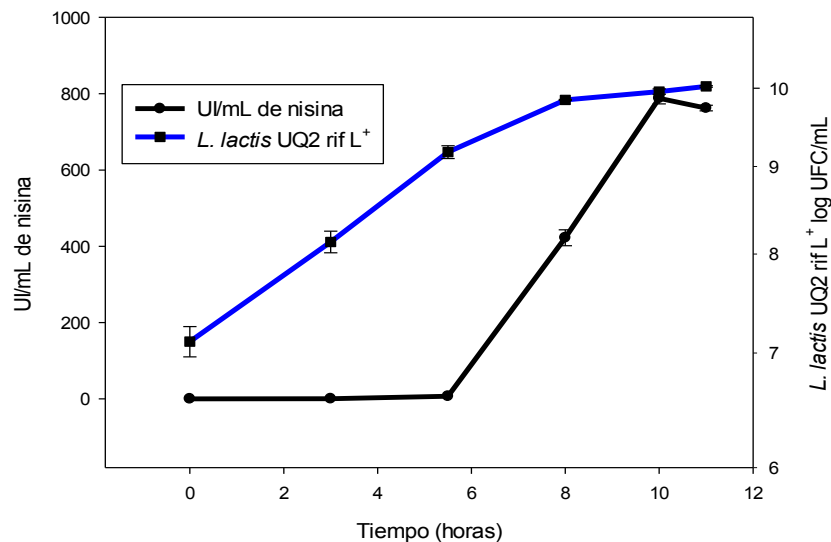
Pongtharangkul y Demirci (2006), encontraron una máxima actividad de nisina de 579 y 1,100 UI/mL usando glucosa y sacarosa como fuentes de carbono respectivamente, controlando el pH en 6.8; Li *et al.* (2001), reportaron una producción de 692 hasta 1875 UI/mL utilizando medios comerciales como MRS y M17 entre otros.

**Cuadro 5.** Población de *L. lactis* UQ2 transformada y actividad de nisina

<b>Tiempo (h)</b>	<b><i>L. lactis</i> UQ2 log UFC/mL</b>	<b>Actividad UI/mL</b>
0	7.1 ± 0.14	0 ± 0
3	8.13 ± 0.11	0.48 ± 0.14
5,5	9.17 ± 0.07	7.11 ± 0
8	9.84 ± 0.006	422.55 ± 20.95
10	9.95 ± 0.036	787.91 ± 14.71
11	10.02 ± 0.01	762.42 ± 7.35

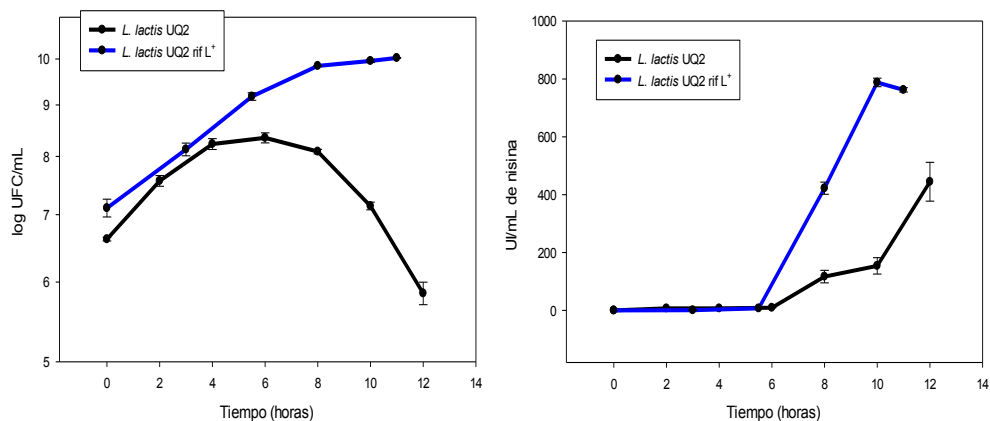
Por otro lado Alegría *et al.* (2010), utilizando la cepa *L. lactis subsp lactis* NCDO 497, y medios de bajo costo basados en subproductos lácteos y cárnicos, lograron una máxima producción de 196 UI/mL. En nuestra fermentación se logró una máxima producción de nisina a las 10 h, con 787.91 ± 14,71 UI/mL lo que equivale a 19.6 mg/L y una producción de 1.96 mg/(L h). Resultados superiores al obtenido por Piña *et al* (2010), reportando una producción de 575 UI/mL a las 12 h, usando una cepa nativa lo que equivale a 14.37 mg/L y una producción de 1.19 mg/(L h).

La nisina, por tratarse de péptido, tiende a degradarse por las propias enzimas proteolíticas que secreta la bacteria, además de que por su naturaleza hidrofóbica tiende a formar aglomerados de nisina y puede llegar a perder actividad, por lo que es clave conocer la hora exacta cuando se tiene la mayor cantidad en el medio. En nuestra fermentación la hora 10 es muy importante, ya que es cuando se tiene la mayor cantidad de nisina y se debe frenar la fermentación para obtener la máxima cantidad de metabolito en este momento. En la figura 10 el crecimiento de la cepa modificada de *L. lactis*, fue exponencial desde el inicio de la fermentación, hasta aproximadamente las 8 h, este comportamiento es deseado para la producción de nisina, ya que la mayor producción está entre la hora 6 y 10 de fermentación que concuerdan con la segunda parte de la fase exponencial.



**Figura 10.** Actividad de nisina y población de *L. lactis* UQ2 durante la fermentación

En la figura 11 se observa la diferencia entre las dos cepas durante la fermentación. Claramente hay una diferencia en el crecimiento y la producción de nisina, siendo mayor en ambos parámetros la bacteria modificada.



**Figura 11.** Crecimiento de *L. lactis* nativa y modificada y actividad de nisina

La población de la cepa transformada de *L. lactis* UQ2 sigue creciendo hasta el final de la fermentación mientras que la cepa nativa llega a la fase estacionaria mucho más rápido, y a pesar de que la producción de nisina comienza casi al mismo tiempo, se ve una gran diferencia en la cantidad de nisina producida en la segunda mitad de la fermentación.

### VII.3 Microencapsulación de nisina

Para la microencapsulación de nisina se utilizaron almidones modificados como materiales de pared, las microcápsulas se obtuvieron mediante secado por aspersión. Se utilizó un rango de temperaturas de entrada entre 130 y 190 °C y de salida entre 52 y 79 °C, la bomba y el porcentaje de aspiración se mantuvieron constantes en 35 y 95 % respectivamente. En el cuadro 6 muestran los resultados de la microencapsulación de nisina donde se especifican la temperatura de entrada y de salida, actividad de nisina por gramo, porcentaje de recuperación de sólidos y finalmente la eficiencia. Este último parámetro es de los más importantes, ya que se calcula comparando la cantidad de nisina que entra al proceso contra la que sale después del secado. Con la temperatura de entrada de 175 °C se tuvo la mayor eficiencia, con 65.7 %, con una actividad de 6,730 UI/g de nisina en el microencapsulado. En este tratamiento hubo una menor pérdida de actividad, además de una mayor recuperación de sólidos y una mayor cantidad de nisina por gramos de microencapsulado. Kopermsub *et al.* (2012), realizaron la nanoencapsulación de nisina en niosomas, las cuales son pequeñas esferas formadas por diversas

capas de lípidos sintéticos. En este trabajo se usaron surfactantes no iónicos como Span 80 y polietilenglicol mediante el método de extrusión, obteniendo una eficiencia de encapsulación de apenas 11.38 % con un tamaño de partícula de 228 nm. Una eficiencia que representa casi 5 veces menor que lo obtenido en nuestro trabajo. Da Silva *et al.* (2012), microencapsularon nisina con liposomas usando lecitina parcialmente purificada de soya y colesterol como materiales de pared, mediante el método de hidratación con película delgada; obteniendo una eficiencia de 88 % con un tamaño de partícula de 216 nm. Sin embargo, las microcápsulas no presentaron los resultados de actividad esperada, probablemente debido a la poca afinidad del material de pared utilizado (colesterol) con los lípidos de la membrana celular de los microorganismos de prueba. da Silva *et al.* (2010), microencapsularon nisina mediante liposomas por tres metodologías: fase reversa, película hidratada tipo sonda y película hidratada tipo baño de ultrasonido, obteniendo eficiencias de 25, 50 y 100 % respectivamente, con tamaño de partículas 148 hasta 190 nm. A pesar de que en la última técnica mencionada se obtuvo una eficiencia muy grande, la actividad de nisina se vio disminuida, llegando a caer de 1,600 a 400 UA/mL a los 10 días de almacenamiento a 4 °C. Este comportamiento no se ve en la nisina microencapsulada en nuestro trabajo, ya que se mantiene íntegra su actividad en almacenamiento por 6 meses a 4 °C en 6647.2±51.5 UI/g.

**Cuadro 6.** Resultados de la microencapsulación de nisina usando diferentes temperaturas de entrada y de salida.

Temperatura entrada °C	Temperatura salida °C	Nisina UI/g	Recuperación de solidos %	Eficiencia %
190	79	6090.48±72.09	75.88	59.61
175	74	6730.2±54.07	77.65	65.70
160	68	6340.97±72.09	74.18	59.73
145	68	5830.99±0	75.69	57.14
130	52	5830.99±0	67.01	50.58

La termoresistencia de la nisina es muy importante en este proceso de microencapsulación, ya que se usan temperaturas de entrada elevadas, esto puede ser una limitante para microencapsular metabolitos sensibles al calor. La nisina al igual que otras bacteriocinas no presenta estructura terciaria, lo que la hace termoresistente. Se ha reportado que la nisina puede resistir temperaturas de esterilización (Lloyd y Drake, 1975). La microencapsulación, mediante secado por aspersión, es un proceso que toma 1 a 1.5 s (B-290 Manual de instrucciones, versión G)

Por otro lado Xiao *et al.* (2011), microencapsularon nisina mediante secado por aspersión usando zeína como material de pared, obteniendo una eficiencia de 57.89 % con una temperatura de entrada de 95 °C. Estos resultados son muy similares a los obtenidos en nuestra investigación, ya que nosotros obtuvimos eficiencias de 50 hasta el 65 %. En un trabajo similar Xiao y Zhong (2011), también microencapsularon nisina usando zeína combinada con glicerol y Tween 20; combinando zeína-glicerol obtuvieron eficiencias de 34 a 43 % y de 41 a 54 % usando zeína-Tween 20. Esto demuestra la importancia de la selección de los materiales de pared, ya que el porcentaje de sólidos y la combinación de dos o más materiales, puede ser fundamental para obtener una mayor recuperación de sólidos y una mayor eficiencia.

#### **VII.4 Microencapsulación de la cepa transformada de *Lactococcus lactis***

##### **UQ2**

En estudios realizados anteriormente por Abarca (2012), en el laboratorio de biotecnología de la UAQ se microencapsuló la cepa *L. lactis* UQ2 donde se determinó la mezcla más adecuada de los materiales de pared para la microencapsulación. La viabilidad en estos experimentos fue muy baja alcanzando un máximo de 6.29% de sobrevivencia celular, esto concuerda con lo dicho por varios autores que reportan una sobrevivencia del 1 al 10% como máximo para este tipo de procesos, (Heidebach *et al*, 2012). Posteriormente Velázquez (2013), utilizó temperaturas más bajas para el proceso de microencapsulación de la misma cepa, alcanzando una sobrevivencia de 21.5 %. En el cuadro7 se muestran los parámetros del proceso microencapsulación de la cepa transformada de *L. lactis* UQ2 más relevantes de nuestra

investigación. Se utilizaron temperaturas de entrada de 100-140 °C, variando la capacidad de la bomba. La temperatura de salida osciló entre los 46 y 73 °C. Cabe destacar que la temperatura de salida está relacionada con la temperatura de entrada y la capacidad de la bomba. De acuerdo con lo sugerido por O’Riordan *et al.* (2001), temperaturas de entrada similares a 120°C y temperaturas de salida inferiores a 60°C son las condiciones de operación adecuadas para la obtención de la mayor sobrevivencia de las células de *Bifidobacterium* mediante secado por aspersión.

Como se puede observar en el cuadro 7, en el primer secado realizado a una temperatura de entrada de 140 °C, se obtuvo una población 9.5 log UFC/g con una viabilidad de 7.7%, lo que concuerda con lo obtenido por Abarca en 2010, usando temperatura de entrada de 160 °C. Según lo reportado por Shahin-Zomorodi *et al.* (2011), microencapsularon *L. plantarum* logrando una población máxima de 8.15 log UFC/g y reportan que una viabilidad adecuada son aquellas superiores a 8.0 log UFC/g. Se puede observar, en el cuadro que en nuestro estudio, se logró obtener hasta 10 log UFC/g de población, y aún la más baja obtenida en nuestra investigación es superior a lo obtenido en este reporte.

**Cuadro 7.** Resultados de la microencapsulación de *L. lactis* UQ2, en base a temperatura de entrada, temperatura de salida y porcentaje de alimentación.

Proceso Micro-encapsulado	Temperatura entrada °C	Temperatura salida °C	Bomba %	Recuperación de sólidos %	<i>L. lactis</i> UQ2 log UFC/g	Viabilidad %
1	140	73	25	52.0	9.51±0.03	7.7
2	130	73	25	59.0	9.2±0.07	0.8
3	130	69	20	53.7	9.87±0.13	8.0
4	120	64	20	73.9	10.4±0.04	2.0
5	100	46	20	30.3	8.5±0.05	0.4
6	100	54	17	73.2	10.3±0.04	9.0
7	100	54	17	75.3	10.1±0.26	18.9
8	100	58	17	72.9	10.3±0.01	43.6
9	100	58	17	75.3	10.2±0.03	16.3

En el segundo bloque de secados se utilizaron temperaturas de entrada de 130 °C. En estos secados se varió la velocidad de alimentación de la bomba, con 20 y 25 %. Hubo una gran diferencia entre ambos secados, ya que en el que se usó la bomba a 25 % de su capacidad la población y la



sobrevivencia bacteriana se vieron muy disminuidas con una población de 9,2 UFC/g y una sobrevivencia de 0.76 % comparado con una población de 9,87UFC/g y una sobrevivencia de 8.1 % cuando la bomba se redujo al 20 %. Posteriormente para el proceso 4 se redujo la temperatura de entrada a 120 °C y la bomba se mantuvo en 20 %, aquí se puede observar que la temperatura de salida disminuye 5 °C. A pesar de que la población que se obtuvo fue la más alta hasta el momento con 10.4 UFC/g, la sobrevivencia no fue la esperada con únicamente el 2.0 %.Fritzen-Freire *et al.* (2012), obtuvieron una población muy similar de *Bifidobacterium* BB-12 alcanzando los 10.5 log UFC/g mediante secado por aspersión utilizando leche descremada reconstituida con inulina y oligofruktosa.

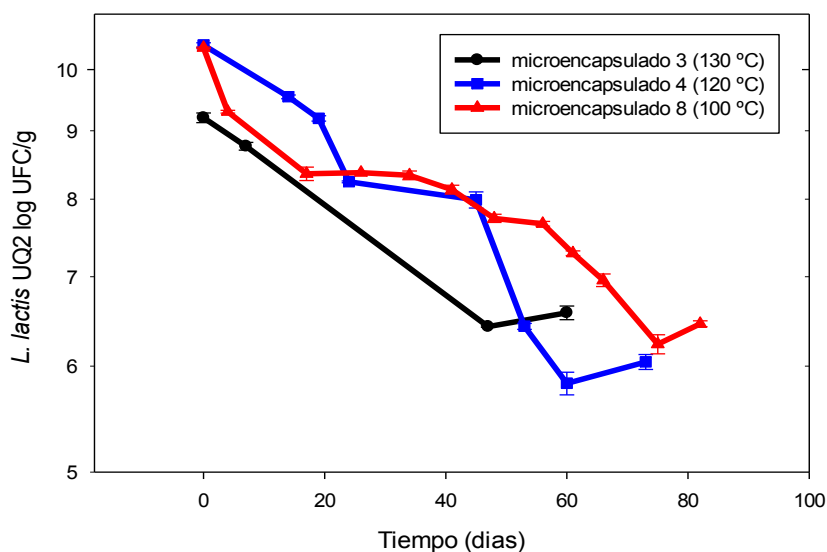
Posteriormente, al bajar la temperatura a 100 °C, no se obtuvieron los resultados esperados, posiblemente debido a que la alimentación era muy alta para esa temperatura y no se obtuvo un polvo con la humedad esperada. Por esta razón se decidió disminuir la capacidad de la bomba a 17% para el secado número 6. Obteniendo una población y sobrevivencia de 10.3 UFC/g y 9.5 % respectivamente. Los últimos 4 secados se llevaron a cabo con una temperatura de entrada de 100 °C y la bomba 17 %.Hay una marcada diferencia entre los secados a temperatura de 100 °C comparado con los demás, ya que se logró una sobrevivencia de hasta 43.6 % en el secado número 8 y la recuperación de sólidos es mucho mayor a esta temperatura, estando por encima del 73 %. Hay que tomar en consideración que la recuperación de bacterias depende mucho de una buena activación y crecer de manera adecuada la cepa, ya que un mayor número de bacterias que entren al proceso de microencapsulación, mayor será la cantidad de bacterias por gramo en el secado. Esta viabilidad de 43.6 % es la mayor obtenida en nuestro grupo de trabajo. Como se mencionó anteriormente las viabilidades para este tipo de microencapsulado oscilan entre el 1 y el 10 %, en su mayoría debido a las altas temperaturas utilizadas durante el secado. Hay otros métodos de microencapsulación de bacterias que no usan temperaturas tan elevadas. Chavarri *et al.* (2010), microencapsularon *Lactobacillus gasseri* y *Bifidobacterium bifidum* mediante el método de extrusión usando quitosano y alginato como material de pared, además de agregar agentes prebióticos como quercetina. Ellos obtuvieron poblaciones de aproximadamente 9 log UFC/g

cuando no usaron la quercetina con viabilidades de 9.5 % para ambas bacterias. Usando quercetina obtuvieron de 5.5 a 6 log UFC/g con viabilidades de 3% y 4% para *B. bifidobacterium* y *L. gasseri*, respectivamente.

Donthidi *et al.* (2010), microencapsularon *Lactococcus lactis* spp *lactis* NCIMB 6681 mediante el método de extrusión, usando alginato en combinación con almidón y lecitina. Se obtuvieron poblaciones de aproximadamente 8.5 log UFC/g y viabilidades de 85 %. Cabe destacar que este es un método muy benévolo para la sobrevivencia bacteriana, ya que se utilizan temperatura bajas para realizarlo, pero tiene la desventaja que el tamaño de partícula es mayor (500-1000 µm) comparado con otros métodos como el secado por aspersion, y puede llegar a afectar las características sensoriales del producto al que se vaya a incorporar; ya que según lo reportado por O’Riordan *et al.* (2001) un tamaño de partícula menor de 10 µm no afecta las propiedades sensoriales de la mayoría de los productos.

#### **VII.5 Estudio de la estabilidad de *L. lactis* UQ2 microencapsulado**

Para estudiar el comportamiento de la cepa microencapsulada se llevó a cabo el monitoreo de la población a lo largo de varias semanas de almacenamiento a 4 °C. Se muestra en la figura 12 la estabilidad de 60 a 80 días en la que disminuye la población de aproximadamente a 6 log, cabe mencionar que para inocular la bacteria en cantidad suficiente se requiere de muy poca cantidad de microencapsulado, por lo que se puede usar aún después los 3 meses de almacenamiento. Se observa en la figura que hay una marcada diferencia entre el microencapsulado a temperatura de 130 °C con los restantes, ya que el tiempo de vida promedio es mayor cuando se usaron temperaturas más bajas.



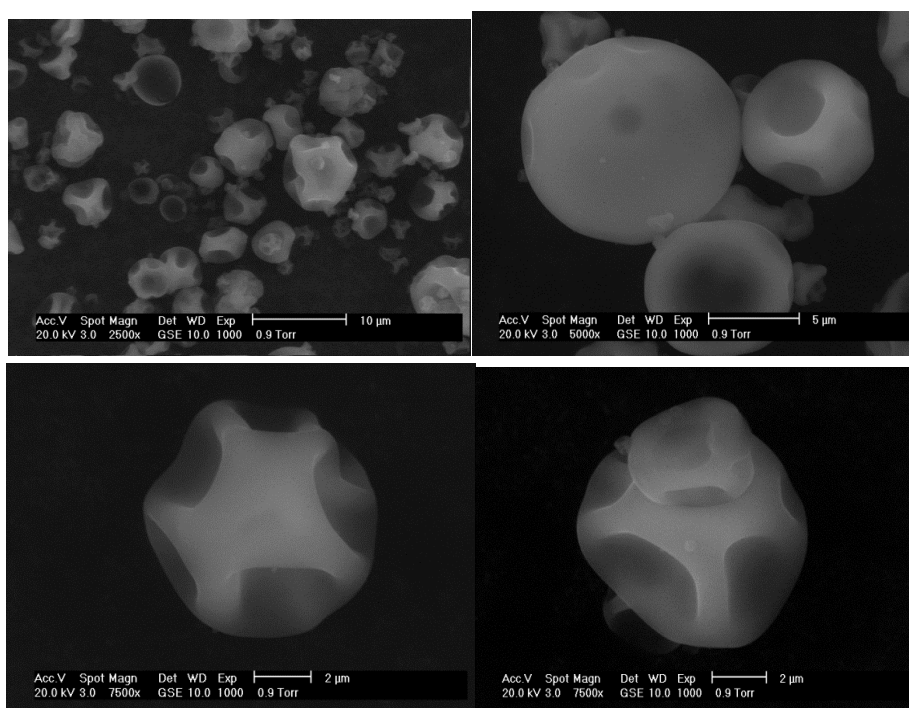
**Figura 12.** Viabilidad de *L. lactis* UQ2 microencapsulado en un periodo de 80 días de almacenamiento a 4°C.

En los microencapsulados con temperaturas menores de 120 °C hay una reducción de apenas 2 log a los 40 días de almacenamiento. En el reporte mencionado anteriormente de Chavarri *et al.* (2010) monitorearon la población de *L. gasseri* y *B. bifidum* durante 4 semanas a 4 °C microencapsulados en quitosano y alginato, iniciando en 9.7 log UFC/g aproximadamente para ambas cepas y después de 28 días la población disminuyó casi 2 log UFC/g. Esto concuerda con nuestros resultados, principalmente para las temperaturas de secado mayor a 120 °C, ya que en los microencapsulados a 100 °C hubo esa reducción hasta los 45 días. Por otro lado, Rodríguez *et al.* (2007), reportan una reducción de 2 log iniciando con una población de 8.1 log UFC/g finalizando con una población de 6.7 log UFC/g en 30 días y O’Riordan *et al.* (2001), reportaron una disminución de más de 4 log de *Bifidobacterium* PL1 a los 20 días de almacenamiento a temperatura ambiente.

### VII.6 Morfología de las microcápsulas de *L. lactis* UQ2

En las micrografías presentadas en la Figura 13, se puede observar que en general las microcápsulas presentan una formación esférica y homogénea con tamaños de microcápsulas que oscilan alrededor de 6 a 8 µm de diámetro. Estos resultados son de menor tamaño que lo reportado por Jiménez-Pranteda *et al.*, (2012) quienes encapsularon *Lactobacillus plantarum* y obtuvieron

tamaños de cápsulas de 2.47 mm mediante la tecnología de extrusión y Donthidi *et al.* (2012), también mediante microencapsulación por extrusión obtuvieron un tamaño de partícula de 2 mm. Por otra parte Rodríguez *et al.*, (2009), reportan la microencapsulación de *Bifidobacterium bifidum* mediante la técnica de secado por aspersión, y obtienen tamaños de microcápsulas 10-12  $\mu\text{m}$ . También O’Riordan *et al.* (2001), obtuvieron tamaño de partícula de menos de 10  $\mu\text{m}$  usando secado por aspersión para microencapsular *Bifidobacterium* PL1.



**Figura 13.** Microscopia electrónica de barrido de las microcápsulas de *L. lactis* UQ2 obtenidas mediante secado por aspersión.

### VII.7 Elaboración de queso tipo Panela adicionado con *Lactococcus lactis* UQ2 y nisina y su efecto en *Listeria monocytogenes* EGDe.

Se elaboró queso tipo Panela inoculado con la cepa transformada de *L. lactis* UQ2 microencapsulada, nisina microencapsulada y nisina comercial (MP Biomedical, LLC). Como bacteria reto se utilizó *L. monocytogenes* EGDe, la cual es una cepa modificada genéticamente y bioluminiscente, que nos permite visualizar mediante microscopio de fluorescencia la población de *Listeria* en el queso. Los tratamientos se describen como se muestra en el cuadro 8.

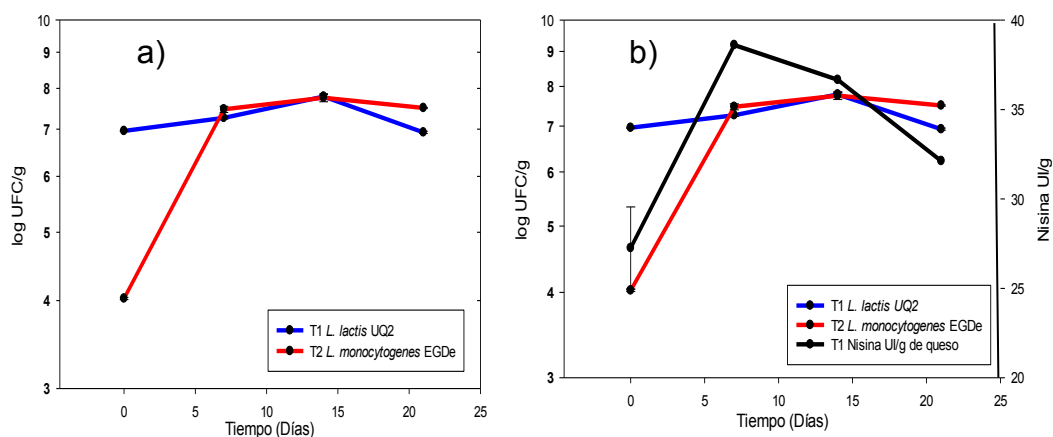
**Cuadro 8.** Población de *L. lactis* UQ2, *L. monocytogenes* EGDe y concentración de nisina en los quesos.

Quesos (Tratamientos)	<i>L. lactis</i> UQ2 (UFC/g)	<i>L. monocytogenes</i> EGDe (UFC/g)	Nisina Microencapsulada (ppm)	Nisina comercial (ppm)
T1	1x10 <sup>7</sup>			
T2		1x10 <sup>4</sup>		
T3	1x10 <sup>7</sup>		5	
T4	1x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>4</sup>		
T5	1x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>4</sup>	5	
T6		1x10 <sup>4</sup>	12.5	
T7		1x10 <sup>4</sup>		12.5

El queso elaborado en el T1, se inoculó con el cultivo protector para evaluar el crecimiento de la bacteria y la producción de nisina durante los 21 días de almacenamiento a 4 °C. El queso T2, se inoculó únicamente con la cepa de *L. monocytogenes* EGDe para monitorear su crecimiento. El queso T3, se consideró *L. lactis* UQ2 combinada con nisina como inductor para evaluar el crecimiento de la cepa y la producción de nisina. El queso T4, fue el primer reto de *L. lactis* UQ2 contra *L. monocytogenes* EGDe, en este queso se inocularon 7 log UFC/g del cultivo protector, y 4 log UFC/g de *L. monocytogenes* EGDe. En el queso T5 se inocularon las mismas poblaciones de ambas bacterias, pero en este tratamiento se agregaron 5 ppm de nisina como inductor. De acuerdo con lo reportado por Pongtharankul y Demirci. (2006), una pequeña cantidad de nisina puede actuar como autoinductor y desencadenar la producción de la misma. En el queso T6 y T7 se evaluó el efecto de la nisina microencapsulada y la nisina comercial sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* EGDe.

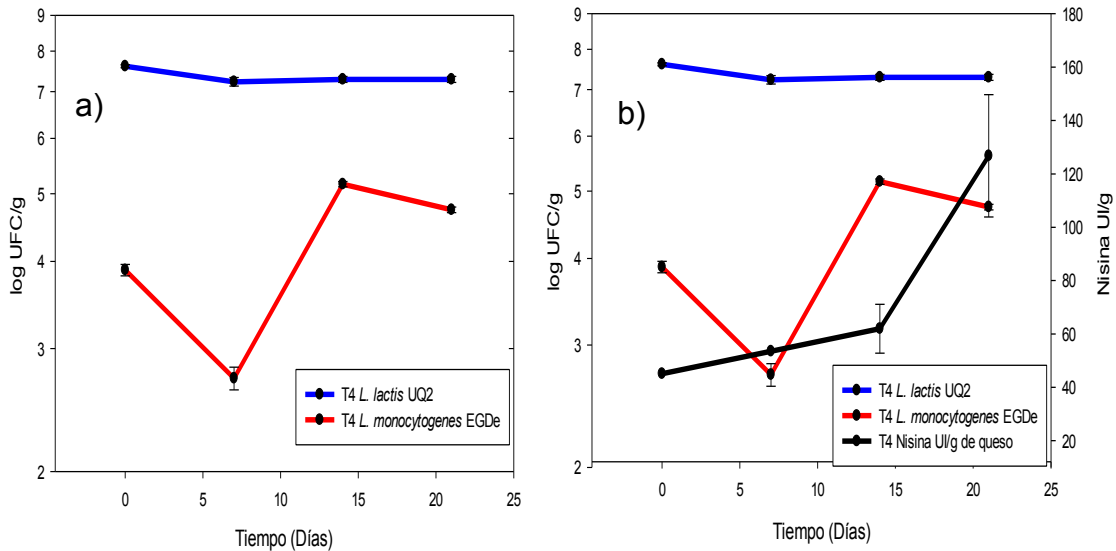
En la figura 14 se muestra que el queso tipo panela es un buen sustrato para el crecimiento de ambas bacterias, ya que *L. monocytogenes* EGDe puede crecer hasta 3 log en la primera semana de almacenamiento en refrigeración cuando existe una contaminación inicial de 4 log UFC/g. Esto representa un riesgo muy alto, ya que un queso contaminado con esta bacteria puede llegar a presentar un riesgo principalmente para las personas inmunocomprometidas. A las 2 semanas de almacenamiento ambas bacterias

llegan a un crecimiento máximo de 7.7 log UFC/g para mantenerse o disminuir un poco su población hasta la tercera semana. La producción de nisina en el queso control T1 de *L. lactis* UQ2 fue rápida durante la primera semana alcanzando 38 UI/g y disminuyendo gradualmente hasta el final del almacenamiento para finalizar en 32 UI/g.



**Figura 14.** a) Quesos tratamiento T1 y T2: *L. lactis* UQ2 y *L. monocytogenes* EGDe almacenados durante 21 días y b) Producción de nisina en T1.

En la figura 15 se muestran las poblaciones de *L. lactis* UQ2 y *L. monocytogenes* EGDe y la actividad de nisina en el T4. Se ve claramente una disminución de más de 2 log UFC/g en la población de *L. monocytogenes* después de los 21 días de almacenamiento comparado con el control T2. En la primera semana hubo una disminución de 1 log UFC/g de *L. monocytogenes*, pero posteriormente mostró un desarrollo hasta los 14 días llegando a los 5 log UFC/g, y finalmente una ligera disminución hasta el final del almacenamiento. La población de *L. lactis* UQ2 se mantuvo en más de 7 log UFC/g, por lo cual se puede atribuir un efecto sobre el desarrollo de *L. monocytogenes* principalmente por la producción *in situ* de nisina, la cual fue en aumento desde el inicio hasta el final del almacenamiento alcanzando las 126 UI/g.

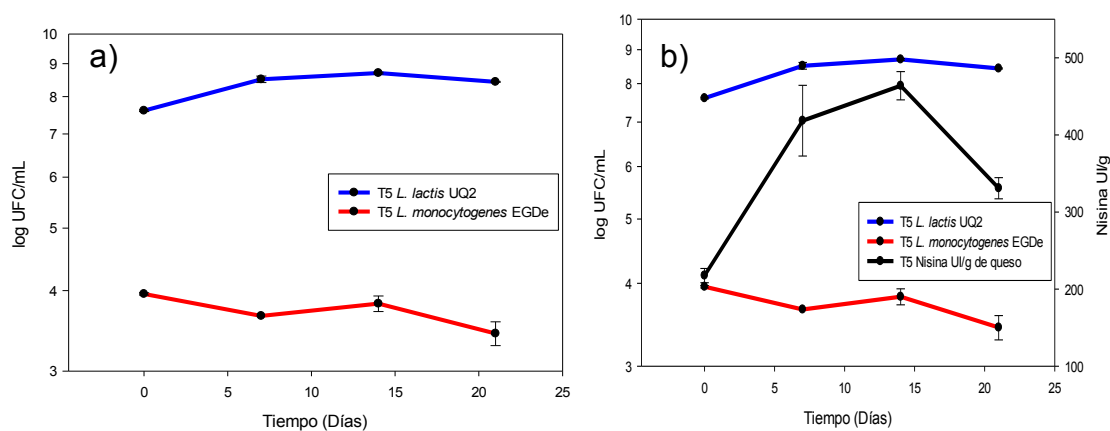


**Figura 15.** a) Poblaciones de *L. lactis* UQ2 y *L. monocytogenes* EGDe en el queso T4 con ambas bacterias y b) producción de nisina

Como se puede observar en la figura anterior, una concentración de 7 log UFC/g de *L. lactis* UQ2 puede disminuir hasta 1 log de *L. monocytogenes* EGDe en 7 días en un queso contaminado con 4 log UFC/g, lo que representa una gran ventaja, ya que en la realidad es muy complicado encontrar quesos con este nivel de contaminación. Después de la primera semana de almacenamiento se observó un incremento en la población de *L. monocytogenes* EGDe, el cual se puede atribuir a un efecto bacteriostático de la nisina y una posible adaptación de la cepa al ambiente del queso.

En la figura 16 se muestra el queso T5 de *L. lactis* UQ2, *L. monocytogenes* EGDe, pero suplementada con 5 ppm de nisina como inductor. En este caso hay una marcada diferencia en el desarrollo de ambas cepas. En primer lugar se observa una disminución en la población de *L. monocytogenes* EGDe con respecto al T2, ya que durante los 21 días de almacenamiento no hay crecimiento de la cepa, comenzando en 3.7 log UFC/g y disminuyendo a 3.4 log UFC/g. En cuanto al crecimiento de *L. lactis* UQ2 se muestra una notoria diferencia comparada con T1, T3 y T4, ya que en este caso la población alcanza más de 8.5 log UFC/g desde la primera semana de almacenamiento con una concentración máxima de nisina a los 14 días con 463 UI/g. Este comportamiento se puede atribuir a la reducida competencia que tiene el cultivo protector, ya que al no haber crecimiento de *L. monocytogenes* debido a la

producción *in situ* de nisina, el cultivo protector tiene mayor disponibilidad de nutrientes y una mejor colonización de queso.

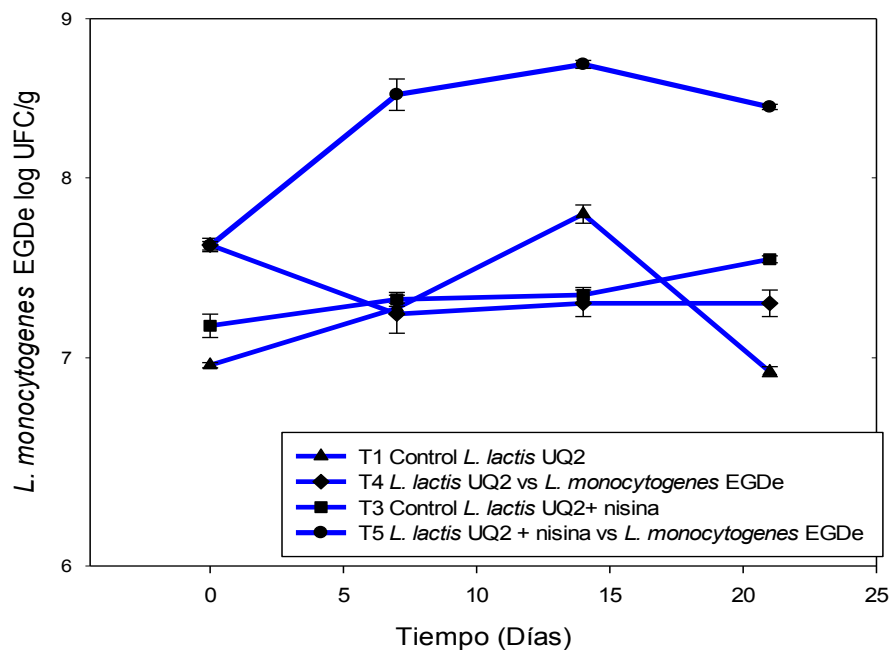


**Figura 16.** a) Poblaciones de *L. lactis* UQ2 y *L. monocytogenes* EGDe y b) producción de nisina en queso T5.

En este caso se ve que la adición de nisina como molécula inductora tiene un papel muy importante, ya que hay un claro aumento en su producción. Esto concuerda con lo reportado por Pongtharangkul y Demirci. (2006), ellos reportan que la biosíntesis de la nisina está regulada por un mecanismo denominado percepción en *quorum*, en el cual la nisina actúa como molécula autoinductora.

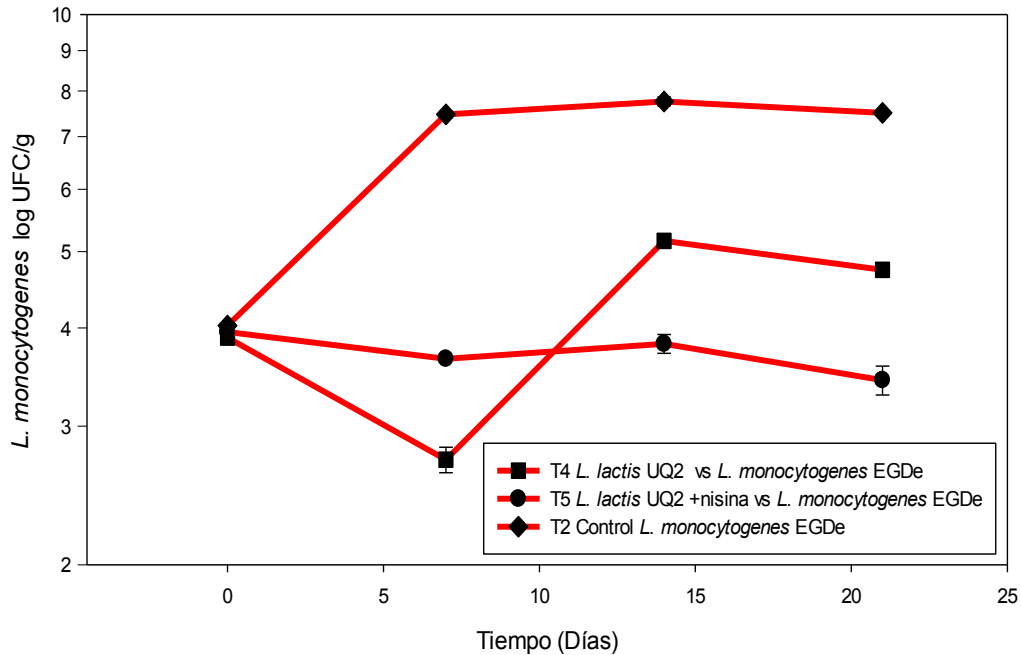
En la figura 17 se ve de manera más clara la diferencia en el crecimiento de *L. lactis* UQ2 en el queso T5 adicionado con una pequeña cantidad de nisina como inductora contra *L. monocytogenes* EGDe, alcanzando más de 8.5 log UFC/g mientras que el queso control T1 llega a un poco más de 7.5 log UFC/g a los 14 días de almacenamiento. Por otro lado el queso T3 con *L. lactis* UQ2 adicionada con nisina como inductor alcanza los 7.5 log UFC/g hasta los 21 días de almacenamiento y el queso T4 inoculado con ambas bacterias la población de *L. lactis* UQ2 se mantiene en un poco más de 7 log UFC/g durante los 21 días de almacenamiento.





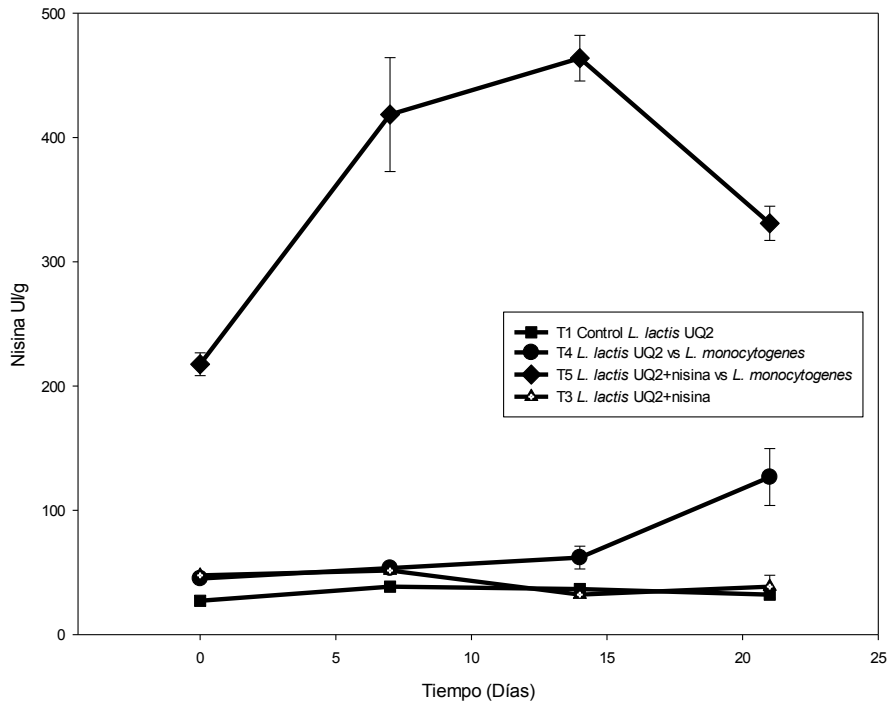
**Figura 17.** Población de *L. lactis* UQ2 en los quesos T1, T3, T4 y T5 almacenados durante 21 días a 4 °C

Si observamos la figura 18, podemos notar la diferencia en el desarrollo de *L. monocytogenes* en el queso T2 y los quesos T4 y T5 inoculados con *L. lactis*UQ2. Hay una diferencia marcada en el queso que se usó la combinación del cultivo protector y la nisina, ya que el queso control T2 *L. monocytogenes* llega a 7.5 log UFC/g mientras que con este tratamiento disminuye a 3.4 log UFC/g habiendo una diferencia de 4 log UFC/g a los 21 días de almacenamiento. Mientras que el queso T3 en el que se utilizó únicamente el cultivo protector contra *L. monocytogenes* EGDe se vio una disminución en la primera semana de casi 5 log UFC/g comparada con T2. Desafortunadamente la población que quedo de *L. monocytogenes* se recuperó y creció 2 log UFC/g la siguientes semanas, para terminar en 4.7 log UFC/g a los 21 días de almacenamiento, habiendo una diferencia de 3 log UFC/g con respecto al T2. Esta reducción se puede tratar de explicar con los resultados mostrados en la figura 18 en la cual se muestra la cantidad de nisina producida en los quesos T1, T3, T4 y T5. Claramente hay una diferencia en la producción de nisina cuando se usó la combinación de nisina más el cultivo protector, ya que además del inductor, hubo una mayor producción sobre todo en las primeras dos semanas de aproximadamente 250 UI/g de queso.



**Figura 18.** Población de *L. monocytogenes* EGDe en los quesos T2, T4 y T5 durante los 21 días de almacenamiento a 4 °C

En la figura 19 se muestra la producción de nisina en los diferentes tratamientos T1, T3, T4 y T5, claramente se ve una diferencia en la producción de nisina en el queso que se inoculó con *L. lactis* UQ2, *L. monocytogenes* EGDe y nisina como inductora, llegando a una actividad máxima de 463 UI/g a los 14 días de almacenamiento. Mientras que en los quesos T1 y T3 *L. lactis* y *L. lactis* + nisina llegan a las 38 UI/g y 51 UI/g respectivamente. Por otro lado en el queso T4 inoculado con ambas bacterias se alcanza una producción de 126 UI/g a los 21 días de almacenamiento, lo cual es suficiente para ver un efecto en el desarrollo de *L. monocytogenes*. Al parecer la presencia de *L. monocytogenes* como competencia por los nutrientes del queso incrementa la producción de nisina, ya que en los quesos inoculados con esta bacteria se registra una mayor producción de la bacteriocina. Este comportamiento se puede atribuir como un método de defensa y competición llevado a cabo por el cultivo protector contra otras bacterias en su hábitat, activando una mayor producción de antimicrobianos.



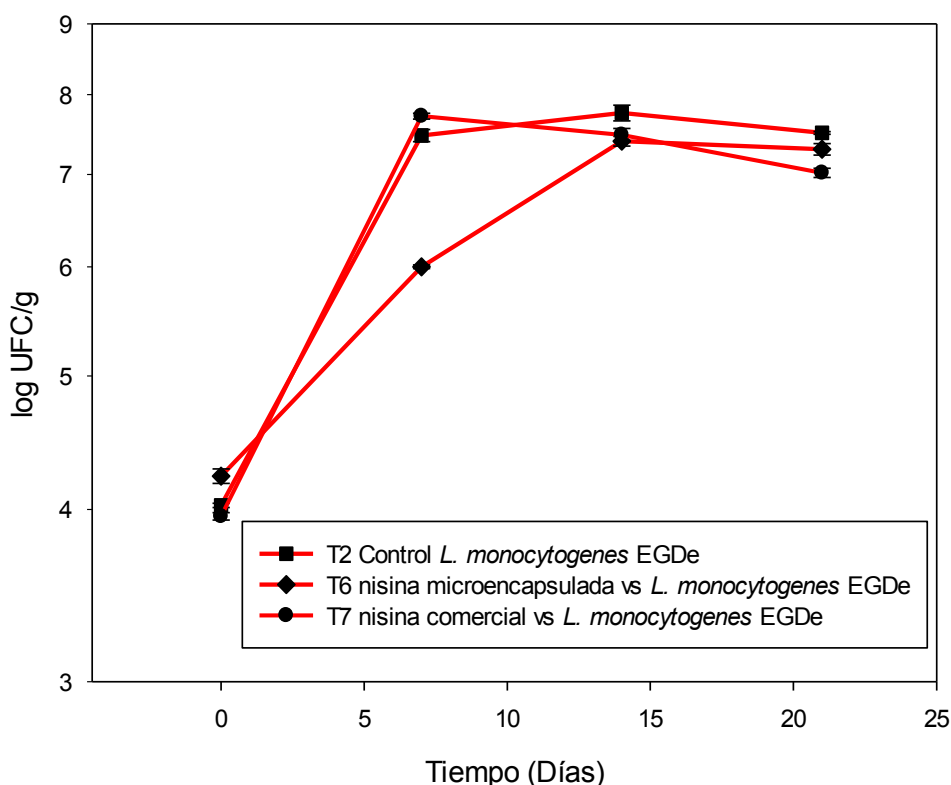
**Figura 19.** Producción de nisina en los quesos T1, T3, T4 y T5 almacenados durante 21 días a 4°C.

En un estudio similar Hamama *et al.* (2012), inocularon queso Jben, un queso fresco tradicional de Marruecos con 6 log UFC/g de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* UL730 y 5 log UFC/g de *S. aureus* J10, logrando una reducción de 3 log UFC/g del patógeno a los tres días de almacenamiento. De igual manera Rilla *et al.* (2003), inocularon queso Vidiago, un queso semi-madurado de España, con 6 log UFC/g de *L. lactis* ssp *lactis* IPLA 729, una cepa productora de nisina para ver el efecto sobre 6 log UFC/g de *Clostridium tyrobutyricum* CECT 4011 a lo largo de 30 días de almacenamiento. Ellos observaron un crecimiento de 9 log UFC/g de *L. lactis* en la primera semana para mantenerse así hasta el final de almacenamiento, mientras que hubo una reducción de 3 log UFC/g del deteriorador a los 14 días de almacenamiento, esto debido a una producción *in situ* de nisina de 1600 UA/g a los 14 días.

Por otra parte en los quesos T6 y T7 se evaluó el efecto que tiene la nisina adicionada por sí sola contra *L. monocytogenes* EGDe. Se administraron 12.5 ppm de nisina microencapsulada y en el otro queso 12.5 ppm de nisina comercial. Se eligió esta concentración ya que es la máxima permitida por la Ley de Aditivos 2012 (Diario oficial, 2012). En este caso no se vio el mismo efecto contra el desarrollo del patógeno. Como se puede observar en la figura

20 el queso T7 con nisina comercial mostró un comportamiento muy similar al control T2, manteniéndose en más de 7 log UFC/g después de la primera semana y conservando esa misma población hasta los 21 días de almacenamiento. Mientras que el T6 con nisina microencapsulada si tuvo un pequeño efecto en el desarrollo de *L. monocytogenes*, sobre todo en la primera semana donde se alcanzó una población de 6 log UFC/g, eso representa 1 log menos que el control. Después de las 2 semanas ambos quesos mostraron un comportamiento muy similar al control.

Por lo que se pude observar que la presencia sólo de nisina, no es suficiente para el control de crecimiento de *L. monocytogenes*.



**Figura 20.** Crecimiento de *L. monocytogenes* EGDe en los queso T2, T6 y T7 usando nisina comercial y nisina microencapsulada producida por *L. lactis* UQ2

Samelis *et al.* (2003), obtuvieron resultados semejantes en queso fresco el cual inocularon con 4 log de *L. monocytogenes* y agregaron nisina comercial 500 UI/g, sin que se detuviera el crecimiento de *Listeria* la cual alcanzó una población de casi 8 log UFC/g a los 20 días, comportamiento muy similar sin la presencia de nisina, a pesar de que en la primeras dos semanas hubo una disminución de casi 1 log UFC/g con respecto al control. Ellos obtuvieron

mejores resultados agregando la nisina directamente a la leche antes de cuajar, en una concentración de 500 UI/ml, logrando una reducción de 4 log UFC/g, a los 20 días con respecto al control, al igual que en nuestra investigación la población de *L. monocytogenes* no dejó de crecer durante el almacenamiento a 4 °C,

Por otro lado da Silva *et al.* (2012) añadieron 0.10 mg/mL y 25 mg/mL de nisina libre y 0.25 mg/mL nisina microencapsulada con liposomas en la leche para elaborar queso fresco, el cual se inoculó con 3 log UFC/g de *L. monocytogenes*. En los quesos adicionados con nisina microencapsulada no se vio una disminución a los 21 días de almacenamiento manteniéndose en 3 log UFC/g. En comparación el queso adicionado con la nisina libre tuvo un efecto bactericida a los 7 días de almacenamiento. Por lo que se puede concluir que la nisina pierde actividad cuando es microencapsulada usando liposomas, comportamiento que no se ve en la nisina microencapsulada en nuestro trabajo.

De acuerdo a la teoría de barreras múltiples, es necesaria la combinación de la nisina con algún otro método de conservación, para obtener efecto marcado en la reducción de algún patógeno. Arqués *et al.* (2005), combinaron nisina con altas presiones hidrostáticas, usando 500 MPa durante 5 min a 10 °C, para reducir de 2.5 log de *S. aureus* en queso. Por otro lado, Capellas *et al.* (2000), combinaron 71 UI/mL de nisina con una presión hidrostática de 500 MPa durante 30 min a 25 °C en queso, logrando una reducción de 2 log en bacterias mesofílicas aerobias.

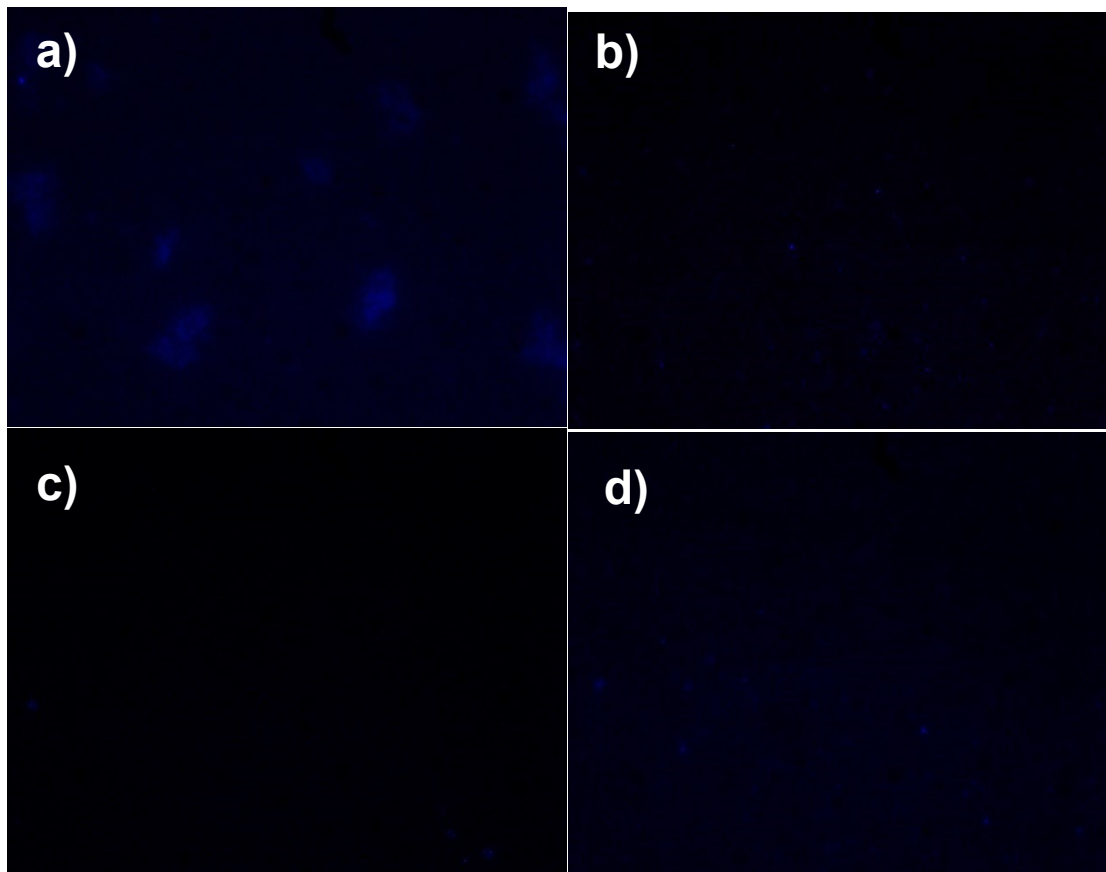
El uso de bacterias iniciadoras es muy común en quesos madurados o semi madurados, ya que el cultivo tiene más tiempo para actuar sobre las características sensoriales y microbiológicas del producto, anterior a 2012 no era permitido el uso de nisina en quesos frescos hasta la aprobación de la Ley de Aditivos en 2012, la cual permite el uso de 12.5 ppm lo cual equivale a 500 UI/g como máximo en quesos frescos y madurados (Diario Oficial, 2012).

Roberts y Zottola. (1993), demostraron que 400 UI/g de nisina es suficiente para proteger de la contaminación por *C. perfringens* por más de 90 días en

queso cheddar. Sin embargo, según Ramsaran *et al.* (1998), el uso de bacterias productoras de nisina no fue suficiente para inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* en queso Feta y Camembert, y Davies *et al.* (1997), demostraron que 2.5 mg/L de nisina inhiben el crecimiento de *L. monocytogenes* por más de 8 semanas en queso tipo Ricotta. Como se mencionó anteriormente, para que la nisina incremente su efecto sobre el desarrollo de patógenos es necesario que se combine con otro método de conservación, en nuestro trabajo se vio un efecto más marcado cuando se combinó con el cultivo protector, esto representa una ventaja ya que a diferencia de otros métodos de conservación, el uso de bacterias ácido lácticas confieren mejores características sensoriales al producto.

#### **VII.8 Visualización por microscopía de epifluorescencia del queso inoculado con *L. monocytogenes* EGDe**

Para poder visualizar la contaminación del queso desde otro punto de vista, se decidió utilizar la cepa de *L. monocytogenes* EGDe la cual es bioluminiscente y nos puede dar una idea de la contaminación en el queso. En la figura 21 se muestran las fotografías tomadas con el microscopio de fluorescencia utilizando el filtro DAPI con un aumento de 64x, leyendo a una longitud de onda de excitación de 340 a 360nm y una longitud de onda de observación por arriba de 410nm.



**Figura 21.** Micrografías con microscopio de fluorescencia del queso inoculado con *L. monocytogenes* EGDe. a) queso control T2 *L. monocytogenes* b) queso T4 *L. lactis* UQ2 y *L. monocytogenes* c) queso T5 *L. lactis* UQ2, nisina y *L. monocytogenes* d) queso T6 nisina y *L. monocytogenes*

Claramente podemos notar la diferencia entre el queso control T2, el cual tiene una fluorescencia homogénea y de gran intensidad. Posteriormente están los quesos T4 y T5 que además de *Listeria* tienen *L. lactis* UQ2 y *L. lactis* UQ2 + nisina, en los cuales podemos notar una bioluminiscencia muy reducida comparada con el control siendo apenas perceptible en ambas micrografías. Finalmente el tratamiento con nisina podemos ver una luminiscencia menor que en el control, pero mayor que en los otros tratamientos. Mediante la visualización con las micrografías se corrobora lo registrado en el conteo microbiano.

## VII.9 Digestión simulada de las células libres

Una vez evaluado el efecto protector de la cepa transformada de *L. lactis* UQ2 adicionada en queso tipo Panela contra *L. monocytogenes* EGDe se evaluó la resistencia a la digestión, tanto en células libres como adicionada en queso. Para ello se sometieron las células a digestión gástrica simulada a pH 2

y pH 3 durante 2 h y posteriormente se cambiaron a pH 8 simulando una digestión intestinal por 4 h. Primero se llevó a cabo la digestión simulada a pH 2 de las células libres. Como se puede observar en el cuadro 9 prácticamente no hay reducción de la población que comienza en 9.1 log UFC/mL y después de 2 h de digestión gástrica simulada termina en 8.9 log UFC/mL. Posteriormente la digestión intestinal comenzó en 8.8 log UFC/mL para mantenerse en esa cantidad las primeras 2 h, después hubo un ligero incremento en la población, que terminó en 8.9 log UFC/mL a las 4 h de la digestión intestinal simulada.

**Cuadro 9.** Digestión simulada en células libres de *L. lactis* UQ2 a pH 2

pH	Tiempo	<i>L. lactis</i> UQ2
	h	log UFC/mL
2 (digestión gástrica)	0	9.17±0.03
	1	9.06±0.02
	2	8.95±0.04
8 (digestión intestinal)	0	8.82±0.03
	2	8.82±0.03
	4	8.9±0.02

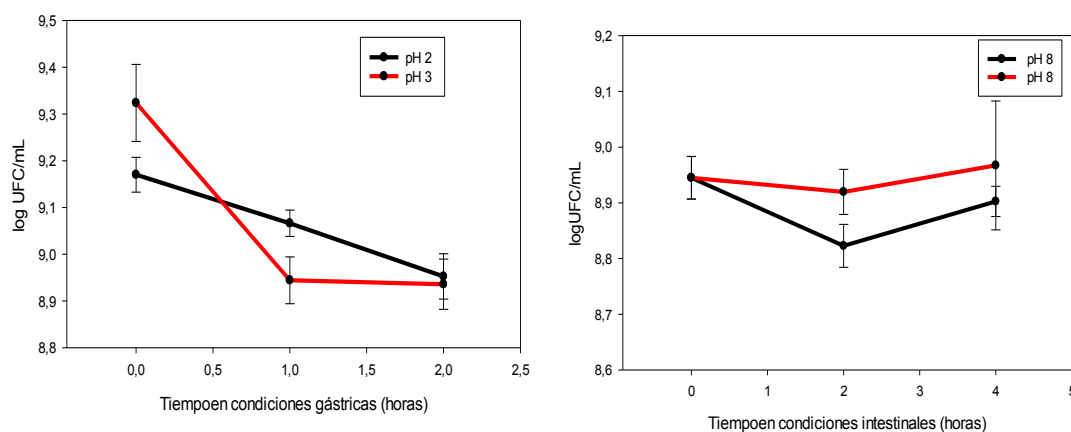
El pH del estómago no es siempre el mismo, hay ciertos factores que pueden afectarlo, como la edad de las personas, la alimentación, la salud o incluso la hora del día, por lo que se decidió realizar también la digestión a un pH de 3 para observar el comportamiento de la cepa. En el cuadro 10 podemos notar que prácticamente existe el mismo comportamiento que a pH 2, ya que en esta digestión se comienza con 9.3 log UFC/mL para después caer un poco y mantenerse en 8.9 log UFC/mL hasta las 2 h de la digestión gástrica.



**Cuadro 10.** Digestión simulada en células libres de *L. lactis* UQ2 a pH 3

pH	Tiempo h	<i>L. lactis</i> UQ2 log UFC/mL
pH 3 (digestión gástrica)	0	9.32±0.08
	1	8.94±0.05
	2	8.93±0.05
pH 8 (digestión intestinal)	0	8.94±0.03
	2	8.91±0.04
	4	8.96±0.11

Por otro lado, la digestión intestinal se mantuvo en 8.9 log UFC/mL durante las 4 h. En la figura 22 se muestra la comparación entre la digestión a pH 2 y 3, en ambas se observa un comportamiento muy similar, ya que en la digestión gástrica hay una disminución de la viabilidad de un máximo de medio log, mientras que durante la digestión intestinal se mantiene íntegra la población en aproximadamente 9 log UFC/g.



**Figura 22.** Supervivencia de *L. lactis* UQ2 en células libres a la exposición a condiciones gástricas e intestinales simuladas.

Charteris *et al.* (1998), sometieron 7 cepas de *Lactobacillus* y 8 de *Bifidobacterium* a una digestión simulada a pH 2 durante 3 h y posteriormente al

igual que en nuestro trabajo llevaron a cabo la digestión intestinal simulada en presencia de pancreatina a pH 8. De las cepas de *Lactobacillus*, únicamente la *Lactobacillus fermentum* KLD mostró buena resistencia a la digestión gástrica a pH 2, ya que inició con 7.82 log UFC/mL y después de 3 h la población se registró en 7.7 log UFC/mL, también mostró buen comportamiento durante las 4 h de la digestión intestinal, permaneciendo en 9.4 log UFC/mL. Además de esta cepa, *L. acidophilus* 242 y *L. casei* 212.3 también fueron resistentes a la digestión intestinal. Las cepas de *Bifidobacterium* mostraron un buen comportamiento durante la primera hora de las digestión gástrica conservando casi intacta su población, pero después de 3 h solo *B. bifidum* 2715 se mantuvo por encima de los 7 log UFC/mL, mientras que el resto estuvieron entre 5 y 6 log. De las 8 cepas que se sometieron a la digestión intestinal solo 2 no sobrevivieron las 4 h, mientras que las otras 6 permanecieron íntegras en su población. En un trabajo similar Misrha y Prasad (2004), sometieron 7 cepas de *Lactobacillus casei* a digestión gástrica a pH 1, 2 y 3 durante 3 h, de las cuales ninguna sobrevivió a pH 1, únicamente 3 cepas sobrevivieron 1 hora a pH 2, y todas mostraron una buena adaptación a pH 3. En estos casos el mejor comportamiento se registró con la cepa de *L. casei* ssp. *casei* VT la cual registró un incremento en la población a pH 3 comenzando en 8.85 log UFC/g y terminando en 8.9 log UFC/g. En cuanto a pH 2 la cepa que mostró mayor resistencia fue *L. casei* viz. C1 la cual resistió una hora con una población de 7.3 log UFC/g. Por otro lado Sheehan *et al.* (2007), sometieron a una digestión simulada la cepa *Bifidobacterium breve* UCC2003 siguiendo un procedimiento similar al nuestro, con un pH de 2.5 en la cual hubo una disminución de aproximadamente 4 log UFC/mL a las 2 h de digestión gástrica, comenzando en 8.5 y terminado en 4.5 log UFC/mL, por lo que podemos concluir que la cepa usada en nuestro estudio tiene mucha mejor adaptación a los pH ácidos.

Izquierdo *et al.* (2008), sometieron 8 cepas de *Bifidobacterium longum* incluyendo cepas reportadas como probióticas a condiciones gástricas e intestinales a pH de 1.5, 2, 2.5 y 3, y posteriormente a una concentración de sales biliares de 0.5 %. Ninguna de las cepas mostró viabilidad al pH de 1.5 a los 90 min que tardó la digestión gástrica, en cambio la cepa de *B. longum* NCC 2705 tuvo un buen comportamiento a pH 2 ya que hubo una

sobrevivencia de 7.4 log UFC/mL después de los 90 min, la misma cepa fue la que mostró mejor resistencia a las sales biliares con una sobrevivencia del 88 %. Esta investigación tiene una relevancia importante ya que se trabajó con cepas reportadas como probióticas, siendo *B. longum* NCC 2705 mencionada anteriormente la que mostró mejores resultados, y son relevantes en nuestra investigación ya que pudimos comparar las características de *L. lactis* UQ2 con una cepa probiótica. La resistencia del cultivo protector mostró ser mayor tanto al pH como a las sales biliares, lo que abre una oportunidad de considerarla como candidata a una cepa probiótica ya que además de esta cualidad, cumple con otras características de un probiótico, como no ser patógena, producir antimicrobianos, competir en exclusión con bacterias patógenas, producción a gran escala, y se mantiene viable durante su almacenamiento (OMS, 2006).

#### **VII.10 Digestión simulada del queso adicionado con la cepa microencapsulada de *L. lactis* UQ2.**

A los 14 días de haber realizado el queso adicionado con aproximadamente 7 log UFC/g de *L. lactis* UQ2 se llevó a cabo la digestión simulada para evaluar la sobrevivencia de la cepa cuando es sometida a condiciones simuladas de digestión. Durante la digestión en células libres se vio una excelente adaptación de la cepa al medio, manteniendo la viabilidad, en aproximadamente 9 log UFC/mL a lo largo de toda la digestión. Doleyres y Lacroix (2005), reportan que para que una bacteria pueda conferir beneficios al huésped tiene que estar presente en aproximadamente 6 UFC/g en el alimento. En el cuadro 11 se puede ver que la población de *L. lactis* UQ2 durante la digestión gástrica a pH 2 supera fácilmente este número, ya que durante las 2 h que tarda la digestión no se ve una pérdida de viabilidad manteniéndose en 8.7 log UFC/g y lo mismo se registra en la digestión intestinal en la cual se inicia con una población de 8.5 log UFC/g y después de 4 h termina en 8.4 log UFC/g.

**Cuadro 11.** Digestión simulada del queso con *L. lactis* UQ2 a pH 2

<b>pH</b>	<b>Tiempo h</b>	<b><i>L. lactis</i> UQ2 log UFC/mL</b>
pH 2 (digestión gástrica)	0	8.74±0.02
	1	8.73±0.02
	2	8.71±0.01
pH 8 (digestión intestinal)	0	8.56±0.062
	2	8.52±0.02
	4	8.43±0.09

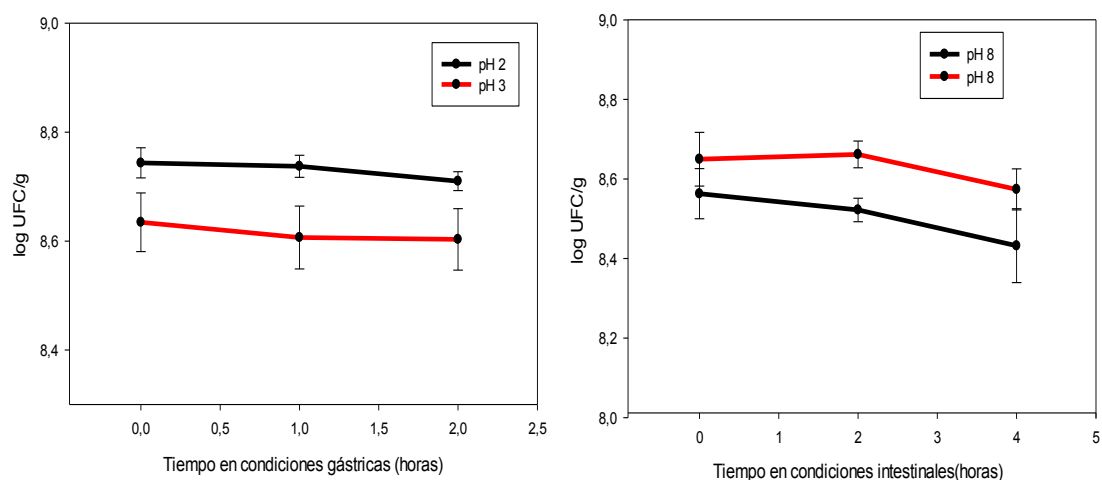
Posteriormente se realizó la digestión gástrica a pH 3. En el cuadro 12 se muestran las poblaciones durante la digestión gástrica e intestinal, la población se mantiene en 8.6 log UFC/g durante las 6 h que tarda la digestión completa. Esto era de esperarse, ya que incluso a un pH de 2 la población se mantuvo integra.

**Cuadro 12.** Digestión simulada del queso con *L. lactis* UQ2 a pH 3

<b>pH</b>	<b>Tiempo h</b>	<b><i>L. lactis</i> UQ2 log UFC/mL</b>
pH 3 (digestión gástrica)	0	8.63±0.05
	1	8.6±0.05
	2	8.6±0.05
pH 8 (digestión intestinal)	0	8.64±0.06
	2	8.66±0.03
	4	8.57±0.05

En la figura 23 podemos observar que la población de *L. lactis* UQ2 en queso a lo largo de las digestiones a pH 2 y 3 tiene un comportamiento muy similar, ya que durante la digestión gástrica se mantiene la población en 8.7 y 8.6 log UFC/g para pH 2 y 3 respectivamente y durante la digestión intestinal hay una ligera disminución de la población de las 2 a las 4 h en ambos casos. Cabe destacar que en el queso a diferencia de las células libres la población se

mantiene integra durante las 2 h de la digestión gástrica, este comportamiento se puede deber a que el queso y la microencapsulación le confieren protección a la bacteria. En cambio a pH intestinal se ve una mejor adaptación en células libres que en el queso, esto probablemente se deba a que el queso tiene una mayor capacidad de cambiar el pH y las condiciones del medio, haciendo un ambiente un poco más hostil, sin embargo la población es casi la misma en ambas digestiones.



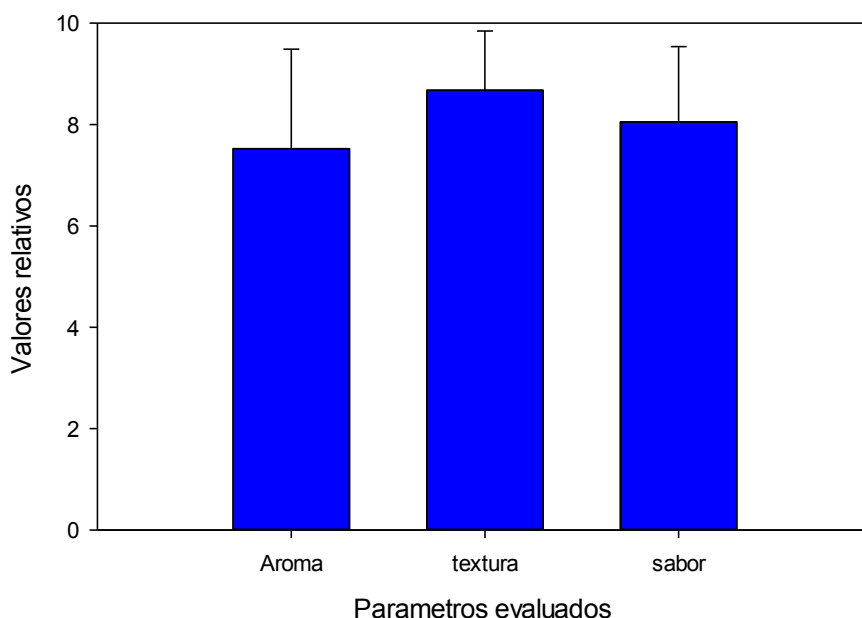
**Figura 23.** Supervivencia de *L. lactis* UQ2 en queso expuesto a condiciones gástricas e intestinales simuladas.

Ibarra (2011), agregó *Bifidobacterium breve* encapsulado en queso tipo panela, a los 14 días de almacenamiento realizaron la digestión simulada siguiendo la misma metodología que en nuestro trabajo, ellos obtuvieron resultados muy parecidos, ya que durante la digestión gástrica casi no hubo reducción de la población que comenzó en 9 log UFC/g y terminó en 8.8 log UFC/g. En la digestión intestinal simulada la población se comportó de la misma manera que en nuestro estudio, ya que solo se redujo mínimamente de 8.8 a 8.6 log UFC/g. A diferencia de nuestro trabajo la cepa probiótica no confiere ningún cambio sensorial al queso, en cambio la cepa *L. lactis*UQ2 confiere características sensoriales al queso las cuales son deseadas por el consumidor en la mayoría de los casos.

## VII.11 Análisis sensorial del queso tipo Panela adicionado con la cepa microencapsulada de *L. lactis* UQ2

Una vez evaluado el efecto del cultivo protector sobre el desarrollo de *L. monocytogenes* EGDe en queso y la resistencia de la cepa a la digestión, se realizó el análisis sensorial del queso tipo Panela con cultivo protector a los 10 días de almacenamiento con un panel no entrenado de 100 personas, cuya edad fluctuó entre los 19 y 55 años para calificar la aceptabilidad del producto. Se decidió realizar el análisis a los 10 días ya que es tiempo más que suficiente para que el queso desarrollo aroma, sabor y textura característicos que le confiere el cultivo protector.

El queso tuvo una aceptabilidad del 80 %, esto quiere decir que el promedio de los atributos evaluados estuvo en 8 en la escala hedónica de 10 puntos lo cual corresponde a la notación de “gusta moderadamente” a “gusta mucho”. En la figura 24 se muestran los promedios de los atributos evaluados, los cuales fueron aroma, sabor y textura.



**Figura 24.** Características evaluadas en el análisis sensorial del queso en una escala hedónica de 10 puntos.

El atributo mejor evaluado fue la textura con un promedio de 8.6 en la escala hedónica, seguido del sabor con una aceptación de 8 y finalmente el parámetro peor evaluado fue el aroma con 7.5, ya que según los comentarios en las encuestas durante el análisis sensorial se tenía problemas para percibir el aroma en muchos casos.

## VIII CONCLUSIONES

- La cepa transformada de *L. lactis* UQ2 demostró ser una mejor productora de nisina que la cepa nativa utilizando suero lácteo como medio de cultivo alternativo, ya que hubo una mayor producción de nisina en menos tiempo, alcanzando las 790 UI/mL a las 10 h de la fermentación. Esto abre una posibilidad de producir esta bacteriocina a un menor costo.
- El secado por aspersión es un método eficiente para microencapsular la nisina ya que no se vio una pérdida importante de actividad, alcanzando una eficiencia de microencapsulación del 65 %, además de conservar su capacidad antimicrobiana durante su almacenamiento. Por otro lado se obtuvo una sobrevivencia del 43 % al microencapsular la cepa transformada de *L. lactis* UQ2, mayor a lo reportado actualmente para este tipo de microencapsulado, el cual tuvo una estabilidad de 80 días almacenado en refrigeración.
- El uso de *L. lactis* UQ2 como cultivo protector en queso demostró tener un efecto bacteriostático contra *L. monocytogenes* EGDe reduciendo casi 3 log con respecto al control, mientras que en la combinación con nisina se vio un efecto más marcado contra el crecimiento de *Listeria* con una diferencia de más de 4 log con respecto al control.
- Mediante la cepa bioluminiscente de *L. monocytogenes* EGDe se pudo visualizar, el efecto de la producción *in situ* de la nisina por el cultivo protector.
- El cultivo protector tuvo un excelente comportamiento durante la digestión simulada manteniendo íntegra su población en aproximadamente 9 log UFC/mL, lo que abre la posibilidad de considerar el cultivo protector como posible candidata a cepa probiótica.
- Se obtuvo una aceptación del 80 % en el análisis sensorial del queso adicionado con el cultivo protector, en el cual se evaluó el sabor, textura y aroma. Por lo que la bioconservación es un buen método para obtener un producto con mejores características sensoriales y microbiológicas.



## IX LITERATURA CITADA.

- Aasen, I.M., Markussen, S., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L., Naterstad, K., 2003. Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology*. 87: 35–43.
- Abarca, D. Microencapsulación de *L. lactis* UQ2 rif L<sup>+</sup> y su incorporación en queso tipo panela. (2012). Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Químico en Alimentos. Querétaro, México
- Alegría, A., Delgado, S., Roces, C., López, B., Mayo, B., 2010. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *International Journal of Food Microbiology*. 143: 61–66.
- Anal, A. K., Singh, H. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*. 18: 240-251.
- Arqués, J., Rodriguez, L., Gaya, P., Medina, M., Nuñez, M. (2005). Effect of combinations of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *International Dairy Journal*. 15: 893-900.
- Bell, C., Kyriakides, M. *Listeria*. Una aproximación practica al microorganismo y su control en los alimentos, 2000. Editorial Acribia, Primera edición. Pag 173.
- Bemrah, N., Sanaa, M., Cassin, M., Griffiths M., Cerf O. 1998. Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. *Prevention Veterinary Medecine*. 37:129-45.
- Blazenka, K., Jagoda, S., Jadranka, G. y Srecko, M. 2000. Viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. *Food Technology and Biotechnology*. 38: 121-127.
- Breukink, E., van Kraaij, C., van Dalen, A., Demel, R. A., Siezen, R. J., de Kruijff, B., Kuipers, O. P., 1998. The orientation of nisin in membranes. *Biochemistry*. 37: 8153-8162.
- British Standards Institution. 1974. Methods for the estimation on differentiation of nisin in processed chesse. BS 4020.

- Brotz, H., Josten, M., Wiedemann, I., Schneider, U., Gotz, F., Bierbau, G., Sahl, H. G., 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin, and other lantibiotics. *Molecular Microbiology*. 30: 317-327.
- Cabeza, E. 2006. Bacterias ácido lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctea y cárnica. Simposio Regional de Microbiología "Microorganismos Eficientes en el Sector Productivo". Barranquilla, Colombia. 9: 1-12.
- Capellas, M., Mor-Mur, M., Gervilla, R., Yuste, J., Guamis, B. (2000). Effect of high pressure combined with mild heat or nisin on inoculated bacteria and mesophiles of goats milk fresh cheese. *Food Microbiology*. 17: 633-641
- Carr, F. J., Chill, D, Maida, N., 2002. "The lactic acid bacteria: a literature survey," *Critical Reviews in Microbiology*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 28: 281–370.
- Carunchia, M. E., Cadwallander, K. R., Drake, M., 2005. Characterization of aroma compounds responsible of tehe rosy/floral flavor in Chedddar chesse. *Journal Agricola Food Chemistry*. 53: 3126-3132.
- Castro, G., Valbuena, E., Briñez, W., Sanchez, E., Vera, H., Tovar A., 2009. Comparación del empleo de nisina y cultivos de *Lactococcus lactis subsp. Lactis* para la elaboración de queso blanco. *Revista científica, Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad del Zulia*.19: 201-209.
- CDC. Outbreak of Listeriosis Associated with Homemade Mexican-Style Cheese — North Carolina, October 2000–January 2001. Mortality and morbidity weekly report - *MMWR*. 2001 50:560-2.
- Centeno, J. A., Tomillo, E., Fernández-García, P., 2002. Effect of wild strains of *Lactococcus lactis* on the volatile profile and the sensory characteristics of Ewe's raw milk cheese. *American Dairy Science Association*. 85: 3164-3172.
- Cervantes, F., Villegas de Gante, A., Cesín, A., Espinoza, A. 2006. Los quesos mexicanos genuinos: un saber hacer que se debe rescatar y preservar. Comité Científico del III Congreso Internacional de la Red SIAL "Alimentación y Territorios"
- Chartanis W.P., Kelly P. M., Morelli L., Collins J. K. (1997) Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of

- potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 84: 759–768
- Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L., van der Donk, W. 2005. Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chemical Reviews*. 105:633-683.
- Chavarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibañez, F. C., Marzo, F., Villaran, M. C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 142:185-189
- Chollet, E., Sebtill, A., Martial-Gros, A., Degraeve, P. 2008. Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. *Food Control* 19: 982–989.
- Cintas, L. M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I. F., Hernández, P. E. 2001. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Scan Technology International*. 74: 281-305.
- Cole, M. B., Jones, M. V., Holyoak, C. 1990. “The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*”. *Journal of Applied Bacteriology*. 69: 63–72.
- Collins, J.W., La Ragione, R.M., Woodward, M.J., Lsearle, E.J. 2009. Application of Prebiotics and Probiotics in Livestock. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. 2009: 1123-1192.
- Cosentino, S., Fadda, M., Deplano, M., Melis R., Pomata, R., Pisano, M. 2012. Antilisterial Activity of Nisin-Like Bacteriocin-Producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Isolated from Traditional Sardinian Dairy Products. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012: 1-8
- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. 2005. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews*. 3: 777-787.
- da Silva Malheiros, P., Daroit, D. J., da Silveira, N. P., Brandelli, A. 2010. Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Microbiology*. 27: 175-178.
- da Silva Malheiros., Sant Anna, V., de Souza Barbosa, M., Brandelli, A., de Melo Franco, B. D. G. (2012). Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. *International Journal of Food microbiology*. 156: 272-277

- Davidson, P. M., Branen, A. L. 1993. Antimicrobials in food. 2da ed., Marcel dekker, New york. Pag. 369-393.
- Davies, E. A., Bevis, H. E., Delves-Broughton, J. 1997. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta type cheese to control food-borne pathogen *Listeria*. Letters in Applied Microbiology. 24: 343-346
- De Arauz L. J., Jozala, A. F., Pinheiro, G. S., Mazzola, P. G., Pessoa, A., Vessoni, T. C.2008. Nisin expression production from *Lactococcus lactis* in milk whey medium. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 83: 325-328.
- Deegan, LC, Cotter, PD, Hill, C. 2006. Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. International Dairy. 16:1058-1071.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J., Hugenholtz, J. 1996. Applications of the bacteriocin. Application Microbiology. 27: 85-123.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J. 2004. New preservation technologies: Possibilities and limitations. International Dairy Journal. 14: 273–285.
- De Vuyst, L. 1995. Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis subs. Lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. Journal of Applied Bacteriology. 78:28-33
- De Vuyst, L., Leroy, F., 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. Journal of Food Microbiology and Biotechnology. 13:194-199
- Diario Oficial. ACUERDO por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias. 2012.
- Donthidi, A. R., Tester, R. F., Aidoo, K. E. (2010) Effect of lecithin and starch on alginate-encapsulated probiotic bacteria. Journal of Microencapsulation. 27: 67-77
- Eijsink, V. G. H., Skeie, M., Middelhoven, P. H., Brurberg, M. B., Ness, I. F. 1998. Comparative Studies of Class II a Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Application Environmental Microbiology. 64: 3275-328.
- FAO-OMS. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el Consumo. 2004.
- Food and Drug Administration. 1998. “Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient,” Federal Registry. 53: 11247–11251.

- Fritzen-Freire, C. B., Prudencio, S. E., Amboni, D. R., Pinto, S. S., Negrao – Murakami, N., Murakami, F. B. 2012. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*. 45:306-312
- Gálvez, A., Lopez, R.L., Abriouel, H., Valdivia, E., Omar, N.B. 2008. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*. 28: 125–152.
- Gandhi, M., Chikindas, M. L. 2007. “*Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive,” *International Journal of Food Microbiology*. 113: 1–15.
- García-Almendárez, B. E., Cann, I., Martin, E., Guerrero-Legarreta, I., Regalado, C. 2008. Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control* 19: 670–680.
- García, M. D., 2009. Efecto de la percepción en quorum y modificación genética de *Lactococcus lactis* UQ2 sobre la producción de nisina en leche. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos.
- García-Parra, M. D., García-Almendárez, B., Guevara, L., Guevara, R., Rodríguez, A., Martínez, B., Domínguez, J., Regalado, C. 2009. Effect of Sub-inhibitory Amounts of Nisin and Mineral Salt son Nisin Production by *Lactococcus lactis* UQ2 in Skim Milk. *Food Bioprocess Technology*. 4:646-654
- Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., & Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 50: 213–224.
- González, S.Y. 2009. Optimización de la producción de nisina por *Lactococcus lactis* UQ2a nivel biorreactor y su incorporación en materiales de empaque comestibles. Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos.
- Guerra, N. P., Pastrana, L. 2002. Production of bacteriocins from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 539, and *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 using mussel-processing wastes. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 36: 119–125.
- Guajarathi, S. S., Bankar, S. B., Ananthanarayan, L. A., 2008. Fermentative production, purification and characterization of nisin. *International Journal of Food Engineering*. 4: 1-21.

- Hamama, A., Hankouri, N., Ayadi, M. 2012. Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin-producing *Lactococcus lactis* during manufacture a Jben, a Marroccan traditional fresh cheese. *International Dairy Journal* 12: 933-938
- Harmark. J. W., Davidson B. E., Hillier A. J., Gordon, J. B., Wilcocck A., Hickey M. W., Coventry, M. J. 1997. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by piscocolin 126 in milk and camembert cheese manufactured with a thermophilic starter. *Journal of Applied Microbiology*. 82: 273-280.
- Heidebach, T., Forst, P., Kulozik, U. (2012). Microencapsulation of probiotic cells for food applications. *Critical Reviews in food sceince and nutrition*. 52: 291-311.
- Horn, N., Swindell, S., Dodd, H., Gasson, M.J. 1991. Nisin biosynthesis genes are encoded by novel conjugative transposon. *Molecular and General Genetics*. 228:129-135.
- Hsu, S. T., Breukink, E., de Kruijff, B., Kaptein, R., Bonvin, A. M., van Nuland, N. A. 2002. Mapping the targeted membrane pore formation mechanism by solution NMR: The nisin Z and lipid II interaction in SDS micelles. *Biochemistry*. 41: 7670-7676.
- Hui, Y. 2007. *Handbook of Food Products Manufacturing*. Wiley-Interscience, New Jersey, Estados Unidos. 438, 960-966, 986.
- Ibarguren, C., R.F. Grosso, C., Apella, M., Audisio, M. 2012. *Anti-Listeria monocytogenes* activity of enterocins microencapsulated by ionic gelation. *Food Hydrocolloids*. 29: 21-26
- Ibarra, L. 2011. Estudio de la sobrevivencia de *Bifidobacterium breve* en su forma libre y encapsulada, durante su almacenamiento en queso panela a 4°C Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Químico en Alimentos. Querétaro, México
- Izquierdo, E., Medina, M., Ennahar., Marchioni, E., Sanz, Y. 2008 Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesión to mocus as probiotic criteria for *Bifidobacterium longum* Strain. *Springer Science Business Media*. 56: 613-618
- Jin T., Zhang H. 2008. Biodegradable polylactic acid polymer with Nisin for Use in Antimicrobial Food Packaging. *Journal of Food Science*. 73: 127-134.

- Jozala, A. F., Andrade, M. S., Arauz, L. J., Pessoa, J. A., Vesoni, P. T. 2007. Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 136: 515-528.
- Kim, YD., Morr CV. 1996. Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: spray-dried orange oil emulsion particles. *Journal Agriculture Food Chemistry*.44:1314–1320.
- Kopermsub, P., Mayen, V., Warin, C. 2011. Potential use of niosomes for encapsulation of nisin and EDTA end their antibacterial activity enhancement. *Food Research International*. 44:605-612.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. Review. *International Dairy Journal*. 13: 3-13.
- Leistner, L. 2000. Use of combined preservative factor in foods of developing countries. En: Lund, B., Baird, P.T., Gould, G.W. (Eds). *The Microbiological Safety and Quality of Food*. 5: 41-46.
- Leistner, L., Gorris, L., 1995. Food preservation by hurdle technology. *Trends in Food Science and Technology*. 6: 41-46.
- Leroy, F., De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Science & Technology*. 15:67-78.
- Li, C., Bai, J., Cai, Z, Ouyang, F. 2011 Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *Journal of Biotechnology*. 93: 27–3.
- Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. D., Goulet, V., May, S., Salmine, C., 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New England Journal of Medicine*. 319: 823–828.
- Lloyd, A. G., Drake, J. J. O. 1975. Problems posed by essential food preservatives. *British Medical Bulletin*. 31:214-219
- Lubelski, J., Rink, R., Khusainov, R., Moll, G., Kuipers, o., 2007. Biosynthesis immunity, regulation, mode of action and engineering of the model antibiotic nisin. *Cellular Molecular life science*. 65: 445-476.
- Maldonado, R., Llanças, L. 2007. Efecto de la incorporación de nisina sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus* en queso de mano. *Revista Facultad de Agronomía*. 33:147-163.

- MacDonald., Whitwam, R., D. Boggs J., MacCormack, J., Anderson K., Reardon, J., Royden Saah J., Graves L., Hunter S., Jeremy Sobel. 2005. Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. *Clinical Infectious Diseases*. 40: 677–682.
- Martin, S. E., Fisher, C. W. 1999. *Listeria monocytogenes*. The encyclopedia of foodmicrobiology. New York: Academic Press. Pag. 1228–1238.
- McLauchlin, J. 1997. “The pathogenicity of *Listeria monocytogenes*: a public health perspective,” *Reviews in Medical Microbiology*. 8: 1–14.
- Mead, P. S. Dunne, E. F., Graves L. 2006. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. *Epidemiology and Infection*. 13: 744–751.
- Misrha, V., Prasad., D. N. 2004 Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strain as potential probiotic. *International Journal of Food*
- Moll, G., Konings, W. N., Driessen, A. J., 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leewenhoek*. 76: 185-198.
- Morales, P., Fernandez-Garcia, E., Gaya, P., Nuñez, M. 2003. Formation of volatile compounds by wild *lactococcus lactis* strains isolated from raw Ewe’s milk cheese. *International Dairy Journal*. 13:201-209.
- Mortazavian, A., Hadi, R., Ehsani, M., Sohrabvandi, S. 2007. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iran Journal of Biotechnology*. 5: 1-18.
- Murray, E., Webb, R., Swann, M. A. 1926. Disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. spp.). *Journal Pathology Bacteriology*. 29:407-39.
- Nefise, A., Ghamat, A., Akcelik, M. 2011. Optimisation of bacteriocin production of *lactococcus lactis* subsp. *lactis* MA23, a stain isolated from Boza. *International Journal of Dairy Technology*. 64: 425-432
- NOM-092-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana, bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- NOM-111-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana, bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.



- NOM-143-SSA1-1995. Norma Oficial Mexicana, bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*.
- NOM-243-SSA1-2010. NORMA Oficial Mexicana Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- Ochoa, V. 2011. Incorporación de *Lactococcus lactis* UQ2 rif L<sup>+</sup> en queso panela y su efecto en la bioconservación y desarrollo de compuestos de sabor. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Querétaro, México.
- O’Riordan K., Andrews D., Buckle K., Conway P. 2001. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal Applied Microbiology*. 91: 1059-1066
- Paul Ross, R., Morgan, S., Hill, C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*. 79: 3–16.
- Pedroza R. 2002. Alimentos microencapsulados: particularidades de los procesos para la microencapsulación de Alimentos para larvas de especies acuícolas. VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.
- Piard, J. C., Desmazeaud, M. J. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2-bacteriocin and other antimicrobial substance. 72:113-142
- Picot, A. y Lacroix, C. 2004. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions in yogurt. *International Dairy Journal*. 14: 505-515.
- Piña A., Uribe K., Regalado C., Amaya S., Castaño E., García B. E. 2011. Producción de nisina por *Lactococcus lactis* UQ2 usando suero lácteo suplementado y evaluación de su actividad después del secado por aspersion. 4:47-55
- Piña, M. D. A. 2012. Producción de compuestos volátiles y evaluación sensorial de queso tipo panela incorporado con *Lactococcus lactis* UQ2 rif L<sup>+</sup> como cultivo protector. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Querétaro, México.

- Pongtharangkul, T., Demirci, A. 2006. Evaluation of culture medium for nisin production in a repeated-batch biofilm reactor. *Biotechnology Program*. 22: 217-224.
- Ramsaran, H., Chen, J., Brunke, B., Hill, A., Griffiths, M. W. 1998. Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in soft cheese. *Journal of Dairy science*. 81: 1810-1817.
- Re, M. I. 1998. Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*. 16: 1195–1236.
- Rilla, N., Martinez, B., Delgado, T., Rodriguez, A. 2003, Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. *International Journal of Food Microbiology*. 85: 23-33
- Roberts, R. F., Zottola, A., Mc Kay, L. L. (1992). Use of a nisin- producing starter culture suitable for Cheddar cheese manufacture. *Journal of Dairy Science*, 75: 2353–2363.
- Rojas, C., Vargas, P. 2008. Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. *Tecnología en Marcha*. 21: 9-16.
- Rojo-Bezares, B., Saenz, Y., Navarro, L., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C. 2007. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J232 isolated from grape must. *Food Microbiology*. 24: 482-491.
- Samelis, J., Kakouria, A., Rogga, K. J., Savvaidis. I. N., Kontominas. M.G. 2003, Nisin treatments to control *Listeria monocytogenes* post-processing contamination on Anthotyros, a traditional Greek whey cheese, stored at 4 °C in vacuum packages. *Food Microbiology*. 20. 661-669
- Sanz, Y., Collado, M., Dalmau, J. 2003. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediátrica Española*. 61: 476.
- Servicio de información agroalimentaria y pesquera. SAGARPA. 2013. Boletín de la leche. Pag 17.
- Settanni, L., Cosetti, A. 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal Food Microbiology*. 121:123-38
- Settanni, L., Moschetti, G. 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*. 27:691-697
- Sheehan, V., Sleator, R., Hill, C., Fitzgerald, G. 2007 Improving pastric transit, gastrointestinal persistence and therapeutic efficacy of the probiotic strain *Bifidobacterium breve* UCC2003. *Microbiology*. 153: 3563-3571

- Simova, E., Beshkova, D., Najdenski, H., Frengova G., Simov, Z., Tsvetkova, I. 2006. Antimicrobial producing lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian milk products: Inhibitory properties and in situ bacteriocinogenic activity. Proceedings of the IUFOST, 13th World Congress Food Science Technology "Food is life", 17-21 September, Nantes, France, 2006, pag. 907-908.
- Sobrino-López A., Martin-Belloso O. 2008. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*. 17: 1290-1297.
- Svetoch E. A., Eruslanov B., Perelygin V. V. V., Mitsevich E. V., Mitsevich P. I., Borzenkov V., Levchuk N. V., P.Svetoch O. E., Kovalev Y. N., Stepanshin Y. G., Siragusa N. G., Bruce R. S., Norman J. S. 2008. Diverse Antimicrobial Killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 Bacteriocin, *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 56: 1942-1948.
- Svetoslav, T., Vaz-Velho, M., Gibbs, P. 2004. Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST31. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35: 157-160.
- Taranto, M., Médici, M., Font, G. 2005. Alimentos funcionales probióticos. *Química Viva*. 4: 26.
- Thomas, LV., Clarkson, MR., Delves-Broughton J. Nisin; in Naidu AS (ed): *Natural Food Antimicrobial Systems*. Boca Raton, CRC Press, 2000, Pag. 463–524.
- Van, Heijenoort J. 1994. In *Bacterial Cell Wall*. Hakenbeck, R., Ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. Pag. 39-72,
- Vazquez-Boland, J., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*. 14(3):584.
- Velazquez, K. I. (2013) *Uso combinado de altas presiones hidrostáticas y bioconservación para garantizar la inocuidad y calidad de queso panela*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Querétaro, México
- Villegas A. 2004. *Tecnología quesera*. Mexico: Trillas (Pag. 242-268).
- Waters, C. M., Bassler, B.L. 2005. Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 21:319-346.

- Willey, J.M., van der Donk, W. A. 2007. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annual Review of microbiology*. 61: 477-501.
- Xiao, D., Davidson, P. M., Zhong, Q. (2011) Release and antilisterial properties of nisin from zein capsules spray-dried at different temperatures. *LWT- Food Science and Technology*. 44:1977-1985
- Xiao, D., Zhong, Q. (2011) In vitro release kinetics of nisin as affected by Tween 20 and glycerol co-encapsulated in spray-dried zein capsules. *Journal of Food Engineering*. 106:65-73
- Xie, L., Miller, L. M., Chatterjee, C., Averin, O., Kelleher, N.L., Van der Donk, W. A. 2004. Lactacin 481: *in vitro* reconstitution of lantibiotic synthetase activity. *Science*. 303: 679-681.
- Zomorodi, S. Khosrowshahi, A., Mahdi, S., Miraghaei, S. (2011) Survival of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium bifidum* in free and microencapsulated forms on Iranian white cheese produced by ultrafiltration. *International Journal of Dairy Technology*. 64: 84-91