

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“MICROENCAPSULACIÓN DE *Lactococcus lactis* UQ2 rif
L⁺ Y SU INCORPORACIÓN EN QUESO TIPO PANELA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA
DIANA IMELDA ABARCA SARRO

DIRIGIDA POR
Dra. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“MICROENCAPSULACIÓN DE *Lactococcus lactis*
UQ2 rif L⁺ Y SU INCORPORACIÓN EN QUESO TIPO
PANELA”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO EN ALIMENTOS**

PRESENTA

DIANA IMELDA ABARCA SARRO

DIRIGIDA POR

Dra. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ

Dra. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ
DIRECTOR

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ
SINODAL

Dra. SILVIA LORENA AMAYA LLANO
SINODAL

Dr. ELEAZAR BARBOZA CORONA
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Bioconservación	1
1.2 Bacterias ácido lácticas (BAL)	2
1.2.1 Bacteriocinas	3
1.2.2 <i>Lactococcus lactis</i>	4
1.2.3 Nisina	5
1.3 Microencapsulación	7
1.3.1 Materiales de pared	8
1.3.2 Tecnologías de microencapsulación	10
1.3.2.1 Secado por aspersión	11
1.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	13
1.5 Quesos en México	16
2. HIPÓTESIS	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 General	20
3.2 Específicos	20
4. METODOLOGÍA	21
4.1 Materiales y reactivos químicos	21
4.1.1 Cepas bacterianas y medios de cultivo	21
4.2 Métodos	23
4.2.1 Fosfatación de almidón	23
4.2.2 Activación de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺	23
4.2.3 Preparación de la suspensión de polímeros	23

4.2.4	Microencapsulación de <i>L. lactis</i> mediante secado por aspersión	24
4.2.5	Método de recuento bacteriano Miles-Misra (método de la gota)	24
4.2.6	Activación de <i>Micrococcus luteus</i>	25
4.2.7	Elaboración de queso tipo panela incorporando <i>L. lactis</i> UQ2 rif L ⁺ microencapsulado	26
4.2.8	Determinación de la actividad de nisina en queso	26
4.2.8.1	Método de difusión en agar	27
4.2.8.2	Elaboración de la curva estándar de nisina	27
4.2.9	Determinación de acidez en las muestras de queso	27
4.2.10	Determinación de organismos coliformes fecales (OCF)	28
4.2.11	Determinación de <i>Listeria monocytogenes</i>	28
4.2.12	Determinación de mohos y levaduras	29
4.2.13	Reto de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso con cultivo protector	29
5.	RESULTADOS	30
6.	DISCUSIÓN	39
7.	CONCLUSIONES	46
8.	REFERENCIAS	47
9.	ANEXOS	52

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Producción de queso panela y leche en México del 2007 al 2012	18
2	Condiciones de secado evaluadas para microencapsulación de <i>Lactococcus lactis</i> UQ2 rif L ⁺	30
3	Producción de nisina en queso adicionado de <i>Lactococcus lactis</i> en queso en diferentes unidades	32
4	Población de <i>Lactococcus lactis</i> y <i>Listeria innocua</i> en el queso.	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura de la nisina	6
2	Microencapsulación por extrusión	10
3	Microencapsulación por emulsión	11
4	Diagrama del secador por aspersión	14
5	Método Miles-Misra para recuento bacteriano	25
6	Producción de nisina en ppm (mg de nisina/kg de queso) en queso adicionado de <i>L. lactis</i>	31
7	Acidez en las muestras de queso	32
8	Organismos coliformes fecales (OCF) en el queso	33
9	Población de <i>L. lactis</i> en queso durante almacenamiento	34
10	Características evaluadas en el análisis sensorial	35
11	<i>Listeria innocua</i> y <i>Lactococcus lactis</i> agregados en la leche antes de cuajar	36
12	<i>Listeria innocua</i> y <i>Lactococcus lactis</i> agregados en la pasta en una concentración de 1×10^7 UFC/g	37
13	Curva de calibración de nisina	52
14	Placas de agar Assay usadas para la curva de calibración de nisina	53
15	Ficha técnica de almidón modificado (capsul)	54
16	Ficha técnica maltodextrina	55
17	Secador por aspersión Büchi mini spray dryer B-191	58
18	Elementos de control y señalización del secador Büchi "mini spray dryer" B-191.	59

RESUMEN

Algunas bacterias ácido lácticas producen bacteriocinas que se pueden aplicar en la bioconservación de los alimentos. La nisina es producida por cepas de *Lactococcus lactis* y se usa como agente natural de conservación. Por otro lado, *Lactococcus lactis* UQ2 rif L⁺ es una cepa que ha sido modificada para tener una mejor producción de nisina. El objetivo de este trabajo fue incorporar dicha cepa microencapsulada en un queso tipo panela y determinar su capacidad para la bioconservación. Se determinó el material de pared para la microencapsulación de la bacteria obteniendo hasta 84 % recuperación de sólidos y 1.5 % de viabilidad. El producto en polvo mostró 4×10^9 - 5×10^9 UFC/g con la mezcla de almidón modificado, maltodextrina y concentrado de proteína de suero al 10 %. Incorporando esta bacteria encapsulada en un queso tipo panela se obtuvo una población máxima a los 21 días de almacenamiento de 6.2×10^8 UFC/g, una concentración de nisina de 6.6 ppm (mg de nisina/kg de queso) equivalente a 104.7 UI/g, una acidez de 41.2 °D. La población de organismos coliformes fecales mostró un máximo de 50 ufc/g, mientras que hubo ausencia de mohos y levaduras. Un análisis sensorial con 100 panelistas no entrenados mostró en promedio 70 % de aceptación en tres características evaluadas: aroma, textura y sabor. En un reto con *Listeria innocua* adicionada en 1×10^7 UFC/g (subrogado de *Listeria monocytogenes*) se logró inhibir 4 log esta bacteria patógena durante almacenamiento a 4 °C. *L. lactis* UQ2 rif L⁺ puede usarse en la bioconservación de queso tipo panela sin afectar su aceptación por el consumidor.

1. ANTECEDENTES

1.1 BIOCONSERVACIÓN

La bioconservación de alimentos se basa en el uso de microorganismos o sus metabolitos para inhibir el crecimiento de microorganismos deterioradores y/o patógenos. Muchas de estas sustancias antimicrobianas pueden tener aplicaciones potenciales como conservadores naturales. Una estrategia alternativa al uso de bacteriocinas purificadas es la incorporación de cepas productoras de estos metabolitos. Esto ha llevado a estimular la protección contra microorganismos no deseados en una amplia variedad de matrices alimenticias (García-Parra y col., 2010).

El uso de bacteriocinas como bioconservadores ofrece diversos beneficios entre los que podemos encontrar extensión de la vida de anaquel de los productos, protección durante los abusos de temperaturas, disminución del riesgo de transmisión de microorganismos patógenos durante todo el proceso de elaboración del alimento. De igual forma se disminuyen las pérdidas económicas debido al deterioro de los alimentos, puede reducirse la aplicación de conservadores químicos, y de los tratamientos térmicos ya que son menos severos y conservan así la calidad del producto ya que se conservan mejor los nutrientes y vitaminas así como las propiedades organolépticas del alimento. Permite la posibilidad de diseñar productos novedosos (alimentos menos ácidos, con menor contenido de sal y con un mayor contenido de agua) y finalmente estos productos deben satisfacer las demandas que hay tanto a nivel industrial así como para la población en general. Las tendencias que actualmente están surgiendo en cuanto a los nuevos alimentos como la necesidad de eliminar el uso de ingredientes y aditivos artificiales, la mayor demanda de productos mínimamente procesados y frescos así como los alimentos “listos para su consumo”, y la mayor demanda de nutracéuticos pueden satisfacer o justificar el uso de bacteriocinas en los alimentos (Gálvez y col., 2007).

1.2 BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un grupo heterólogo de géneros que comparten características similares, este grupo de bacterias reciben su designación por su capacidad que tienen de fermentar azúcares primeramente en ácido láctico vía homo- o hetero- fermentativa. Se caracterizan por ser Gram-positivas, catalasa-negativas, no formadoras de esporas, anaerobias facultativas, no presentan movilidad (excepto por *Lactobacillus agilis* y *Lb. capillatus*).

La heterogeneidad de estas bacterias es igualmente expresada en la morfología de sus cepas ya que las podemos encontrar como cocos o bacilos, como células individuales o formando pares, tétradas y cadenas cortas o largas. Debido a sus limitadas habilidades biosintéticas y a los altos requerimientos (de fuentes de carbono y nitrógeno) se requieren medios complejos para su crecimiento (Settanni y col., 2010).

Las BAL son nutricionalmente delicadas ya que su hábitat natural son aquellos ambientes relacionados con alimentos crudos, alimentos fermentados, pieles de los animales y membranas mucosas. La producción de bacteriocinas por estas bacterias se da normalmente en medios complejos; si bien pueden permitir su crecimiento y una concentración relativamente alta de bacteriocinas, su alto costo lo hacen inadecuado para llevar a cabo una producción a gran escala de éstas. Por otro lado, hay otros materiales de bajo costo como lo son el suero, melazas y residuos del procesamiento de mejillones que han demostrado ser buenos medios de cultivo para la producción de bacteriocinas (de Arauz y col., 2008).

Las especies productoras de bacteriocinas, entre los géneros que comprenden las BAL, incluyen a *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pedicoccus* así como algunos *Enterococcus*. Los lantibióticos y no lantibióticos producidos por BAL son de mucha importancia para la prevención contra bacterias patógenas y deterioradoras, además de que han sido objeto de muchos estudios en estudios recientes debido a su potencial al ser usado en el desarrollo de nuevos productos, como conservadores naturales.

Las BAL son usadas para la fermentación y bioconservación de alimentos lácteos, cárnicos y vegetales. Durante la fermentación de los productos lácteos, estos cultivos metabolizan la lactosa convirtiéndola en ácido láctico disminuyendo así el pH y propiciando un ambiente desfavorable para los microorganismos patógenos y deterioradores. Por otra parte, el bajo pH de los productos fermentados potencializa el efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos; además de estos ácidos orgánicos el peróxido de hidrógeno, diacetilo y las bacteriocinas juegan un papel inhibitorio (Aslim y col., 2005).

1.2.1 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos o proteínas con actividad antimicrobiana, las cuales al ser producidas por algunas bacterias inhiben el crecimiento de microorganismos de la misma especie, mientras que otras tienen la capacidad de inhibir un rango más amplio de microorganismos dentro de los cuales se pueden encontrar patógenos y deterioradores (Alegría y col., 2010). Algunas cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) son productoras de bacteriocinas, que permiten la posibilidad de manipular el ecosistema microbiano de un determinado alimento protegiéndolo de la contaminación o previniendo el control de bacterias patógenas específicas (González-Toledo y col., 2010).

Desde un punto de vista bioquímico se identifican dos tipos de bacteriocinas en bacterias ácido lácticas, aquellas caracterizadas por la presencia de un residuo deshidratado (deshidroalanina y deshidrobutirina) y/o un aminoácido conteniendo un grupo tioéter (lantionina y β -metil lantionina), los cuales son generalmente referidos como lantibióticos o clase I, y aquellas bacteriocinas que contienen aminoácidos no modificados (no lantibióticos). Los no lantibióticos se dividen a su vez en clases que van desde la II hasta la IV dependiendo del tamaño y la presencia de restos no proteicos. Tanto los lantibióticos como los no lantibióticos son sintetizados a través de la vía ribosomal, pero los primeros son posteriormente modificados enzimáticamente (Alegría y col., 2010).

En otra clasificación las bacteriocinas se pueden dividir en tres grupos dentro de los cuales podemos distinguir a: (i) los lantibióticos, péptidos pequeños menores a 5 kDa que reciben su nombre por aminoácidos especiales que contienen anillos de tioéter de forma intramolecular (por ejemplo lantionina y β -metil-lantionina). Los lantibióticos tipo A (Clase I) son elongados, catiónicos y con péptidos formadores de poros, algunos de los cuales los forman dos componentes. Algunos ejemplos de lantibióticos tipo A son la nisina y la epilancina. Los lantibióticos tipo B tienen una estructura más globular, son inhibidores de enzimas y péptidos con actividad inmunológica; (ii) péptidos pequeños estables al calor menores a 10 kDa que no contienen lantioninas. Dentro de estos se distinguen cuatro subgrupos definidos como IIA (péptidos activos contra *Listeria* con secuencia N-terminal (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys), IIB (con dos bacteriocinas), IIC (con bacteriocinas secundarias), IID (bacteriocinas Clase II que no pertenecen a ninguno de los subgrupos antes mencionados); (iii) proteínas grandes sensibles al calor mayores a 30 kDa (Moll y col., 1999).

Las bacteriocinas producida por BAL, específicamente la nisina, ofrecen varias propiedades deseables que las hacen ideales para la bioconservación de alimentos, entre ellas podemos encontrar que son reconocidas como sustancias seguras, no son activas ni tóxicas para las células eucariotas, se inactivan con las proteasas digestivas (afectando muy poco a la flora intestinal), son tolerantes al pH y a tratamientos térmicos, tienen un espectro antimicrobiano general que incluye a microorganismos patógenos y deterioradores. Su mecanismo de acción dual es muy eficiente, actúa generalmente sobre la membrana de las células, no generan resistencia a antibióticos y cuando son codificadas en plásmidos permite que sean fáciles de manipular genéticamente (Gálvez y col., 2007).

1.2.2 *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis UQ2 es ampliamente utilizado en fermentaciones alimentarias, fue aislada de un queso mexicano hecho con leche cruda y se ha demostrado que esta bacteria es productora de la bacteriocina genéticamente identificada como

nisina A. *L. lactis* contiene el plásmido de 56.5 kb pLP712 que codifica para los genes encargados de la utilización de lactosa y proteínas, este plásmido fue transferido por conjugación a frecuencias relativamente altas a otro *L. lactis* que no tenía la capacidad de utilizar la lactosa (Lac-) o de degradar la caseína (Ptr-) (Piña y col., 2011).

Considerando que la transferencia de genes por conjugación es aceptada generalmente para obtener cepas modificadas grado alimenticio (Toomey y col., 2009). La modificación antes mencionada además de proveer estas características también favorece el crecimiento en leche ya que se promueve su capacidad proteolítica y el uso de la lactosa del medio (García-Parra y col., 2010).

1.2.3 Nisina

La nisina (Figura 1) es un péptido antimicrobiano descubierto en 1928 (Jozala y col., 2005) compuesto de 34 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 3.4 kDa y se clasifica como una bacteriocina Clase I o lantibiótico. Es producido por cepas de *Lactococcus lactis* sbsp. *lactis* durante la fase exponencial de su desarrollo (de Arauz y col., 2008) y se han identificado cinco variantes de ésta la A, Z, Q, U y F (Alegría y col., 2010). Su importancia es debido a que su amplio espectro contra bacterias Gram-positivas (Sobrino-López y col., 2008) así como contra esporas, pero muestra poca actividad contra bacterias Gram-negativas, levaduras y mohos (de Arauz y col., 2008). La solubilidad y estabilidad de la nisina aumenta sustancialmente al aumentar la acidez del medio, es estable a pH de 2 y puede soportar temperaturas de hasta 121°C en autoclave, bajo un pH alcalino no presenta actividad, con una completa inactivación después de 30 min a 63°C a pH de 11 (Jozala y col., 2008).

Es comercialmente usada como agente natural para bioconservación de alimentos y es considerada segura por la Organización Mundial de la Salud (OMS) así como por la FDA (Food and Drug Administration) ya que recibió la designación GRAS (Generally Recognized as Safe) en 1998 (de Arauz y col., 2008). Ha sido admitida en la lista de aditivos de la unión europea con el número E234, se comercializa

generalmente en forma de polvo seco y concentrado (Sabrino-López y col., 2008). Su aplicación en la elaboración de productos lácteos como en queso se permite una concentración máxima permisible de 12.5 mg/kg (NOM-243-SSA1-2010).

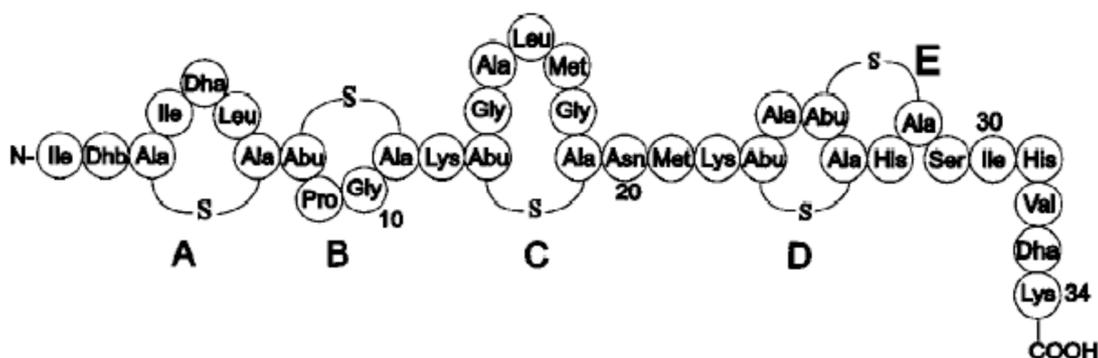


Figura 1. Estructura de la nisina (Gert y col., 1999).

La cepa nativa de *L. lactis* UQ2 ha sido aislada de un queso fresco tipo Mexicano, y se ha demostrado que sintetiza nisina A. Sin embargo, tanto la producción de este antimicrobiano como el crecimiento de esta bacteria fueron bajos, alcanzando su máxima población de 10^7 UFC/mL y una producción de solo 3-5 UI/mL. Este bajo crecimiento en leche es normalmente asociado a la disminución de la capacidad de fermentación de lactosa o por la poca actividad proteolítica (García-Parra y col., 2010).

El sistema regulatorio de la nisina involucra el sistema de percepción de quórum, el proceso de comunicación entre especies que permite a las células percibir la presencia de otros organismos a su alrededor, de forma dependiente de la densidad celular. La estructura de la nisina por si sola funge como una feromona que induce su propia producción a través de un sistema de dos componentes de

manera dependiente de la densidad celular. Se ha demostrado que ciertas cantidades sub-inhedorias de nisina agregadas a un medio de cultivo pueden promover un efecto autoinductivo que puede permitir una sobre-expresión de esta bacteriocina.

Un efecto significativo en la producción de nisina se ha reportado al suplementar el medio de cultivo de suero con $MgSO_4$, mientras que trazas de Mn igualmente parecen ser esenciales para el crecimiento y las actividades metabólicas de las bacterias ácido lácticas, al formar parte de enzimas tales como la superóxido dismutasa. Además, la peptona de soya promueve una mayor producción de nisina en comparación con otras fuentes nitrogenadas (González-Toledo, 2010).

1.3 MICROENCAPSULACIÓN

La microencapsulación (ME) es el recubrimiento de pequeñas partículas sólidas, líquidos o gases con un material específico. El desarrollo de un sistema de encapsulación adecuado para una aplicación específica se basa en el conocimiento de las condiciones de estabilidad de las biomoléculas o células que se desean encapsular así como las propiedades de los materiales que se usan para llevar a cabo el recubrimiento (matriz de encapsulación) y la idoneidad del sistema final donde se va a utilizar el encapsulado. Las tecnologías disponibles actualmente usan un líquido o un gas como medio de suspensión (como en el caso del secado por aspersión).

En relación a la ciencia de los alimentos y a la biotecnología la ME involucra la incorporación de ingredientes naturales, polifenoles, aditivos volátiles, enzimas, bacterias (como lo es el caso de las BAL que pueden actuar como cultivos iniciadores o como probióticos) en pequeñas cápsulas. Estas permiten ofrecer a dichos ingredientes la capacidad de ser estables y protegidos. Las matrices que se usan para la encapsulación que posteriormente estarán en contacto con algún alimento se prefiere que sean productos naturales y que tengan a designación GRAS (Nazzaro y col. 2012).

La tecnología de inmovilización celular (TIC) es aplicada de igual manera en la biotecnología e involucra el recubrimiento de células vivas, esta tecnología dio una respuesta inmediata para las necesidades que se tenían para poder encapsular bacterias probióticas y poder así incorporarlas en productos lácteos.

Si las células microencapsuladas por esta tecnología van a tener un uso final en alimentos se debe tener en cuenta que estas deben llegar vivas hasta el consumo de dicho producto por lo que el tamaño de las cápsulas es un factor determinante que puede afectar las características sensoriales del alimento.

Dentro de la TIC existen varias técnicas para la encapsulación de dichas bacterias con usos para la industria láctea, dentro de las cuales los dos métodos principalmente usados son la extrusión y la emulsión. Para estos métodos se usan comúnmente biopolímeros como alginatos, goma gelana, xantana, carragenina, algarrobo o mezclas de estas como material de gelificación (Heydebach y col., 2012).

1.3.1 Materiales de pared

La microencapsulación puede tener muchos usos en la industria de los alimentos, uno de ellos es, por ejemplo, para estabilizar el material que se va a usar como pared o el agente propio que se desea encapsular (Anal y col., 2007). Por ejemplo para el caso de los hidrocoloides, la encapsulación se lleva a cabo usando un sistema de agitación magnético y se obtienen cápsulas con diámetros de 381 μm , por lo que es necesario utilizar un proceso que reduzca el tamaño de partícula. Para el caso de las microcápsulas a base de proteínas, estas son de un menor tamaño en comparación con las formadas por hidrocoloides ya que estos últimos presentan una menor viscosidad. Cuando las microcápsulas son a base de lípidos el problema principal que se encuentra es que estas se pueden derretir (Heydebach y col., 2012).

Algunas de las ventajas del uso de alginatos es que estos materiales son más baratos, tienen un fácil manejo y son simples de preparar; además tienen la

característica de que no son tóxicos, sin embargo como desventaja tienen que son susceptibles a los ácidos, además se disuelven durante el paso gastrointestinal.

Los almidones son también usados como material de pared, siendo los más comunes los almidones resistentes, los almidones modificados altos en amilosa, los almidones liofilizados y los almidones nativos altos en amilosa. Las ventajas del uso de almidones resistentes como material de pared es debido a que este no es degradado por las enzimas pancreáticas, además las mezclas de almidón resistente con almidón alto en amilosa tienen efectos benéficos al ser fermentado por la flora intestinal lo que reduce el pH debido a la formación de ácidos grasos de cadena corta.

La goma xantana es soluble y estable sobre una amplia gama de pH, a varias temperaturas y a diferentes concentraciones de sal, además de ser resistente ante descomposición enzimática; sin embargo esta goma no se puede usar sola en procesos de encapsulación por extrusión o emulsión debido a que necesita temperaturas altas para gelificar (80-90 °C) las cuales, afectan directamente la viabilidad de las células. La carragenina es otra goma usada para encapsular bacterias, esta goma permite el paso de nutrientes libremente dentro y fuera de las cápsulas permitiendo así una mayor viabilidad de las células. Otro hidrocoloide usado es la gretina, la ventaja de usar esta goma es que forma cápsulas resistentes a daños mecánicos y su resistencia a cambios de pH permite que estas cápsulas sean resistentes bajo las condiciones gastrointestinales. El quitosano también se encuentra dentro de los hidrocoloides usados, sin embargo, debido a que no aumenta la viabilidad de las células su uso se limita únicamente como protector de las células, es decir previo a encapsular la bacteria ya con algún otro polímero o hidrocoloide.

Dentro de los encapsulantes también encontramos los materiales que son a base de proteínas, como las proteínas de suero. El uso de este material le confiere a protección durante el procesamiento así como durante el almacenamiento, además de poder extender la aplicación de las bacterias que se encapsulen a una más

amplia gama de alimentos (por ejemplo como en el caso de probióticos en galletas, vegetales y jugos congelados).

Este tipo de proteína se puede combinar con algunos de los polímeros anteriormente mencionados ofreciendo así encapsular una gama más amplia de ingredientes, enzimas y bacterias (Riaz y Masud, 2013).

1.3.2 Tecnologías de microencapsulación

Como se mencionó anteriormente existen dos principales tecnología usadas para la microencapsulación, en el caso de la extrusión está involucrada la preparación de una solución de un hidrocoloide en la cual se agrega el microorganismo a encapsular y la cual posteriormente es agregada (extruida) a través de una boquilla en forma de gotas en de una solución que va a endurecer dichas gotas, la solución sobre la cual se gotea el hidrocoloide generalmente es de CaCl_2 (Figura 2).

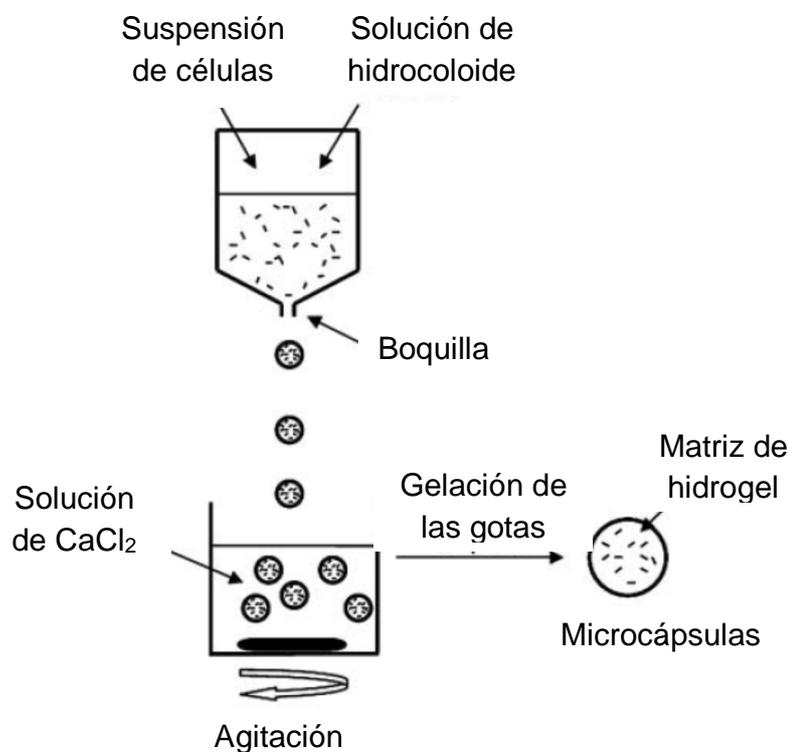


Figura 2. Microencapsulación por extrusión (Heidebach y col. 2012).

La encapsulación mediante la técnica de emulsión es el método más adaptable en lo concerniente al control de los parámetros y más flexible para poder ajustar los tamaños de partícula. En este método un volumen pequeño de una solución de hidrocoloide a la cual se le ha añadido las bacterias que se desean encapsular (fase discontinua) es emulsificada en un volumen mayor de una aceite vegetal (fase continua), posterior a la formación de una emulsión agua en aceite la mezcla dispersa (hidrocoloide-células) debe insolubilizarse en para formar pequeñas capas son la fase de aceite. Finalmente cuando ya se han producido las cápsulas de alginato, estas se endurecen mediante la adición de una solución de CaCl_2 a la emulsión (Figura 3) (Heidebach y col. 2012).

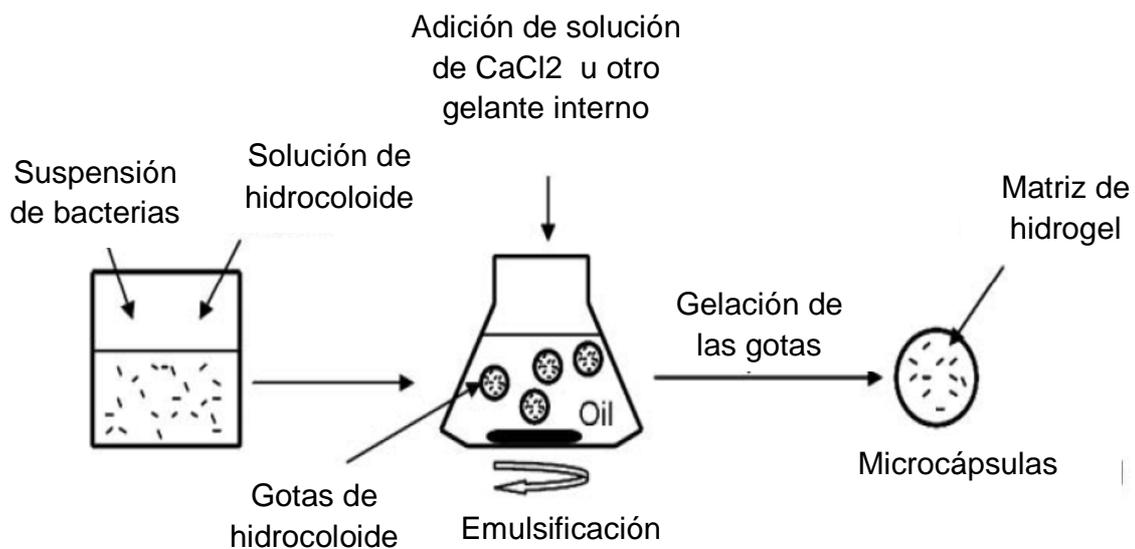


Figura 3. Microencapsulación por emulsión (Heidebach y col. 2012).

1.3.2.1 Secado por aspersion

En muchas ocasiones las células necesitan ser almacenadas por largos periodos antes de la manufactura de los alimentos por ello las microcápsulas formadas mediante las técnicas anteriormente descritas son secadas posteriormente a su

obtención. Para el caso de la extrusión y la emulsificación se usa la liofilización como método de secado posterior, es por ello que se propone el secado por aspersion como método alternativo para llevar a cabo la encapsulación y el secado en un solo paso.

El secado por aspersion es un proceso rutinario en la industria de los alimentos para convertir líquidos en polvos, así el secado por aspersion se ha usado para encapsular probióticos a fin de simplificar el secado y como alternativa para los métodos antes mencionados de TIC. Así, las mezclas de células en una solución de polímeros (almidón modificado, goma arábica, gelatina, aislado de proteína de suero, mezclas de maltodextrina con goma arábica, mezcla de β -ciclodextrina con goma arábica) son secadas por aspersion. La ventaja de este método es su amplia disponibilidad en la industria de los alimentos y que a menudo favorece la formación de las cápsulas con diámetros menores a 100 μm (Heidebach y col. 2012), las microcápsulas formadas tienen un núcleo rodeado de una membrana delgada la cual sirve como barrera a las condiciones en las que son expuestas (Kim y col. 2008). Las microcápsulas son solubles en agua en la mayoría de los casos, sin embargo las células son liberadas muy rápidamente perdiendo la protección contra condiciones adversas ya sea durante el almacenamiento o al someterse a las condiciones gastrointestinales.

Las altas temperaturas junto con la rápida deshidratación de las microcápsulas durante el secado por aspersion conduce por lo general a un deterioro de las células, resultando en una pérdida significativa de la viabilidad de las mismas y una baja resistencia a las condiciones ambientales adversas. Se ha demostrado que la supervivencia de los microorganismos durante el secado por aspersion aumenta al disminuir la temperatura de salida, siendo así la elección de esta temperatura determinante en el contenido de agua dentro de las microcápsulas y el porcentaje de supervivencia del microorganismo encapsulado, el cual es de un rango de 1% a 10% en polvos suficientemente secos (Heidebach y col. 2012).

El secado por aspersión de microorganismos data desde 1914 donde se comenzó a secar cultivos de leche conteniendo BAL, y a partir de ellos se comenzaron a desarrollar más estudios usando este método para poder conservar cultivos líquidos sin pérdida de su actividad. El uso de carbohidratos para encapsular a los microorganismos puede limitar la transferencia de calor cuando el inóculo es secado minimizando así los efectos perjudiciales debidos al proceso.

La microencapsulación mediante el secado por aspersión es ampliamente usada en la industria de los alimentos debido a su bajo costo, además de que este proceso es muy útil para el recubrimiento de ingredientes para alimentos que pueden llegar a ser muy sensibles ya que el secado es muy rápido (1-10 s en los equipos industriales, aunque en secadores a nivel piloto es de aproximadamente 1 s) y el recubrimiento en realidad alcanza temperaturas mucho menores a los 100 °C, porque el principal tiempo de secado ocurre en la etapa de velocidad constante, donde la temperatura de secado corresponde a la temperatura de bulbo húmedo del aire caliente que se usa para secar (40-50 °C). Además de las ventajas mencionadas anteriormente también encontramos que hay una amplia diversidad y disponibilidad de equipos que se pueden usar para obtener diversos tamaños de partícula, ya que estos dependen del diámetro que tenga la boquilla de salida (espera) por donde es atomizada la suspensión que se está secando, ya que es en esta parte de los equipos donde se lleva a cabo el proceso de atomización de las suspensión que se está secando (Boza y col., 2004).

1.4 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es un patógeno transmitido por alimentos de gran importancia en la industria de los alimentos debido a su ubicuidad, capacidad de crecer incluso a temperaturas de refrigeración. Los quesos frescos estilo Mexicano (como lo es el queso panela) son productos elaborados sin el uso de cultivos iniciadores. Se han reportado dos grandes brotes de listeriosis relacionados con su consumo (Linnan y col., 1988; MacDonald y col., 2005), principalmente debido al uso de leche no pasteurizada, o pasteurizada pero contaminada con leche cruda,

en la elaboración de este tipo de productos así como al ambiente dentro de las plantas que fabrican quesos frescos (García-Almendárez y col., 2008).

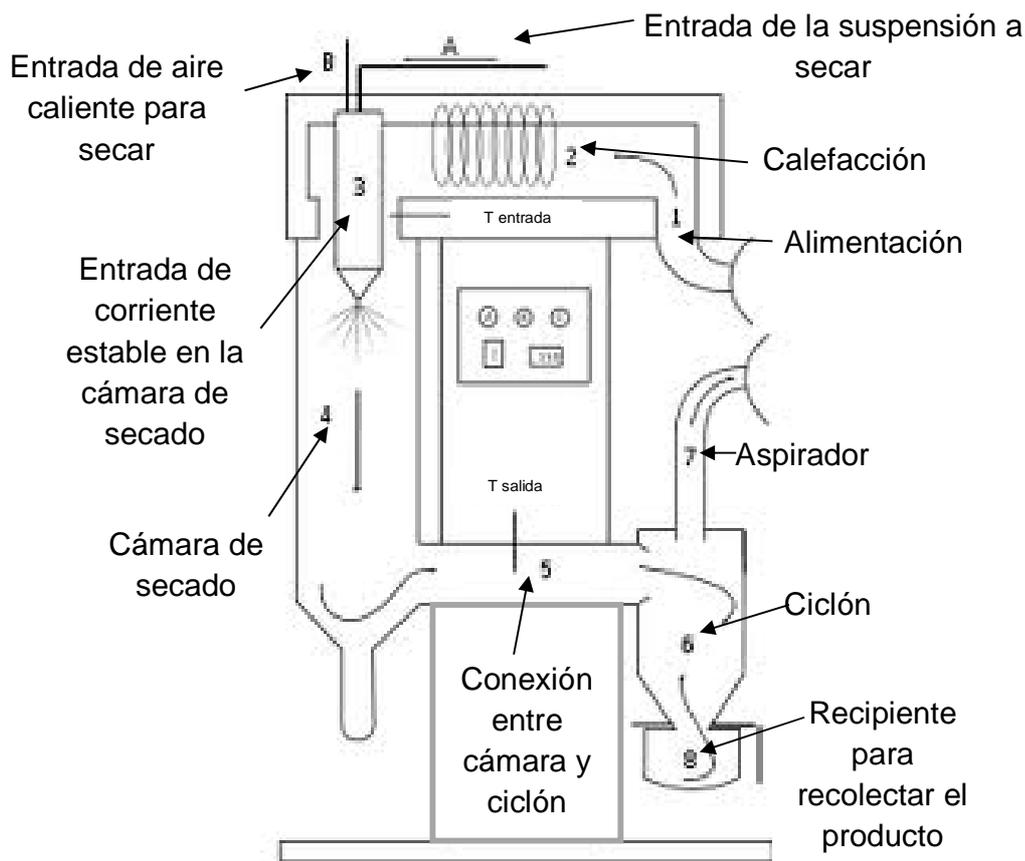


Figura 4. Diagrama del secador por aspersion (Langrish y Fletcher, 2001).

La listeriosis causada por diversas especies de *Listeria*, es una de las enfermedades transmitidas por alimentos de mayor importancia dentro de la población. Es una enfermedad esporádica asociada al consumo de leche contaminada, quesos suaves, carne con un inadecuado cocimiento y vegetales consumidos sin ser lavados, siendo los grupos de mayor riesgo las mujeres

embarazadas, neonatos, adultos mayores y personas inmunocomprometidas (Rahimi y col 2010), sus síntomas (como fiebre, dolor de cabeza, dolores musculares, náuseas, diarrea por mencionar algunos) pueden ser muy severos y en algunos casos van acompañados con una mortalidad del 25% (Liu y col., 2009).

La alta incidencia de listeriosis en productos lácteos aunado con la letalidad de esta enfermedad han contribuido a considerar a *L. monocytogenes* como un riesgo a la salud pública. Las características relevantes de *Listeria* spp además de las anteriormente mencionadas es que soporta el estrés osmótico y puede sobrevivir a condiciones de conservación ligeras (resiste temperaturas de 45 a 50 °C y un pH de 4.4 a 9.6 y hasta un 10 % de NaCl) además de que la capacidad de multiplicarse incluso a temperaturas de refrigeración incrementa el riesgo de infecciones debidos a este microorganismo al consumirse productos refrigerados. El uso excesivo de antimicrobianos ha llevado a la aparición de bacterias resistentes, además el uso de los antimicrobianos usados como promotores del crecimiento en la alimentación animal se ha traducido en la diseminación de estas bacterias resistentes, es por ello que se han tomado medidas de control para controlar el uso de antimicrobianos y prevenir así el esparcimiento de bacterias multirresistentes.

La leche cruda y los productos lácteos son importantes vehículos para la transmisión de diversas enfermedades, siendo *Listeria monocytogenes* el agente etiológico de mayor importancia por su alta letalidad en países con estándares higiénicos que no están estrictamente documentados (Rahimi y col 2010).

La capacidad que tienen algunas cepas de BAL para producir metabolitos con características antimicrobianas además de su capacidad para crecer en medios de cultivo alternativos sin perder su actividad hace viable la incorporación de alguna BAL con estas características para controlar la contaminación debida a este patógeno.

La diferencia principal entre *L. monocytogenes* y *L. innocua* es que en esta última hay una delección de 80 kb en el DNA plasmídico, que codifican para la resistencia a metales pesados. Sin embargo, ambas comparten las proteínas encargadas de

codificar la síntesis de vitamina B₁₂ así la característica de adaptarse en condiciones de anaerobiosis (como las creadas dentro del intestino de los mamíferos) con la única diferencia de que *L. innocua* no es patógena bajo estas condiciones (Buchrieser y col., 2003).

Debido a la patogenicidad de *L. monocytogenes* y por tanto el peligro de realizar estudios bajo las condiciones de laboratorio, se ha considerado utilizar a una cepa que no sea patógena y que se pueda comportar de una manera muy similar bajo las mismas condiciones en las que se trabaje. *L. innocua* es una especie muy relacionada a *L. monocytogenes* (Gram-positiva, no esporulada, psicrótrófa y no hemolítica). Ambas especies de listeria comparten el mismo medio ambiente y son frecuentemente aisladas de leche pasteurizada, quesos blandos, productos lácteos en general, además de otros tipos de alimentos. En estudios anteriores ya se ha demostrado que *L. monocytogenes* puede ser sustituida por *L. innocua* ya que no muestra diferencias en cuanto al crecimiento y sobrevivencia entre ambas especies además de que no hay diferencias significativas en cuanto a la susceptibilidad a metales y a la concentración de sales. Estas características han permitido usar a *L. innocua* como microorganismo subrogado para indicar el crecimiento y supervivencia de *L. monocytogenes* (Liu y col. 2009).

1.5 QUESOS EN MÉXICO

El queso se define como un producto elaborado de la cuajada de la leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin la 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, 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: frescos madurados o prensados.

Los quesos frescos son aquellos que además de cumplir con la descripción general de quesos se caracterizan por su alto contenido de humedad y por no presentar

cortezas o una corteza muy fina, pudiendo o no adicionar aditivos e ingredientes opcionales. Dentro de este grupo de quesos podemos encontrar a los frescales (como el panela, canasto, sierra, ranchero, fresco, blanco, enchilado, adobado), de pasta cocida (como el oaxaca, asadero, mozzarella, del morral, adobera), acidificados (como el cottage, crema, doble crema, petit suisse, neufchatel).

Los quesos madurados son aquellos que además de cumplir con la definición general se caracterizan por ser de pasta dura, semidura o blanda y pueden tener o no corteza; sometidas a un proceso de maduración mediante adición de microorganismos, bajo condiciones controladas de tiempo, temperatura y humedad, para provocar en ellos cambios bioquímicos y físicos característicos del producto del que se trate, lo que le permite prolongar su vida de anaquel, los cuales pueden o no requerir condiciones de refrigeración.

Los quesos procesados son aquellos que se caracterizan por ser elaborados con mezclas de quesos, fusión y emulsión con sales fundentes, aditivos para alimentos permitidos e ingredientes opcionales, sometidos a procesos térmicos de 70 °C durante 30 segundos, o someterse a cualquier otra combinación equivalente o mayor de tiempo y temperatura, lo que le permite prolongar su vida de anaquel. Dentro de este grupo encontramos a los fundidos y a los fundidos para untar.

Los quesos de suero son los productos obtenidos a partir de leche entera, semidescremada, o descremada pasteurizada de vaca, cabra u oveja, el cual es coagulado por calentamiento en medio ácido para favorecer la obtención de la cuajada, la que es salada, drenada, moldeada, empacada y etiquetada y posteriormente refrigerada para su conservación (NOM-243-SSA1-2010).

De acuerdo a los datos presentados en el Cuadro 1, la producción de queso panela en México durante el periodo 2007-2012 se incrementó en un 55 % la producción de queso; sin embargo se observa en la misma tabla que la mayor producción se produjo en el año 2011 en la cual el aumento fue de 64 %, indicando que se tuvo una disminución del 9 % en la producción de este tipo de queso. Esta disminución en la producción de queso panela concuerda con una disminución de la producción

de leche en los mismos años (Cuadro 1). Estos resultados sin embargo no son concluyentes debido a que los resultados presentados son preliminares antes de concluir el año 2012 (SAGARPA, 2012).

Cuadro 1. Producción de queso panela y leche en México del 2007 al 2012
(SAGARPA, 2012)

Año	Toneladas de queso panela	Miles de litros de leche
2007	25372	4463782
2008	27010	4583680
2009	26688	4586287
2010	40851	4441358
2011	41740	4275036
2012	39336	3551157

2. HIPÓTESIS

Mediante la incorporación del cultivo protector *L. lactis* UQ2 rif L⁺ microencapsulado a un queso tipo panela se puede garantizar su inocuidad y prevenir el crecimiento de microorganismos deterioradores y patógenos.

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Incorporar *Lactococcus lactis* UQ2 rif L⁺ microencapsulado a un queso tipo panela así como evaluar su capacidad de prevenir el crecimiento de microorganismos deterioradores y *Listeria innocua*.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Estudiar el material de pared a utilizar en la encapsulación de *Lactococcus lactis* UQ2 rif L⁺.
- ✓ Determinar las condiciones de microencapsulación mediante secado por aspersión.
- ✓ Elaborar un queso tipo panela incorporando el cultivo protector y evaluar su viabilidad y producción de nisina durante el almacenamiento en refrigeración.
- ✓ Realizar un reto de *Listeria innocua* en un queso tipo panela incorporado con el cultivo protector.
- ✓ Determinar el efecto del cultivo protector adicionado al queso tipo panela en el crecimiento de microorganismos deterioradores

4. METODOLOGÍA

4.1 MATERIALES Y REACTIVOS QUÍMICOS

- Almidón modificado, capsul, como material de pared para la encapsulación de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ (National Starch).
- Maltodextrina (almidón de maíz hidrolizado) como material de pared para la encapsulación de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ (Ingredion).
- Nisina comercial (MP Biochemicals).
- Rifampicina (Sigma), solución 10,000 µg/L.
- Solución de alcohol etílico (JT Baker) al 70% (v/v).
- Solución de sulfato de magnesio (MgSO₄, Mallinckrodt) al 10% (p/v).
- Solución de sulfato de manganeso (MnSO₄, Sigma) al 10% (p/v).
- Tween 20 (Hycel) al 50% (v/v).
- Solución Ringer ¼ (para un litro de solución: 9 g de NaCl (JT Baker), 9 g de KCl (JT Baker), 0.24 g de CaCl₂ (JT Baker), 0.20 g de NaHCO₃ (JT Baker) y 1 L de agua destilada; esta mezcla se diluye 1:3 en agua destilada).
- 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).
- Trimetafosfato de sodio, STMP (Sigma).

4.1.1 Cepas Bacterianas y Medios de Cultivo

Lactococcus lactis UQ2 rif L⁺ y *Micrococcus luteus* NCBI 8166. Proporcionados por el laboratorio de Biotecnología de alimentos del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química.

Medio LM17 (para un litro: 39.20 g de medio M17 (Oxoid), 0.5% de α-lactosa (Sigma) y 1 L de agua destilada).

Medio Assay (para un litro: 10 g de peptona de caseína (Bioxon), 3 g de extracto de carne (Bioxon), 3 g de cloruro de sodio (NaCl, JT Baker), 1.5 de extracto de levadura (Bioxon), 1 g de azúcar mascabado (Dilis), 10 g de agar bacteriológico (Bioxon) y 1 L de agua.

Solución de peptona de caseína (Bioxon) al 1 % (p/v).

Medio lactosa púrpura de bromocresol con rifampicina (PBC) (para un litro: 5 g de peptona de caseína (Bioxón), 3 g de extracto de carne (Bioxon), 10 g de α -lactosa (Sigma), 0.04 g de púrpura de bromocresol (Merck), 20 g de agar bacteriológico (Bioxón) y 1 L de agua destilada, posterior a esterilizar agregar 200 μ g/L de rifampicina.

Agar papa y dextrosa (Difco): suspender 24 g del agar en 1 L de agua destilada, posterior a esterilizar agregar 14 mL de ácido tartárico al 10 % (p/v) esterilizado mediante membranas de 45 μ m de tamaño de poro.

Caldo lauril soya tripticaseína, LST (Difco): suspender 35.6 g del polvo en 1 L de agua y llenar con 10 mL de este medio tubos de ensaye de 16x150 mm con campanas de fermentación.

Caldo bilis verde brillante, BVB (Merck): suspender 40 g del polvo en 1 L de agua destilada y llenar con 10 mL de este medio tubos de ensaye de 16x150 mm con campanas de fermentación.

Agar Oxford (Oxoid): suspender 55.5 g del polvo en 1 L de agua destilada, posterior a esterilizar agregar el tubo de suplemento antimicrobiano previamente disuelto en 5 mL de alcohol etílico (JT Baker) al 40 % esterilizado mediante membranas de 45 μ m.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Fosfatación de almidón

La fosfatación de almidón alto en amilosa se llevó a cabo suspendiendo 56 g de almidón en 100 mL de agua, posteriormente se adicionaron 2.5 g de la sal de trimetafosfato de sodio (STPM) por cada 100 g de almidón en base seca, y se ajustó el pH a 8 con NaOH al 5 % (p/v). Después la suspensión se agitó por una hora a temperatura ambiente (mantener el pH de 8 de la solución adicionando la misma solución de NaOH si es necesario), se secó a 45 °C en una estufa y se almacenó en la estufa a 130 °C durante 2 h. El almidón fosfatado se colocó en un procesador de alimentos (o similar), el polvo obtenido se cribó en una malla de 100 µm y se almacenó a temperatura ambiente en una bolsa de polietileno hasta su uso.

4.2.2 Activación de *L. lactis* UQ2 rif L⁺

Un inóculo de *L. lactis* UQ2 rif L⁺ almacenado a -70 °C se colocó en un tubo con 5 mL de caldo LM17 y se incubó a 30 °C por 24 h. Una vez hecha esta activación se inocularon 100 µL de esta primera activación en un segundo tubo con 10 mL de LM17 y se incubó a 30 °C por 12 h. Finalmente, de este último tubo se inoculó un matraz con un volumen igual a la cantidad que se desea secar al 1% (v/v) y se incubó por 6-8 h a 30 °C. Transcurrido este tiempo, el cultivo fue centrifugado y el pellet bacteriano se lavó 2 veces con solución salina al 0.85 % (p/v), este pellet se resuspende en la solución de polímeros.

4.2.3 Preparación de la suspensión de polímeros (material de pared)

Se utilizó como material de pared almidón modificado, maltodextrina y concentrado de proteína de suero al 10% de sólidos. En el volumen final (de agua destilada) que se desea secar se disolvieron los almidones previamente pesados. Una vez que ya se ha incorporado los almidones completamente disueltos se agitan por 15 min a velocidad máxima la suspensión de almidones, transcurrido el tiempo se ajustó el pH de la suspensión a 7.0 con una solución de NaOH al 2% (p/v). La suspensión

fue calentada en baño maría a 80 °C por 10 min manteniendo la agitación, al finalizar este tiempo la suspensión se dejó reposar a temperatura ambiente para poder resuspender con esta solución el pellet de bacterias anteriormente obtenido.

4.2.4 Microencapsulación de *L. lactis* mediante secado por aspersión

El proceso de microencapsulación se llevó a cabo usando un secador por aspersión de laboratorio marca Büchi B-191 (Mini Spray Dryer B-191). Las condiciones de secado fueron las siguientes: temperatura de entrada 160 °C, temperatura de salida entre 75 y 87 °C, capacidad de la bomba de alimentación entre 30 y 35 %, porcentaje de aspiración entre 85 y 95%, el equipo tiene un diámetro de boquilla de 0.7 mm. Las cápsulas fueron recolectadas primeramente en el cilindro recolector de la muestra para posteriormente ser almacenadas en frasco de vidrio estéril con sello hermético a 4 °C hasta su uso. Antes de utilizar el equipo las piezas se lavaron y se desinfectaron con alcohol etílico al 70 % (v/v), se evaporó el alcohol y se montó el equipo para comenzar el proceso de secado.

4.2.5 Método de recuento bacteriano Miles-Misra (método de la gota)

De la suspensión de almidones ya con el pellet de bacterias resuspendido se tomó una muestra representativa para preparar una serie de diluciones decimales seriadas. Así se tomó 1 mL de esta suspensión y se diluyó en un tubo con 9 mL de solución de peptona al 0.1 % (p/v), se tomó 1 mL de este tubo y se diluyó en otro tubo con 9 mL de la misma solución. Este procedimiento fue repetido hasta obtener las diluciones necesarias. Para realizar la cuenta se colocaron tres gotas de 20 µL de cada una de las diluciones (Figura 3) en cajas con agar PBC y se dejaron secar en temperatura ambiente en una campana de flujo laminar, una vez seca las gotas las cajas se incubaron a 30 °C por 48 h, para luego contar las colonias y determinar así la población antes y después del secado.

Para el caso del polvo que se obtenía del secado se pesó una cantidad representativa (aproximadamente 0.15 g) y se disolvieron en 1.5 mL de la misma solución de peptona, a partir de este tubo se procedieron a realizar las soluciones.

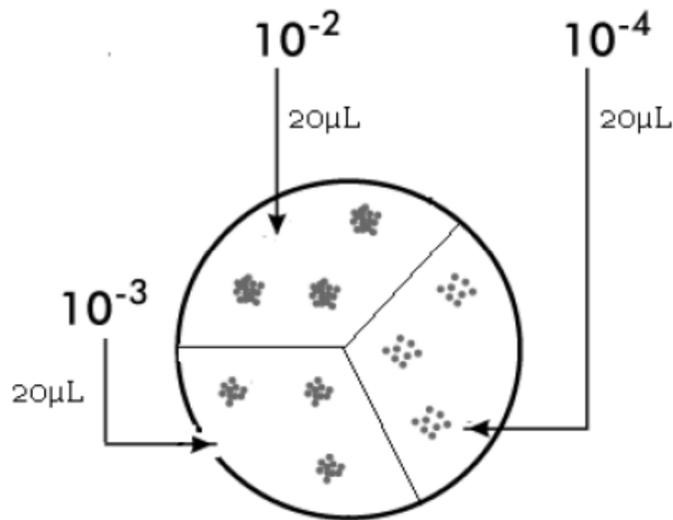


Figura 5. Método Miles-Misra para recuento bacteriano (Rodríguez, 2009).

4.2.6 Activación de *Micrococcus luteus*

Se utilizó cepa de *M. luteus* NCIB 8166 proveniente de una conserva que se encontraba a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ la cual se colocó en un tubo con caldo assay y se incubó por un periodo de 48 h a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, finalizado este periodo de incubación se sembró por estriado en un tubo inclinado y en cajas con agar assay al 1% para verificar la pureza de las cepas (González, 2009).

De la cepa que se aisló se tomó una asada y se sembró por estriado en tubos inclinados con agar assay al 1% (p/v). Para realizar los ensayos de actividad se tomó el cultivo de los tubos inclinados, se diluyeron las colonias con 1 mL de solución Ringer $\frac{1}{4}$ y este extracto se guardó en un vial estéril. Luego, de este extracto concentrado se tomaron 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 y 20 μL y se llevaron a un volumen final de 1 mL con solución Ringer $\frac{1}{4}$, para ajustar la concentración del microorganismo a una absorbancia de 0.3 ± 0.01 estas diluciones se leyeron a una longitud de onda (λ) de 650 nm. La solución obtenida se denomina solución de trabajo.

4.2.7 Elaboración de queso tipo panela incorporando *L. lactis* UQ2 rif L⁺ encapsulado

Para la elaboración del queso panela utilizó leche pasteurizada comercial, esta se colocó en una olla y se calentó hasta alcanzar una temperatura de 30 °C. Se agregó cloruro de calcio (CaCl₂, JT Baker) a una concentración de 0.05 g/L, se disolvió completamente en la leche y posteriormente se agregó cuajo (Qualact) a una concentración de 0.4 mL/L, se homogeneizó de forma rápida y completa en la leche y se dejó cuajar por 30-45 min. Posteriormente se cortó la cuajada en cubos de aproximadamente 1 cm y se desuero parcialmente (60-70 % del volumen inicial) posteriormente la pasta se saló al 0.7 % (p/v) respecto al volumen original de leche; una vez que se hubo integrado completamente la sal a la pasta se desuero totalmente la pasta y se agregó el microorganismo encapsulado a una concentración de 10⁷ ufc/g en pasta, se homogeneizó para asegurar una incorporación uniforme del polvo con la bacteria encapsulada y se procedió a moldear. El molde se colocó en refrigeración por 12 h, finalmente se desmoldó y se empacaron al vacío y en refrigeración las muestras de queso.

4.2.8 Determinación de actividad de nisina en queso

Se pesaron 40 ± 0.1 g del queso antes preparado anteriormente en un matraz Erlenmeyer de 500 mL, esta muestra se disolvió completamente en aproximadamente 160 mL de HCl 0.02 N con agitación constante. Una vez que se disolvió completamente el queso en el ácido se ajustó el pH a 2.0 ± 0.1 con HCl 5 N, la muestra fué entonces calentada en baño maría asegurándose que el extracto se encontrara por lo menos a 98 °C por 5 min, inmediatamente después se enfrió el extracto en un baño de hielo igualmente por 5 min a fin de que alcanzara una temperatura de 20 ± 5 °C. Se ajustó el volumen del extracto a 200 mL con HCl 0.02 N, se centrifugó a 11000 rpm por 30 min, para luego extraer la solución que se encontrara en el centro del tubo para evitar tomar parte de la grasa del queso (que se encontraba en la parte superior) o sólidos que puedan quedar del mismo queso

(depositados en el fondo de los tubos), esta solución fué esterilizada mediante membranas estériles de 0.45 μm y guardada en refrigeración hasta su análisis.

4.2.8.1 Método de difusión en agar

Las placas para la determinación de actividad se prepararon con medio assay al 1 % (p/v), inoculando con 2 % (v/v) de la solución de trabajo de *M. luteus* y 2 % (v/v) de solución Tween 20 al 50 % (v/v). En cada caja se realizaron perforaciones con un horador estéril No. 4. En cada perforación se colocaron 60 μL de los extractos de las muestras de queso con sus réplicas correspondientes. Las placas se dejaron secar y se incubaron a 30 °C por 48 h para que se pudieran observar los halos de inhibición en los pozos. Transcurrido el tiempo de incubación se midió el halo de inhibición de acuerdo al estándar Británico (BS 4020, 1974). La actividad antimicrobiana de los extractos se expresó en Unidades Internacionales (UI), las cuales se calcularon interpolando el diámetro del halo de inhibición (mm) vs log UI, mediante una curva de calibración.

4.2.8.2 Elaboración de la curva estándar de nisina

Para la elaboración de estándar de nisina se preparó inicialmente una solución usando nisina comercial, así se mezclaron 10^5 UI ($100 \pm 1\text{mg}$) de un estándar de nisina en 80 mL de HCl 0.02 N estéril. Se disolvió esta solución en baño maría a 98 °C por 5 min, después la solución se enfrió a temperatura ambiente (20 ± 5 °C) y se dejó reposar por 2 h para después aforar la solución a 100 mL, esta solución tiene una concentración de 100 UI. Se almacenó en refrigeración de 4 a 7 °C y fué estable hasta por 7 días. A partir de esta solución se hicieron las diluciones correspondientes para elaborar una curva de calibración con 0, 2, 4, 6, 8 y 10 UI.

4.2.9 Determinación de acidez en las muestras de queso

Para la determinación de acidez se maceraron 20 g de la muestra de queso con agua tibia a 40 °C para producir un volumen total de 210 mL, posteriormente se filtró con manta de cielo. Se titularon 25 mL del filtrado anterior con NaOH 0.1 M

usando fenolftaleína como indicador y la acidez se calculó como porcentaje de ácido láctico (Pearson, 1976).

$$\% \text{ ácido láctico} = \frac{(\text{mL de NaOH gastados})(0.009)(100)}{\text{peso de la muestra}}$$

$$^{\circ}\text{D} = (\% \text{ acidez})(100)$$

4.2.10 Determinación de organismo coliformes fecales por el método de número más probable, NMP

Para la determinación de organismos coliformes fecales (OCF) se pesaron 10 g de muestra y se disolvieron en 90 mL de solución de peptona al 0.1 % (p/v), a continuación se realizaron diluciones decimales seriadas. Para la determinación de OCF se procedió a inocular primeramente 1 mL de estas diluciones en tres tubos con 10 mL de caldo LST (Dofco) con campanas de fermentación y se incubaron por 24 h a 35 °C, al finalizar este periodo de incubación se observó si hubo producción de gas dentro de las campanas y si no prolongó a 48 h el tiempo de incubación. De los tubos positivos (con producción de gas) de esta prueba presuntiva, se tomó una asada y se inoculó ahora en un número igual de tubos con medio de confirmación (que fueron tubos con caldo bilis verde brillante (Merck) provistos de campanas de fermentación) e incubaron a 44.5 °C, igualmente se verificó la producción de gas dentro de las campanas a las 24 h y si no se prolongó hasta 48 h la incubación. Finalizado este periodo se observó la combinación de tubos positivos y se comparó con las tablas de la NOM-112-SSA1-1994 para así indicar la concentración de OCF según el método estadístico NMP (NOM-112-SSA1-1994).

4.2.11 Determinación de *Listeria monocytogenes*

Para la determinación de *Listeria* en queso se pesaron 25 g de muestra y se disolvieron en 225 mL de solución salina al 0.85 %, se hicieron diluciones decimales seriadas de la muestra y se sembraron en medio Oxford incubando las

placas por un periodo de 24 a 48 h a 37 °C. Las colonias de un color negro con un halo del mismo color son características de *Listeria* (NOM-143-SSA1-1995).

4.2.12 Determinación de mohos y levaduras

Para la determinación de mohos y levaduras se colocaron en cajas petri estériles 1 mL de la muestra líquida de la muestra líquida de las diluciones seleccionadas. Se vertieron a continuación 15-20 mL de agar, agar papa-dextrosa con 1.4 % de ácido tartárico al 10 %, fundido a 45 ± 1 °C, se mezcló cuidadosamente el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis en sentido de las manecillas del reloj, seis en sentido contrario y seis de atrás hacia adelante sobre una superficie lisa. Se dejaron secar las placas y se incubaron a 25 ± 1 °C, se contaron las colonias después de 3, 5 y 7 días de incubación. El experimento se realizó por duplicado de acuerdo a la norma (NOM-111-SSA1-1994).

4.2.13 Reto de *Listeria monocytogenes* en queso con cultivo protector.

Una conserva de *Listeria innocua* se colocó en caldo soya tripticaseina y se incubó a 37 °C por 24 h. Una vez que la bacteria alcanzó su máxima población se tomó una muestra y se calculó la cantidad de inóculo necesaria para la leche o la pasta según fuera el caso para obtener una población de 1×10^7 ufc/mL o ufc/g, respectivamente. Junto con la *L. innocua* se inoculó el queso con el cultivo protector *L. lactis* UQ2 rif L⁺ con una población de 1×10^7 ufc/mL o ufc/g respectivamente.

El procedimiento para la elaboración es el mismo descrito en el punto 4.2.6, la única variación es que la *Listeria innocua* y el *Lactococcus lactis* fueron agregados ya sea desde la leche antes de agregar el cuajo, o en la pasta como usualmente se agrega el cultivo protector.

Se determinó la población tanto de *Listeria innocua* como de *L. lactis* durante el periodo de almacenamiento (21 días en refrigeración a 4 °C) de los quesos elaborados.

5. RESULTADOS

5.1 EVALUACIÓN DE MATERIAL DE PARED PARA LA ENCAPSULACIÓN DE *L. lactis* Y SUS CONDICIONES DEL PROCESO DE SECADO

A continuación en el Cuadro 2 se presentan los resultados de las diferentes mezclas y condiciones de secado de las pruebas que se realizaron así como la población de *Lactococcus lactis* obtenida de los mismos.

Cuadro 2. Condiciones de secado evaluadas para la microencapsulación de *L. lactis* UQ2 rif L⁺.

Temperatura °C		Material	Población <i>L. lactis</i>	Recupera- ción % Sólidos	Recuperación % viabilidad
Entrada	Salida				
160	93	Almidón fosfatado y CPS	3.5x10 ⁷ UFC/g	56.27 %	0.06 %
160	76	Almidón modificado y maltodextrina	4.0x10 ⁷ UFC/g	53.05 %	0.33 %
160	68	Almidón modificado, maltodextrina y CPS	5.0x10 ⁹ UFC/g	60.80 %	6.29 %
160	58	Almidón modificado, matodextrina y CPS	7.16x10 ⁸ UFC/g	79.54 %	1.62 %
160	64	Almidón modificado, matodextrina y CPS	4.3x10 ⁹ UFC/g	83.94 %	1.50 %

Para el uso de este polvo con el cultivo protector incorporándolo en un queso tipo panela se trabajó con la última condición presentada en el Cuadro 2. Esto para poder llevar a cabo los análisis que permitieran alcanzar los objetivos planteados.

5.2 ACTIVIDAD DE NISINA, DETERMINACIÓN DE ACIDEZ Y EVALUACIÓN DE MICROORGANISMOS INDICADORES DEL QUESO TIPO PANELA INCORPORADO CON EL CULTIVO PROTECTOR.

Se determinó la nisina en las muestras de queso adicionados con el cultivo protector antes obtenido. En la Figura 4 se muestran que el máximo alcanzado a los 21 días de almacenamiento es de 6.6 ppm (mg de nisina/kg de queso).

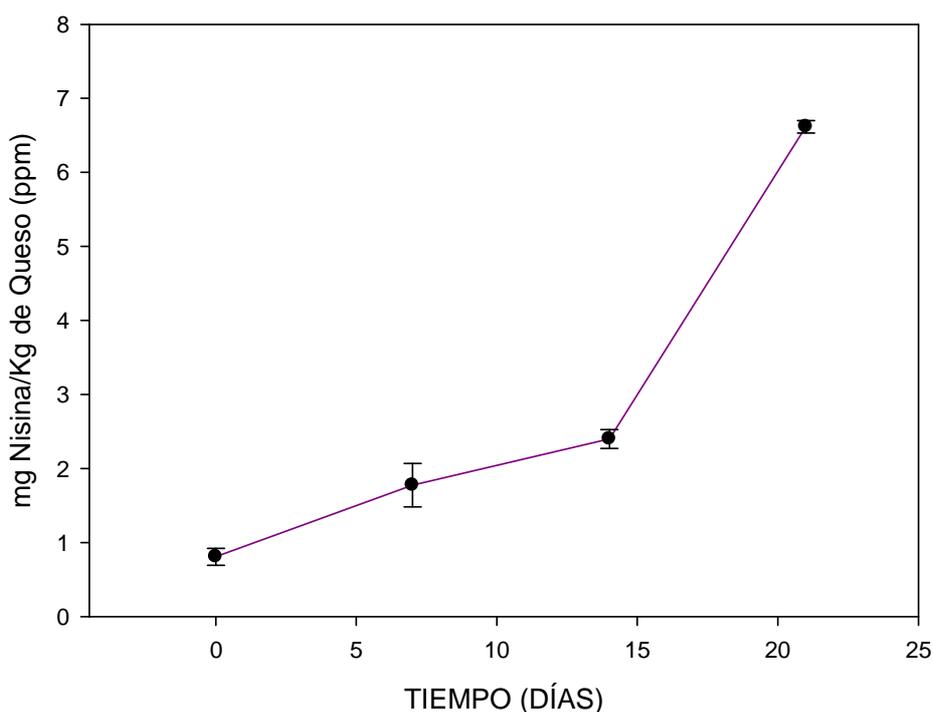


Figura 6. Producción de nisina en ppm (mg de nisina/kg de queso) en queso adicionado de *L. lactis*. Las barras muestran la desviación estándar de los triplicados.

Lo anterior al ser adicionada la cantidad de 1×10^7 UFC/g, también se presenta en el Cuadro 3 una comparación de la producción de nisina en diferentes unidades.

Cuadro 3. Producción de nisina en queso adicionado de *Lactococcus lactis* en diferentes unidades.

TIEMPO (DÍAS)	ppm (mg/kg)	UI/g
0	0.8	81.1
7	1.8	72.2
14	2.4	97.9
21	6.6	104.7

La acidez de las muestras del queso alcanzó un máximo de 41.2 °D, y como se observa en la Figura 5, esta va aumentando durante el periodo de almacenamiento. Cabe mencionar que durante los análisis no se percibió un olor ácido de las muestras.

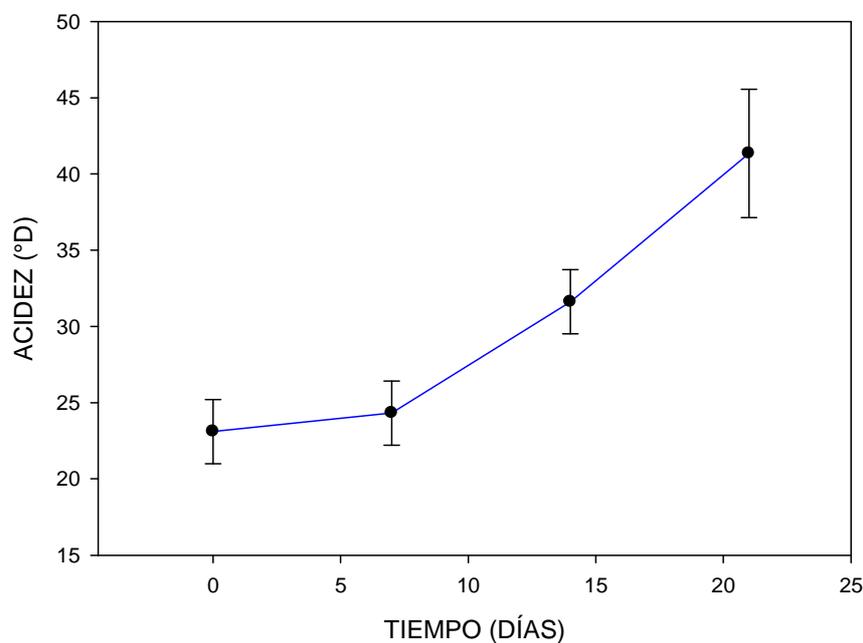


Figura 7. Acidez en las muestras de queso en grados Dornic (°D). Las barras muestran la desviación estándar de los triplicados.

Como parte de los análisis de calidad y de acuerdo a las normas NOM-111-SSA1-1994 para mohos y levaduras y a la NOM-112-SSA1-1994 para organismos coliformes fecales (OCF). El queso elaborado no presentó crecimiento de los primeros durante el almacenamiento y para el caso de OCF estos estuvieron dentro de la norma durante ese periodo, este crecimiento se muestra en la Figura 6, siendo el conteo a los 21 días de 50 UFC/g para OCF, el cual se encuentra dentro de la norma. No se presentan graficas de mohos y levaduras ya que no hubo crecimiento de ellos durante el almacenamiento.

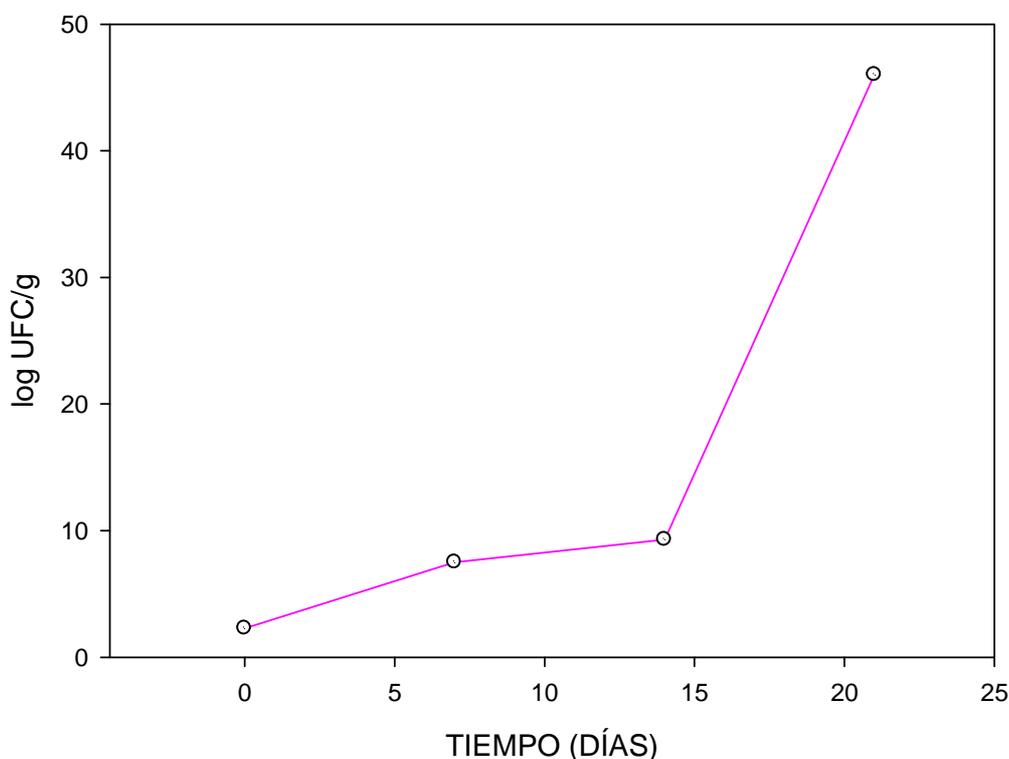


Figura 8. Organismos coliformes fecales (OCF) en el queso. Las barras de error no se observan porque la desviación estándar fue pequeña.

Se midió también la población del cultivo protector en el queso, en la Figura 7 se muestra que se obtuvo una población de *L. lactis* de 2.1×10^4 , 5.5×10^4 , 5.1×10^4 y 1.17×10^3 UFC/g a los 0, 7, 14 y 21 días respectivamente.

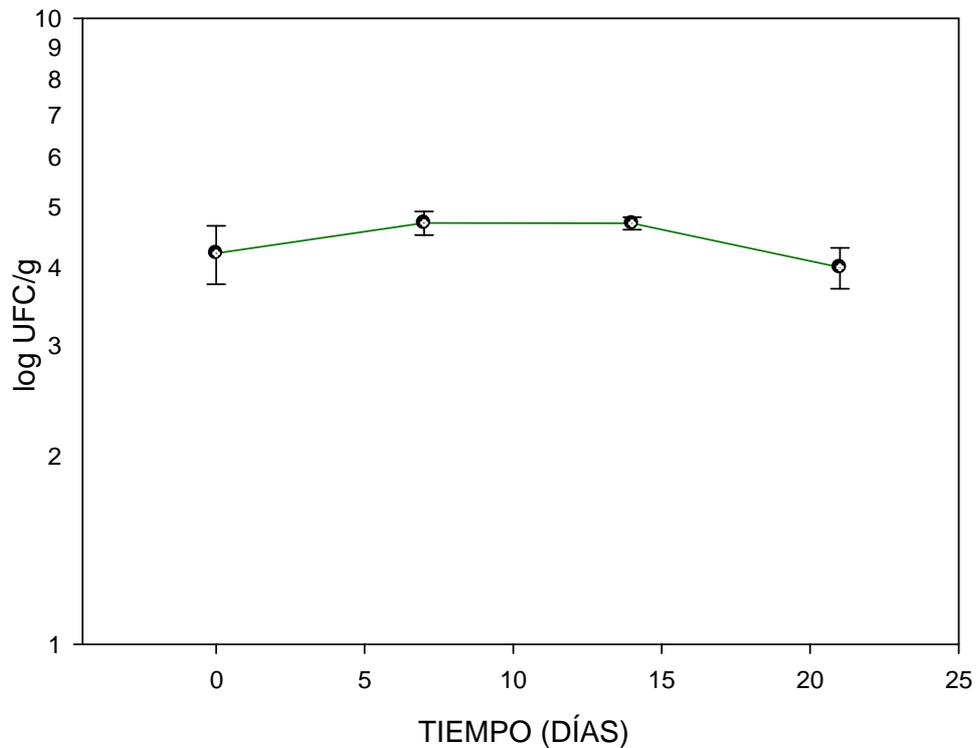


Figura 9. Población de *L. lactis* en el queso durante almacenamiento. Las barras muestran la desviación estándar de los triplicados.

5.3 RESULTADOS DEL ANÁLISIS SENSORIAL HECHO CON EL QUESO INCORPORADO DEL CULTIVO PROTECTOR.

Se realizó un análisis sensorial semanal durante el periodo de almacenamiento (0, 7, 14 y 21 días) con un panel no entrenado de 100 personas cuya edad fluctuó entre los 18 y los 31 años, en el cual los panelistas evaluaron al queso tipo panela conteniendo el cultivo protector con un promedio de 7, es decir un 70 % de aceptación, de acuerdo a una escala hedónica de 0 a 10. En la Figura 8 se muestran los promedios de los atributos evaluados, los cuales fueron aroma, textura y sabor, a los tiempos mencionados anteriormente.

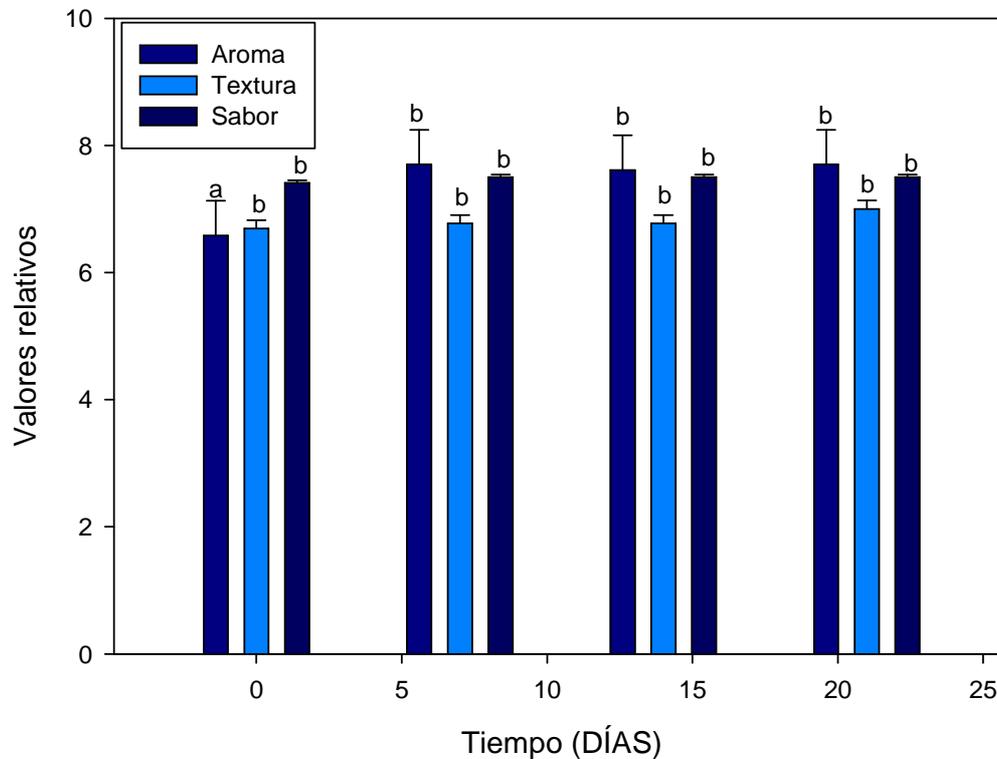


Figura 10. Características evaluadas en el análisis sensorial de queso de acuerdo a una escala hedónica de 10 puntos. Letras diferentes indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

5.4 RETO DEL CULTIVO PROTECTOR CON *Listeria innocua* COMO SUBROGADO.

Se incorporó tanto el cultivo protector, *L. lactis*, como la *L. innocua* desde la leche ambos en una concentración de 1×10^7 UFC/mL.

Para el caso del cultivo protector, y como se observa en la Figura 9, se observa que se mantiene durante los primeros 7 días, mientras que *L. innocua* disminuye en ese mismo periodo. Sin embargo al final del periodo de análisis *L. innocua* aumenta su población y *L. lactis* ya no muestra crecimiento (según la técnica usada para su

determinación que es Miles-Misra no hay crecimiento a los 21 días, siendo el límite de detección de esta técnica de 50 UFC/g).

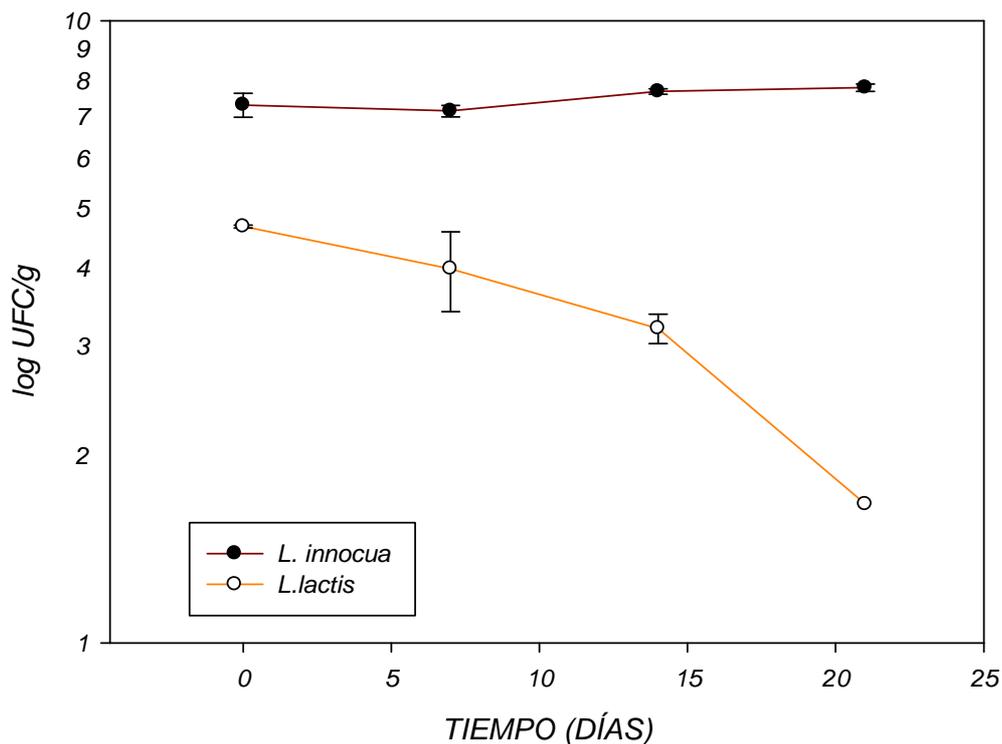


Figura 11. Población de *Listeria innocua* y *Lactococcus lactis* agregados en la leche antes de cuajar. Las barras muestran la desviación estándar de los triplicados.

Se realizó la inoculación de las mismas bacterias ahora ya en la pasta con un 70 % de desuerado en la misma población que el experimento anterior 1×10^7 UFC/g. Como se observa en la Figura 10 la población de *L. innocua* disminuye desde los 7 días de almacenamiento hasta una población de 1.67×10^2 UFC/g, *L. lactis* durante los 21 días de almacenamiento mantuvo su población entre 5.67×10^3 y 7×10^3 UFC/g.

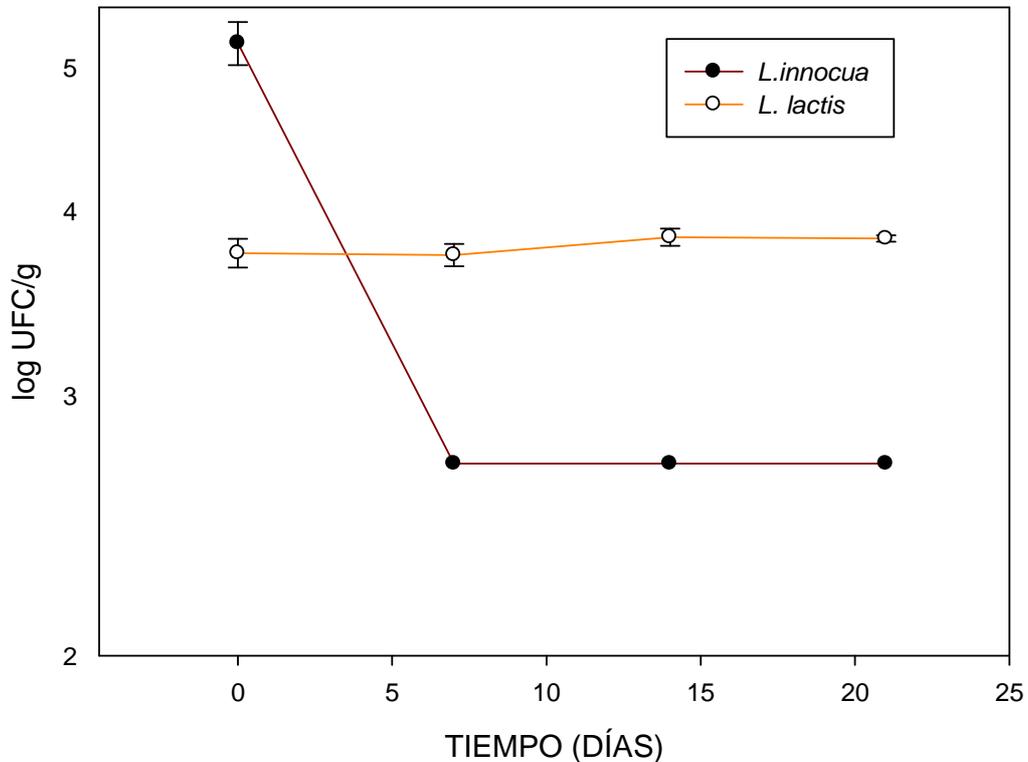


Figura 12. Población de *Listeria innocua* y *Lactococcus lactis* agregados en la pasta en una concentración menor a 1×10^7 UFC/g. Las barras muestran la desviación estándar de los triplicados.

Este último experimento se repitió usando el rendimiento de los quesos anteriormente elaborados (el cuál fue mayor al 10 % teórico con el que se hicieron los dos primeros quesos), y el comportamiento de estos microorganismos fue muy similar al experimento anterior, como se muestra en la Figura 8, donde se usó la concentración del cultivo protector que por experimentos preliminares se esperaba que causara una inhibición total de *L. innocua*, lo cual ocurrió a los 21 días, y en el Cuadro 4 se muestran las poblaciones de ambos microorganismos.

Cuadro 4. Poblaciones de *Lactococcus lactis* y *Listeria innocua* en el queso.

Tiempo (días)	<i>Listeria innocua</i> (UFC/g)	<i>Lactococcus lactis</i> (UFC/g)
0	$3.33 \times 10^5 \pm 0.12$	$1.33 \times 10^7 \pm 0.11$
7	$3.66 \times 10^4 \pm 0.07$	$4.67 \times 10^8 \pm 0.06$
14	$1.67 \times 10^2 \pm 0.69$	$5.50 \times 10^8 \pm 0.08$
21	<50	$6.17 \times 10^8 \pm 0.04$

6. DISCUSIÓN

Como se observa en el Cuadro 2, las condiciones de secado más adecuadas fueron las del último tratamiento, pero para llegar a obtener esta población en las microcápsulas deshidratadas (entre 4×10^9 y 5×10^9 UFC/g) fue necesario concentrar 6 veces el volumen donde se crecieron las bacterias. Es decir que para secar 250 mL de la solución de carbohidratos con los que se encapsula la bacteria fue necesario activar 1.5 L de la bacteria, esto permite obtener una mayor cantidad de la bacteria en su forma libre, la cual se recupera en forma de un pellet al centrifugar el medio donde se creció la bacteria y es la que se resuspende en la solución de carbohidratos y WPC.

En las mezclas evaluadas que se presentan en el Cuadro 2 se observa que en la primera formulación la viabilidad y el porcentaje de recuperación de sólido para el almidón fosfatado fueron muy bajos. Esta formulación así como las condiciones de secado se hicieron tomando como base el trabajo hecho por Castro (2010) para lo cual se llevó a cabo la fosfatación de un almidón alto en amilosa, de acuerdo a como se menciona en la metodología (apartado 4.2.1), esta mezcla sin embargo no fue la ideal como matriz de encapsulación para *L. lactis* debido a su forma de activación, y es debido a esto, que se puede atribuir los bajos porcentajes mencionados. Las otras formulaciones presentadas en el mismo cuadro se hicieron usando inicialmente solo una mezcla de almidón modificado y maltodextrina, sin embargo como se muestra, el uso de estos polímeros junto con el CPS muestra resultados con poblaciones más altas de la bacteria encapsulada. El uso de estos carbohidratos como materiales de pared ya se ha reportado (Riaz y Masud, 2013) que otorgan mejores resultados al momento de encapsular bacterias, estos estudios se han hecho al usar técnicas de extrusión y emulsión para la encapsulación, mostrando mejores viabilidades de las células debido a que estas reciben menores daños ya que las temperaturas que se usan en estos procesos son bajas, incluso mostrando que la viabilidad de estas células encapsuladas es mayor al ser incorporadas en una matriz alimentaria. Esta característica mencionada en particular, concuerda con lo observado en el presente trabajo ya

que la población de *L. lactis* en queso si presenta crecimiento a lo largo de los 21 días de almacenamiento, pese que este aumento no es tan marcado, si es posible observar que la bacteria encapsulada se logra adaptar a esta matriz. Sin embargo los métodos de encapsulación de emulsión y extrusión tienen la desventaja de que son más difíciles para escalarlos, así como su costo, ya que este es más elevado, en el caso de la emulsión principalmente debido a la necesidad del uso de aceites naturales y para el caso de la extrusión debido a que el costo de las gomas que se usan en las mezclas en algunos casos es elevado. Es por ello que el uso de materiales como almidones y CPS, los cuáles son de bajo costo hace que el proceso de encapsulación sea más económico que los dos antes mencionados.

El porcentaje de supervivencia de los inóculos sometidos a secado por aspersión bajo las condiciones óptimas fue de 1.5 a 1.6 %, siendo este similar al reportado por Anal y col. (2007); en cual se encapsulan probióticos (*B. longum*) con un porcentaje de supervivencia de 1.4 %, esta viabilidad es baja, pero es de esperarse debido a las temperaturas a las cuales se someten las bacterias durante el proceso de secado, igualmente Heidebach (2012) reporta que el porcentaje de supervivencia de las bacterias sometidas a este tipo de tecnologías es de 1 a 10 %, sin embargo para el caso de cepas de bacterias termotolerantes, el porcentaje de supervivencia sería mayor; sin embargo al comparar estos resultados podemos observar que la bacteria que se encapsuló en este trabajo presenta una supervivencia similar a los casos donde se han encapsulado BAL para ser usadas como probióticos. En estudios realizados por Both y col. (2012), muestran que una opción para aumentar la supervivencia durante la encapsulación de bacterias es recomendable que el material que se va a usar como material de pared sea disuelto en una solución más favorable para las bacteria como lo es la solución Ringer, así mismo la temperatura de la solución se recomienda que sea de 4 °C al momento de agregar el pellet de bacterias obtenido.

El comportamiento observado de *L. innocua* en la Figura 11 es similar al encontrado en un estudio hecho en un queso blanco (Al-Holy y col., 2012), en el cual al agregar nisina junto con *L. innocua* desde la leche, se observó que

aplicando una concentración de 500 UI/mL esta bacteria patógena no llega a inhibirse, ya que al igual que en el trabajo hecho en esta tesis (Figura 11) se observa que a partir de los 6 días la población comienza a aumentar en el queso almacenado a 4 °C. Para que el uso de nisina sea efectivo al ser aplicada desde la leche en el estudio de Al-Hoy se demostró que es necesaria la combinación de este antimicrobiano en concentraciones más altas, 1000 UI/mL como mínimo, junto con un tratamiento térmico (63 °C/5 min).

El uso de bacteriocinas para ser adicionadas de una forma similar al queso en este estudio, es decir agregadas en la pasta, muestra un comportamiento similar al encontrado por Mojgani y col. (2010); en el cual al probar una cepa productora de una bacteriocina (*Lactobacillus casei* RN 78 productor de lactocina RN 78) agregada una vez que se ha elaborado el queso muestra que se puede llegar a inhibir *L. monocytogenes* adicionada en una concentración de 10⁴ UFC/mL. Sin embargo, la acción de esta bacteriocina se ve limitada por la concentración de sal, ya que la lactocina RN 78 por si sola necesita que sea agregado un 3 % de NaCl adicional. Este comportamiento sería comparado al mostrado en la Figura 12, en la cual se pudo reducir la concentración de *L. innocua* pero no hasta su inhibición. Para que esta bacteriocina, tenga un comportamiento similar a la nisina producida por *L. lactis* usado en este trabajo en el cual *L. innocua* llega a inhibirse (Cuadro 4), es necesario que además de la incorporación de *Lb. casei* se adicione la lactocina RN 78 ya que de esta manera ambas llegan a inhibir *L. monocytogenes*. Al comparar el estudio hecho en este trabajo con el de Mojgani y col. (2010) puede apreciarse que el efecto de la nisina producida por *L. lactis* es más efectivo para combatir *L. monocytogenes* que la propia lactocina de *Lb. casei* ya que esta última pese a que logró inhibir el mismo patógeno (esto de acuerdo al límite de detección de la técnica usada, Miles-Misra, para la determinación de *L. lactis* y *L. innocua*, el cual es de 50 UFC/g), fue cuando este se encontraba en una concentración menor, ya que en el estudio de Mojgani *L. innocua* se agregó en una concentración de 1x10⁴ UFC/mL.

El uso de bacteriocinas previamente encapsuladas también muestran un mejor comportamiento para combatir contaminaciones por *L. innocua* en queso. Por

ejemplo, Benech y col. (2002), probaron el uso de nisina Z encapsulada en liposomas para ver el comportamiento de un queso madurado inoculado con 10^5 - 10^6 UFC/mL de *L. innocua*, en donde se observó que el uso de esta bacteriocina pudo reducir hasta en 3 log UFC/g la población de *L. innocua*. Sin embargo, la inhibición de esta misma bacteria se logró solo al final del periodo de almacenamiento (6 meses). Con esto corroboramos que el uso de un cultivo protector más concentrado encapsulado en una matriz alimentaria, como en el caso del presente trabajo muestra mejor efecto inhibitorio de *L. innocua* en un tiempo más corto de almacenamiento.

Al comparar los resultados de Al-Holy y col. (2012), Mojgani col. (2010), y Benech col. (2002), se ve claramente que la etapa en la que se adicionan ya sea las bacteriocinas solas o las cepas productoras de estas es determinante, ya que si éstas se adicionan previo a un desuerado la capacidad bactericida que estas tengan se disminuirá al reducir la concentración y/o número de células que lleguen al queso final. Un tratamiento previo a la adición de estos cultivos protectores puede ser la encapsulación, ya que esta les brindará una protección extra al ser incorporadas en la matriz alimentaria.

En cuanto a la producción de nisina en las muestras de queso se observa que la concentración obtenida a los 7 días de almacenamiento es similar a la encontrada por Piña (2012). El comportamiento de la producción de nisina, de igual manera sigue el mismo comportamiento que en el estudio antes mencionado llegando, en este caso, a alcanzar una máximo de 104.7 UI/g de queso lo que corresponde a 6.6 ppm (mg de nisina/kg de queso). Concentración que pese a que es mayor que en el estudio anterior, hecho por Piña (2012), aún se encuentra dentro de lo permitido por la norma NOM-243-SSA1-2010 la cual nos marca como un máximo 12.5 ppm para quesos frescos. Como ya se mencionó previamente la concentración de nisina alcanzada en estudios hechos por Al-Holy y col (2012) es de 1000 UI/mL, la cual, sobrepasa casi en 50 veces la obtenida en este estudio ($104.7 \text{ UI/g} = 20.9 \text{ UI/mL}$).

En cuanto a la acidez se observa en la Figura 7 que esta va aumentando a lo largo de periodo de almacenamiento. Pese a que no hay ninguna norma en nuestro país que establezca los límites de acidez permitida para quesos, en estudios hechos por Piña (2012) se encontraron valores de 67.6 °D en un queso del mismo tipo que este, mientras que en el presente trabajo la máxima acidez que se encontró fue de 41.3 °D lo cual nos muestra que la adición del inóculo de forma encapsulada permite que en el mismo periodo de almacenamiento la producción de ácido láctico sea menor, esto nos permite que los sabores característicos del queso elaborado de forma convencional sin el cultivo protector se mantengan ya que el queso no adquiere un sabor ácido.

Se determinaron microorganismos indicadores de contaminación ambiental y fecal, tales como mohos y levaduras así como coliformes fecales (OCF) respectivamente, según la norma NOM-121-SSA1-1994 en la que se establecen los límites máximo permisibles, siendo para mohos y levaduras 500 UFC/g y para coliformes fecales 100 UFC/g (según las metodologías citados anteriormente). Para el caso de mohos y levaduras no se muestran ninguna gráfica ya que durante los 21 días de almacenamiento (haciendo determinaciones cada semana) no se presentó crecimiento en las muestras de queso analizadas; para los OCF estos obtuvieron un máximo de 50 UFC/g al final del tiempo de almacenamiento.

Adicional a estos análisis se llevó a cabo un análisis sensorial usando un panel no entrenado a quienes se les pidió evaluar al queso que se le adicionó el cultivo protector en tres atributos, los cuales fueron: aroma, textura y sabor. Como se muestra en la Figura 10, estos atributos muestran valores promedio cercanos a 7 (70 % de aceptación), incluso se puede apreciar que para el caso del aroma su aceptación va aumentando a lo largo de los 21 días, mientras que el sabor y la textura muestran mantener su aceptación durante el mismo periodo de análisis.

En cuanto a la población de *L. lactis* en un primer experimento (Figura 9), se muestra que la población aumenta, pero al final la población muestra una marcada disminución, esto debido a que la cantidad del cultivo protector que se agregó fue

tomando un 10 % de rendimiento al momento de elaboración del queso, mientras que el rendimiento final del producto fue de 19 %. A partir de este resultado, se elaboró un queso del mismo tipo al cuál se le agregó además del cultivo protector *L. innocua* (como subrogado de *L. monocytogenes*).

Primeramente se adicionaron ambos microorganismos en la leche antes de que se procediera a cuajar y como se observa en la Figura 9. A los 0 y 7 días la población de *L. lactis* se mantiene, mientras que *L. innocua* muestra una disminución a los mismos 7 días. Sin embargo a partir de los 14 días la población de *L. innocua* comienza a adaptarse a la matriz por lo que su población aumenta, mientras que *L. lactis* comienza a disminuir hasta que al final del periodo de almacenamiento ya no es detectada por la metodología usada para determinar la población de ambos microorganismos.

A la par que se realizó este experimento se elaboró un queso con la diferencia que ambos microorganismos fueron adicionados ya en la pasta con un 70 % de desuerado, observando en la Figura 10 que la población del cultivo protector se mantiene entre 5.67×10^3 UFC/g y 6.83×10^3 UFC/g entre los 0 y 21 días mientras que *L. innocua* no llega a inhibirse pero si se reduce de 1.67×10^5 UFC/g a 1.67×10^2 UFC/g.

Al observar que *L. lactis* no cumplía completamente su papel como cultivo protector, ya que se esperaba que este pudiera inhibir completamente la *L. innocua* para este experimento se tomó el porcentaje de rendimiento del primer queso elaborado para evitar que la población fuese menor a la estipulada inicialmente en el procedimiento. Finalmente pudimos observar en este caso que el comportamiento de ambos microorganismo es completamente diferente que en el queso en el que se adicionaron los microorganismos en la leche; la población de *L. lactis* como se observa en la Cuadro 4 se mantiene mientras que *L. innocua* llega a inhibirse al final del experimento.

Este comportamiento es similar al encontrado en estudios hechos con quesos frescos contaminados con *L. monocytogenes* (Dal Bello y col. 2012, Soni y col.

2012), en los que se observa que, al igual que en este trabajo, el uso de bacterias productoras de bacteriocinas hacen posible la reducción de microorganismos patógenos presentes en este tipo de productos lácteos.

7. CONCLUSIONES

Es posible la microencapsulación de *Lactococcus lactis* UQ2 usando una mezcla de carbohidratos y concentrado de proteína de suero (almidón modificado, maltodextrina y CPS 80) y de esta forma ser incorporado en una matriz alimentaria, como lo es el queso tipo panela.

La producción de nisina por parte de la bacteria microencapsulada permitió proteger al producto contra microorganismos patógenos como los es la *Listeria monocytogenes*.

La incorporación del cultivo protector, *L. lactis*, de forma microencapsulada no afectó las propiedades organolépticas del queso tipo panela que se elaboró.

El cultivo protector logró inhibir la población de *L. monocytogenes* en 5 log, por lo cual es posible su uso en la prevención de la contaminación debida a esta bacteria patógena.

El uso de la bioconservación nos permite ofrecer nuevas alternativas para la conservación de alimentos, además de mantener las propiedades sensoriales deseadas por los consumidores.

8. REFERENCIAS

- Al-Holy, M., Al-Nabulsi, A., Osaili, T. M., Ayyash, M. M., Shaker, R. R. 2012.** Inactivation of *Listeria innocua* in brined white cheese by a combination of nisin and heat. *Food Control*. Vol. 23: 48-53.
- 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*. Vol. 143: 61-66.
- Anal, A. K., Singh, H. 2007.** Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial application and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*. Vol. 18: 240-251.
- Aslim, B., Yuksekdog, Z.N., Sharikaya, E., Beyatli, Y. 2005.** Determination of bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *LWT-Food Science and Technology*. Vol. 38: 691-694.
- Benech, R.-O., Kheardr, E., Lacroix, C. Fliss, I. 2002.** Antibacterial activities of nisin Z encapsulated in liposomes or produced *in situ* by mixed culture during cheddar ripening. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68: 5607-5619.
- Both, E., Gyenge, L., Bodor, Z., György, E., Lányi, S., Ábrahám, B. 2012.** Intensification of organism viability by microencapsulation using ultrasonic atomizer. *U. P. B. Science Bulletin, Series B*. Vol. 74: 29-32.
- Boza, Y., Barbin, D., Scamparini, A. R. P. 2004.** Effect of spray-drying on the quality of encapsulated cells of *Beijerincka* sp. *Process Biochemistry*. Vol. 39: 1275-1284.
- BS 4020. 1974.** Methods for the estimation and differentiation of nisin in processed cheese. British Standards Institution.
- Buchrieser, C., Rusniok, C., Kunst, F., Cossart, P., Glaser, P. 2003.** Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. Vol. 35: 207-213.
- Castro Becerra, A. L. 2010.** Efecto de la microencapsulación de *Bifidobacterium breve*, en matrices de almidón fosfatado y proteína de suero mediante secado por

aspersión, sobre su viabilidad en yogurt y en condiciones gastrointestinales simuladas. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Querétaro, México: 29-35.

Dal Bello, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P., Hill, C. **2012.** Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. International Journal of Food Microbiology. Vol. 153: 58-65.

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. Vol. 83: 325-328.

Gálvez, A., Abriouel, H., Lucas, R., Ben, N. **2007.** Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. International Journal of Food Microbiology. Vol. 120: 51-70.

García-Almendárez, B. E., Cann, I. K. O., Martin, S. E., Guerrero-Legarreta, I., Regalado, C. **2008.** Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. Food Control. Vol. 19: 670-680

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 on nisin production by *Lactococcus lactis* UQ2 in skim milk. Food Bioprocess Technology. Vol. 4: 646-654.

González, S.Y., **2009.** Optimización de la producción de nisina por *Lactococcus lactis* UQ2 a nivel biorreactor y su incorporación en materiales de empaque comestibles. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. 1-29.

González-Toledo, S. Y., Domínguez, J., García-Almendárez, B. E., Prado, L. A., Regalado, C., **2010.** Optimization of nisin production by *Lactococcus lactis* UQ2 using supplemented whey as alternative culture medium. Journal of Food Science. Vol. 75: M347-M353.

Hedges, A. J., Shannon, R., Hobbs, R. P. **2008.** Comparison of the precision obtained in counting viable bacteria by the spiral plate method, the droplet and the Miles and Misra methods. Journal of Applied Microbiology. Vol. 45: 57-65.

Heidebach, T., Först, P., Kulozik, U. 2012. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol. 52: 291-311.

Jozala, A. F., de Lencastre, L. C., Cholewa, O., Moraes, D., Vessoni, T. C. 2005. Increase of nisin production by *Lactococcus lactis* in different media. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 4: 262-265.

Kim, S. J., Cho, S. Y., Kim, S. H., Song, O. J., Shin, I. S., Cha, D. S., Park, H. J. 2008. Effect of microencapsulation on viability and other characteristic in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT-Food Science and Technology*. Vol. 41: 493-500.

Langrish, T. A. G., Fletcher, D. F. 2001. Spray drying of good ingredients and applications of CFD in spray drying. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*. Vol. 40: 345-354.

Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. D., Goulet, V., Salminen, C., Hird, D. W., Yonekura, M. L., Hayes, O., Weaver, R. 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 13: 823-828.

Liu, S., Puri, V. M., Demirci, A. 2009. Evaluation of *Listeria innocua* as a suitable indicator for replacing *Listeria monocytogenes* during ripening of Camembert cheese. *International Journal of Food Science and Technology*. Vol. 44: 29-35.

McDonald, P. D., Whitwam, R. E., Boggs, J. D., MacCormack, J. N. Anderson, K. L., Reardon J. W. Saah, J. R. Graver, L. M., Hunter, S. B., Sobel, J. 2005. Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. Vol. 5: 677-682.

Mojgani, N., Ameli, M., Vaseji, N., Hejazi, M. A., Torshizi, M. A. K., Amirina, C. 2010. Growth control of *Listeria monocytogenes* in experimental cheese samples by *Lactobacillus casei* RN 78 and its bacteriocin. *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 4: 1044-1050.

Moll, G., Konings, W. N., Driessen, A. J. 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*. Vol. 76: 185-198.

Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., Coppola, R. 2012. Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 23: 182-186.

NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Secretaría de Salud. México.

NOM-112-SSA1-1994. Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable. Secretaría de Salud. México.

NOM-143-SSA1-1995. Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*. Secretaría de Salud. México.

NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Secretaría de Salud. México.

Pearson, D., Cox, H. The Chemical Analysis of Foods. 7° Edición. Estados Unidos: Editorial Chemical Publishing Co. **1976:** 601.

Piña Suárez, M. D. A., Uribe, C., Regalado, C., Amaya, S., Castaño, E., García, B. 2011. Producción de nisina por *Lactococcus lactis* UQ2 usando suero lácteo suplementado y evaluación de su actividad después del secado por aspersión. *Ciencia@UAQ*. Vol. 4: 47-55.

Piña Suárez, M. D. A. 2012. Producción de compuestos volátiles y evaluación sensorial de queso tipo panela incorporado con *Lactococcus lactis* UQ2 rif L⁺ como cultivo protector. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Querétaro, México: 39-62

Rahimi, E., Ameri, M., Momtaz, H. 2010. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran. *Food Control*. Vol. 21: 1448-1452.

Riaz, Q. U., Masud, T. 2013. Recent trends and applications of encapsulating materials for probiotic stability. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. Vol. 53: 231-244.

Rodriguez Olvera, M. G. 2009 Efecto antimicrobiano de Mirenat-N y su aplicación como recubrimiento en lomo de cerdo. Universidad Autónoma de Querétaro, Tesis para obtener el grado de Químico en Alimentos. Querétaro, México.

SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Boletín de leche, Octubre-Diciembre 2012. Secretaría de Agricultura Ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México

Settanni, L., Moschetti, G. 2010. Non-starter lactic acid bacteria udes to improve cheese quality and provide healt benefits. Food Microbiology. Vol. 27: 691-697.

Sobrino-López, A., Martín-Belloso, O. 2007. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. International Dairy Journal. Vol. 18: 329-343.

Soni, K. A., Desai, M., Oladunjoye, A., Skrobot, F., Nannapaneni, R. 2012. Reduction of *Listeria monocytogenes* in queso fresco cheese by a combination of listericidal and listeristatic GRAS antimicrobials. International Journal of Food Microbiology. Vol. 155: 82-88.

Toomey, N., Monaghan, Á., Fanning, S., Bolton, D. 2009. Assessment of horizontal gene transfer in Lactic acid bacterias– a comparison of mating techniques with a view to optimizing conjugation condition. Journal of Microbiological Methods. Vol. 77: 23-28.

ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración de nisina.

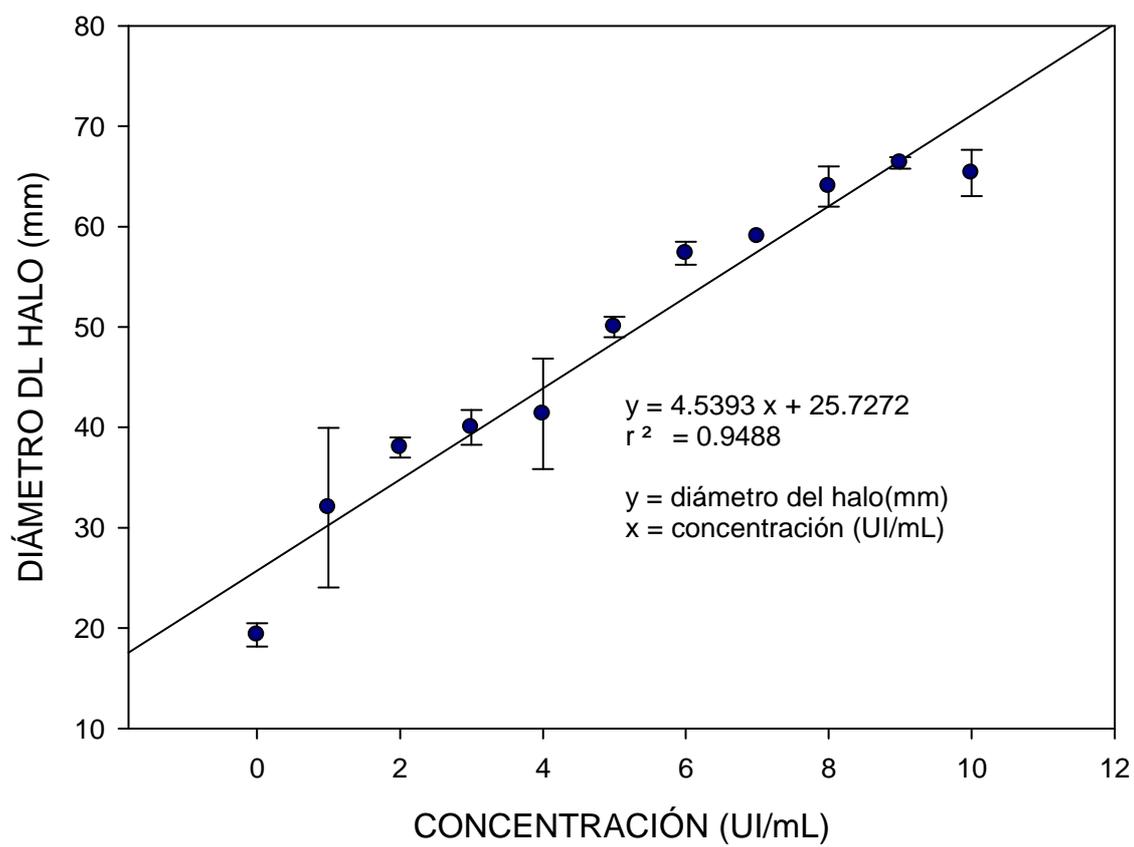


Figura 13. Curva de calibración de nisina.

Anexo 2. Placas para elaborar la curva de calibración de nisina.

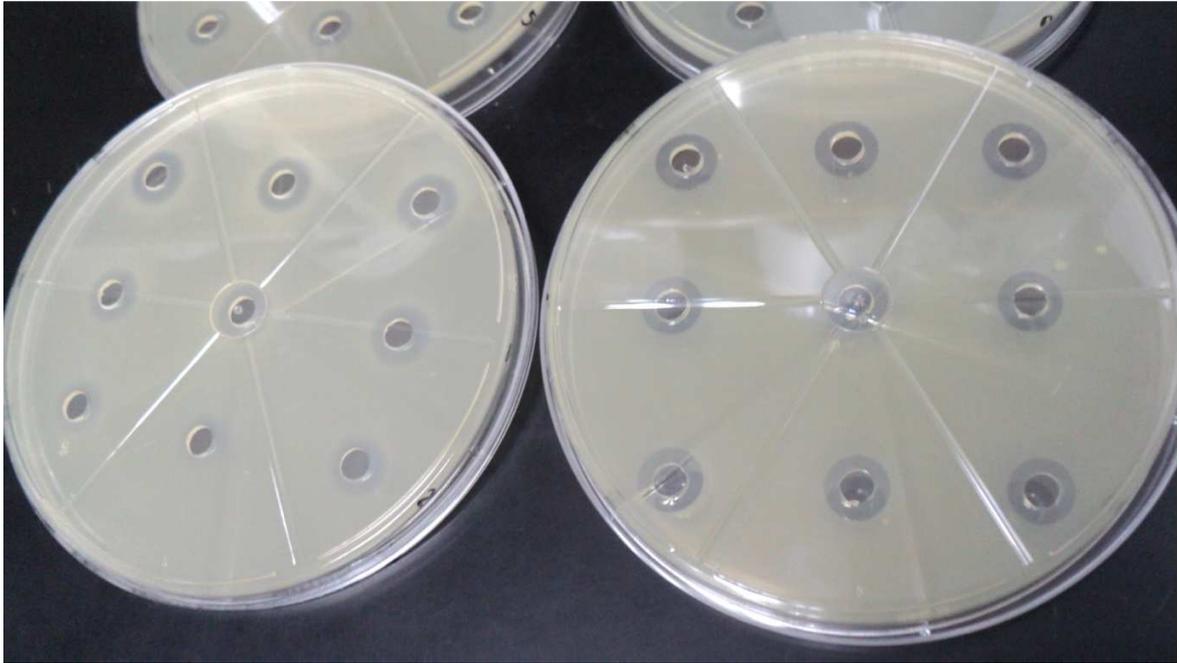


Figura 14. Placas Placas de agar Assay usadas para determinar actividad de nisina (usando *M. luteus* como microorganismo indicador para evaluar la actividad de nisina en la curva de calibración y en las muestras de queso inoculado con *L. lactis*).

Anexo 3. Fichas técnicas de los carbohidratos usados como material de pared.



National Starch
FOOD INNOVATION

División Alimentos
Vasco de Quiroga No 3900 Oficina 602-A
Col. Santa Fe, Deleg. Cuajimalpa.
C.P. 05300, México, D.F.
Tel: (55) 30 67 88 90
Fax: (55) 30 67 88 97
www.foodinnovation.com

**ESPECIFICACIONES
DE PRODUCTO**

CONFIDENCIAL

CAPSUL

<p>Tipo de Producto Fuente</p> <p>Características Físicoquímicas:</p> <p>Color Forma Sabor Granulometría A través de malla #100 A través de malla #200 Humedad pH Solubilidad</p> <p>Especificaciones Microbiológicas:</p> <p>Cuenta total estándar Levaduras Hongos E. coli Salmonella</p>	<p>Almidón De Maíz Modificado Maíz Waxy</p> <p>Blanco Amarillento Polvo Fino Suave</p> <p>>98% >85% 10% Máximo Mínimo 3.0 90 % Mínimo</p> <p>10,000 UFC/g Máximo 200 UFC/g Máximo 200 UFC/g Máximo Negativo Negativo</p>
---	--

Empaque y Almacenamiento:

El almidón modificado CAPSUL se empaqueta en sacos de papel Kraft multicapa, con un peso neto de 25.0 Kg. Se recomienda que el almidón modificado CAPSUL sea almacenado en un área limpia y seca, a temperatura ambiente y alejado de materiales altamente aromáticos. La vida de anaquel del almidón modificado CAPSUL es de 24 meses a partir de la fecha de elaboración.

Nuestro compromiso es
Servirle como nadie más...

La información anterior y las recomendaciones aquí presentadas están basadas en nuestra investigación y creemos que son correctas pero no implican una garantía de responsabilidad. En todos los casos recomendamos que los usuarios del producto hagan ensayos preliminares para determinar a su criterio si el producto es de calidad aceptable y si es adecuado para sus condiciones de aplicación y propósitos particulares antes de utilizar nuestros productos a escala industrial. Para mayor información favor de consultar a nuestro departamento de ventas y servicio técnico, nuestros ingenieros están disponibles para auxiliar a todos nuestros clientes a adaptar nuestros productos a sus necesidades y a las condiciones prevalecientes en su operación.

516330 Rev. 2

Figura 15. Ficha técnica del almidón modificado (capsul).

CP INCREDIEN.TES

Globe Maltodextrina 10 spv/25 kg - Código: 10520009

Mezcla de dextrosa, maltosa, oligo y polisacáridos obtenidos por hidrólisis enzimática parcial del almidón de maíz.

Propiedades Físicoquímicas	Valores	Datos Regulatorios
Apariencia	Polvo fino	CAS # 9050-36-6
Color	Blanco a ligeramente amarillo	México
Olor	Característico	NOM
Materia extraña	Libre de materia extraña	Etiquetado Maltodextrina
Humedad, %	0 a 6	Estados Unidos
pH	4 a 5.5	CFR 184.1444
Dextrosa equivalente, %	9 a 14	GRAS 21-CFR 184.1444
Presencia de almidón	Negativo	Etiquetado Maltodextrin
Cenizas (sulfatadas), %	0 a 0.5	Canadá
Bióxido de azufre, ppm	0 a 10	Standard Food
Transmitancia, %	90 a 100	Etiquetado Maltodextrin
NSR (residuo no soluble)	1A	Características y Beneficios
NSR (residuo no soluble)	1B	Libre de sabor
NSR (residuo no soluble)	1C	Altos niveles de uso sin afectar el sabor original
Sensorial	Estándar	No enmascara los sabores
Metales pesados (como Pb), ppm	< 5	Elimina la necesidad de costosos ensanchadores de sabor
Plomo, ppm	0 a 1	Bajo contenido en sales Extremadamente bajo en sodio
Hierro, ppm	0 a 10	100% Carbohidratos
Arsénico, ppm	0 a 2	Mejora el color del producto y la vida de anaquel.
Propiedades Microbiológicas	Valores	Calidad Consistente Formulación constante Uniformidad en el producto terminado.
Cuenta estándar, UFC/g	0 a 100	Envase y Vida de Anaquel
Hongos, UFC/g	0 a 25	Saco de papel kraft de 25 Kg. Por ser un producto seco, mantiene sus características por 3 años siempre y cuando se almacene en su envase original cerrado, en un lugar fresco, seco, libre de humedad, polvo, insectos, roedores y olores extraños.
Levaduras, UFC/g	0 a 25	
Escherichia coli	Negativo	
Salmonella	Negativo	
Coliformes, NMP/g	< 3	
Datos Nutricionales /100g	Valores	
Calorías, Kcal	395	
Sólidos, g	98.5	
Carbohidratos Totales, g	98.5	
Azúcares Reductores, g	13.0	

No se encuentran presentes o se encuentran en cantidades no relevantes: grasas, proteína, fibra, vitaminas o minerales incluyendo sodio y colesterol.

Certificación

Kosher pareve.

E00Q019100

Fecha de Edición 06/04/2009

Revisión 13

Autorizó y Revisó Dirección de Desarrollo de Negocio y Servicio Técnico
Servicio Técnico Disponible



Av. Mariano Otero 1249 Piso 9
Torre Atlántico
Col. Rincón de las Flores
Guadalajara, México. CP 44530
Tel: 52 (33) 3884-9000 o 9100
www.cpincredi.com

Toda la información aquí contenida, es sólo una guía de las características técnicas y de los posibles usos del producto; no implica garantía alguna del resultado particular deseado y no exime al usuario de evaluar las restricciones en la aplicación del mismo, contenidas en las legislaciones vigentes. CPIngreDientes S.A. de C.V. se reserva el derecho de modificar la información contenida en esta especificación técnica. Este producto debe ser manejado en conformidad con los procedimientos de seguridad aplicables en la industria.

Figura 16. Ficha técnica de maltodextrina.

Anexo 4. Uso del secador por aspersión BÜCHI Mini Spray-Dryer B-191.

PROCESO DE SECADO POR ASPERSIÓN

- Conectar el equipo con el conmutador principal y abra el grifo del aire comprimido. El equipo procederá a realizar un control automático y al finalizar cambiará automáticamente a modo de inicio.
- Ajustar la corriente de paso del aire con el botón regulador aproximadamente a 600 L/h.
- Preseleccionar la temperatura de entrada con los comandos de calefacción.
- Conectar el aspirador y seleccionar la potencia con los comandos. El valor de la potencia es un valor relativo debido a que varía de producto a producto, es por ello que no puede determinarse.
- Conectar la calefacción y dejar calentar el sistema. El sistema regulará la temperatura de entrada por sí sólo. El diodo luminoso del botón de calefacción se apagará cuando la temperatura se ha estabilizado. El diodo luminoso no es ningún marcador de los intervalos de calefacción.
- A continuación, se rociará lentamente agua destilada a través de la bomba peristáltica. El chorro de agua debe encontrarse en el centro del cilindro. De no ser así, la tobera podría estar defectuosa o tener impurezas.
- Con los botones reguladores de la bomba peristáltica puede modificarse la cantidad de agua destilada a rociar. La cantidad de pulverización influye en la temperatura de salida ya que el agua, al convertirse en vapor, toma más energía del aire. Así, se puede seleccionar la temperatura de salida en relación a la cantidad de agua a rociar, así como la velocidad de la bomba peristáltica. Tenga en cuenta que el producto no puede estropearse debido a las altas temperaturas.
- Una vez que se hayan conseguido las condiciones de trabajo deseadas, el agua destilada será sustituida por el producto preparado. Debido a la concentración del agua del producto, la cantidad de agua a pulverizar será menor, lo que obligará a modificar de nuevo la temperatura de salida (el rendimiento de la bomba puede aumentarse ligeramente).

- El proceso de pulverización debe ser vigilado constantemente, cuidando la temperatura así como que no se taponee la bomba.

FIN DEL PROCESO DE SECADO POR ASPERSIÓN

- Al final de cada proceso de pulverización deberá rociar, durante un corto intervalo de tiempo un poco de agua destilada, a fin de liberar los tubos y toberas de posibles acumulaciones del producto.
- Vaciar los tubos, desconecte la bomba peristáltica y baje la superficie de rodadura.
- Desconectar el limpiador de la tobera.
- Desconectar la calefacción.
- El sistema se enfriará por sí solo hasta alcanzar la temperatura ambiental.
- Cuando el equipo alcance una temperatura de 70 °C podrá desconectarse el aspirador.
- Se retirara el recipiente con el producto.
- Lavar las piezas de vidrio, las toberas y los tubos con agua.

Anexo 4. Equipo de secado por aspersion y diagrama de comandos del mismo.



Figura 17. Secador por aspersion Büchi mini spray dryer B-191.

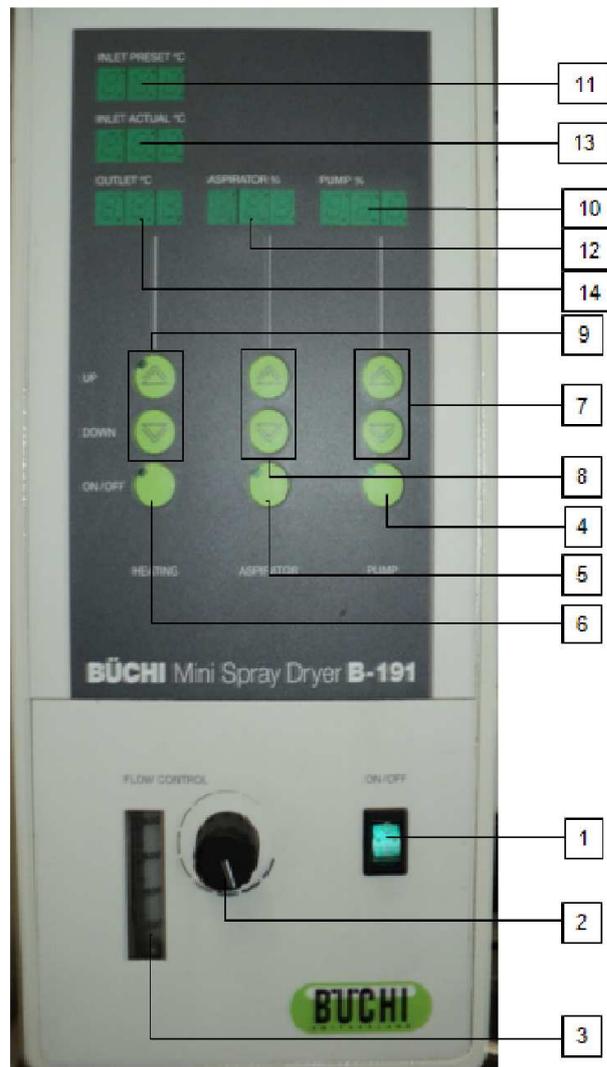


Figura 18. Elementos de control y señalización del secador Büchi mini spray dryer B-191. (1. Conmutador principal, 2. Conmutador de giro para la regulación de al corriente de aire, 3. Vidriera traslúcida para la cantidad de aire, 4. Conmutador principal de la bomba, 5. Conmutador principal del aspirador, 6. Conmutador principal de la calefacción, 7. Botón de regulación de la bomba, 8. Botón de regulación de aspiración, 9. Botón de regulación de calefacción, 10. Piloto LED del rendimiento de la bomba, 11. Piloto LED del valor recomendado de la temperatura de entrada del aire. , 12. Piloto LED del rendimiento de aspiración, 13. Piloto LED del valor real de la temperatura de entrada del aire, 14. Piloto LED del valor real de la temperatura de salida del aire.