

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

“Uso combinado de altas presiones hidrostáticas y bioconservación  
para garantizar la inocuidad y calidad de queso panela”

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

PRESENTA

LTA. Karen Ireyda Velázquez Lugo

DIRIGIDA POR

Dra. Blanca E. García Almendárez

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2014



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

**Uso combinado de altas presiones hidrostáticas y bioconservación para garantizar la inocuidad y calidad de queso panela.**

**TESIS**

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

**Presenta:**

LTA Karen Ireyda Velázquez Lugo

**Dirigido por:**

Dra. Blanca E. García Almendárez

**SINODALES**

Dra. Blanca E. García Almendárez  
Presidente


Dr. Jorge Welti Chanes  
Co-Director

Dr. Carlos Regalado González  
Secretario

Dra. Silvia Amaya LLano  
Suplente

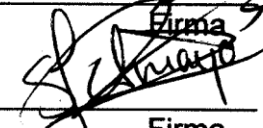
Dr. Pedro A. Vázquez Landaverde  
Suplente


  
MSP. Sergio Pacheco Hernández  
Director de la Facultad de Química

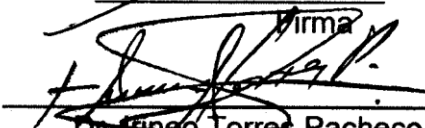
  
\_\_\_\_\_  
Firma

  
\_\_\_\_\_  
Firma

  
\_\_\_\_\_  
Firma

  
\_\_\_\_\_  
Firma

  
\_\_\_\_\_  
Firma

  
Dr. Inés Torres Pacheco  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro. Enero 2014  
México

## RESUMEN

El queso panela, por su alto contenido de humedad es susceptible a contaminación por microorganismos patógenos y deterioradores. *Listeria monocytogenes* es el microorganismo con la más alta tasa de mortalidad que puede estar presente en este tipo de alimentos. Una de las tecnologías emergentes prometedoras para el procesamiento no térmico de alimentos son las Altas Presiones Hidrostáticas (APH), esta tecnología que puede ser utilizada como alternativa a la pasteurización, normalmente no modifica las características sensoriales, nutricionales y microbiológicas. La nisina es una bacteriocina sintetizada por cepas de *Lactococcus lactis*. Una adecuada adaptación de los cultivos microbianos a los alimentos puede ser promovida por microencapsulación de dichos cultivos facilitando la incorporación de los microorganismos a la matriz del alimento. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto combinado de APH y bioconservación para asegurar la inocuidad en queso panela. Se microencapsuló *L. lactis* mediante secado por aspersion evaluando el efecto de 4 niveles de temperatura, empleando almidón modificado y proteína de suero lácteo como materiales de pared. Se llevó a cabo un estudio de estabilidad del microorganismo microencapsulado por 80 días almacenado a 4°C. El producto microencapsulado se observó en un microscopio electrónico de barrido, y en su mayoría presentaron forma esféricas y con tamaño promedio de 6-8µm. La viabilidad fue de 9 log UFC/g con rendimiento del 70%. Cinéticas de inactivación de *Listeria innocua* se llevaron a cabo utilizando APH en rangos de presión y tiempo de 350-600 MPa durante 1-20 minutos a 20°C. Este proceso se realizó solo y en combinación con *L. lactis* como cultivo protector. Leche cruda fue inoculada con 7 log de *L. innocua* como subrogado de *L. monocytogenes* y 6 log de *L. lactis* para producción *in situ* de nisina. Cuando la leche cruda fue tratada solo por APH, se requirieron de 12 minutos para inactivar 7 log de *L. innocua* y por efecto combinado el tiempo disminuyó a 9 min a 600 MPa. El rendimiento del queso obtenido con leche tratada por APH se incrementó dos veces en comparación con queso elaborado bajo tecnología tradicional. La producción de nisina *in situ* en combinación con APH podría ser una tecnología prometedora para asegurar la inocuidad de productos lácteos y sus derivados.

**Palabras clave:** Altas presiones hidrostáticas, bioconservación, efecto combinado.

## SUMMARY

Panela cheese is a high moisture food susceptible to contamination by pathogenic and spoilage microorganisms, *Listeria monocytogenes* is the microorganism with the highest mortality (CFR 19.3). One emerging technology for non-thermal food preservation is high hydrostatic pressure (HHP). This technology could be used as an alternative to pasteurization, because the sensory, nutritional and microbiological characteristics are conserved. Biopreservation is the addition of bacteria or their metabolites. Nisin is a bacteriocin synthesized by certain strains of *Lactococcus lactis*. Strains adaption in foods may be promoted by microencapsulation making an easy microbial incorporation in the cheese matrix. The aim of this research was to evaluate the combined effect of HHP and biopreservation to ensure the safety and quality of Panela cheese. *L. lactis* was microencapsulated by spray drying using one way design whit 4 levels of temperature, using modified starches and whey protein concentrate as encapsulating agents. A stability study of microencapsulated cells was carried out for 80 days storage at 4°C. Microcapsules were visualized using low vacuum scanning electron microscopy. Microcapsules were mostly spherical and showed an average size of 6-8 µm. A viability of 9 log CFU/g dry powder was achieved with 70% yield of viable count. Inactivation kinetics was conducted using HHP in the range 350-600MPa for 1-20 minutes at 20°C. This process was carried out alone or in combination with *L. lactis* UQ2as a protective culture. Raw milk was inoculated with 7 log of *L. innocua* as a surrogate of *L. monocytogenes* and 6 log of *L. lactis* UQ2for *in situ* nisin production. When milk was treated by HPP only, it took 12 min to inactivate 7 log *L. innocua*, whereas in combination with the protective culture the time could be decreased from 12 to 9 min at 600MPa to achieve the same result. Cheese yield gave two times of the control whit traditional processing. *In situ* production of nisin combined with HHP is a promising technology to ensure safety of milk and dairy products.

**(Key Words:** High Hydrostatic Pressure, Biopreservation, Combine effect).

A **Dios** por prestarme esta vida, por todas las bendiciones que me ha colmado y sobre todo darme la fortaleza para enfrentar este reto profesional.

A mi madre **Blanca Delma Velázquez Lugo** quien es la mujer más valiosa de mi vida, gracias por darme la bendición de ser su hija, por apoyarme siempre para intentar lograr todos los sueños, metas y aventuras que la vida me ha presentado, y por hacer de mi una mujer fuerte, luchadora e independiente.

A mis abuelos **Francisco Velázquez y Petrita Lugo** por apoyarme y quererme como una hija más, quienes son mi motivo de lucha para salir adelante, porque este triunfo es por ustedes y para ustedes.

A mis **tíos** por apoyarme siempre que los he necesitado, en especial a mi **tía Betty** quien ha sido mi sensei en esta gran lucha de vida. Gracias a la **Familia Robledo Velázquez** por hacerme sentir parte de su hogar.

A mis primos de sangre pero hermanos de corazón, en especial a **Alexia, Elizabeth y Ramses** a quienes quiero más de lo que puedo demostrarlo. Gracias por presumirme y verme como su ejemplo a seguir, realmente espero poder serlo.

A mis **sobrinos** a quienes adoro con todo mí ser, que a pesar de no estar a su lado para verlos crecer, roban mi corazón al decirme tía.

A mis **amigos de generación** quienes fueron mi primera familia en Querétaro y con quienes pasé momentos increíbles cuando juntos superábamos retos que ni siquiera nosotros mismos sabíamos que éramos capaces de lograrlo. En especial a mi mejor amiga Mayra Herrera quien en muy poco tiempo se convirtió en una persona con un lugar muy especial en mi corazón.

A mis amigos del laboratorio de Biotecnología, **Martita, Terecita, Florecita, Alejandra, Eli, Rodrigo, Víctor, Luís, Honorio** y en especial a mi amiga y compañera de oficina **Iraís** ustedes mis eternos confidentes, quienes me vieron reír y llorar a lo largo de este gran reto, gracias por ser mi eterno apoyo en mis múltiples conflictos técnicos y emocionales, ustedes mejor que nadie saben lo que significa esto para mí, de verdad gracias.

Al amor de mi vida, para quien mis palabras no son suficientes para expresar el inmenso agradecimiento que siento por todo el apoyo que me ha brindado. Gracias por crecer conmigo, por creer en mí, por motivarme, por siempre tomarme de la mano para guiar mi camino y sobre todo por nunca dejarme caer, por siempre tener para mí una palabra de aliento cuando creía que todo estaba perdido. De verdad agradezco infinitamente que hayas llegado a mi vida para quedarte. Gracias **Pedro Humberto Martínez Rojo** esto es un logro más en nuestras vidas.

A todos ustedes **MUCHAS GRACIAS.**

## *AGRADECIMIENTOS*

A la **Universidad Autónoma de Querétaro y al Postgrado de la Facultad de Química**, por su compromiso con la Ciencia al formar profesionistas de éxito y alto valor competitivo.

A **mis maestros** porque a ustedes les debo mucho de lo que he aprendido en el ámbito académico. Gracias por su tiempo, paciencia y su verdadera vocación de servicio y ética profesional.

A la **Dra. Blanca García y Dr. Carlos Regalado** por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

A la **M. en C. Iraís Sánchez** por todo el apoyo técnico y todas las aportaciones científicas otorgadas a lo largo de la realización de este proyecto.

Al **Dr. Jorge Welti Chanes** de la escuela de Biotecnología y Alimentos del ITESM campus Monterrey por confiar en mí y permitirme despertar la crítica y la curiosidad científica en la implementación e interpretación de cada resultado obtenido, gracias por estar disponible a toda hora para brindarme todo el apoyo científico y técnico necesario para poder ampliar y hacer crecer el proyecto.

A la **Dra. Silvia Amaya** y al **Dr. Pedro Vázquez** por formar parte de mi comité evaluador así como también por todo el apoyo brindado a lo largo de este proceso.

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

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

# ÍNDICE

RESUMEN.....	i
SUMMARY .....	ii
ÍNDICE .....	v
ÍNDICE DE CUADROS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos.....	4
2.1.1 <i>Listeria monocytogenes</i> en productos lácteos.....	4
2.1.2 Queso tipo panela .....	6
2.2 Tratamientos de conservación en leche. ....	7
2.3 Tecnologías emergentes de conservación. ....	8
2.3.1 Altas presiones hidrostáticas (APH).....	9
2.3.2 Procesamiento de alimentos por APH .....	9
2.3.3 Efecto de las APH en los componentes del alimento .....	10
2.3.4 Efecto de APH en leche y productos lácteos .....	13
2.3.5 Efecto de las APH en los microorganismos .....	14
2.4 Bioconservación .....	15
2.4.1 Bacteriocinas .....	16
2.4.2 <i>Lactococcus lactis</i> .....	16
2.4.3 Nisina.....	17
2.4.4 Mecanismo de acción.....	18
2.5 Microencapsulación.....	19
2.5.1 Secado por aspersión .....	23
2.5.2 Operaciones del secado por aspersión.....	24
2.6 Efecto combinado de altas presiones hidrostáticas y biocconservación.....	24
III. JUSTIFICACIÓN .....	27
IV. OBJETIVOS .....	28
4.1 Objetivo general .....	28
4.2 Objetivos específicos .....	28
V. HIPOTESIS .....	29
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	30

6.1 MATERIALES.....	30
6.1.1 Cepas microbianas.....	30
6.1.2 Enzima coagulante.....	31
6.1.3 Antimicrobianos.....	31
6.1.4 Materiales de pared.....	31
6.1.5 Soluciones.....	31
6.1.6 Medios de cultivo.....	32
6.1.6.1 Agar lactosa purpura de bromocresol (PBC).....	32
6.1.6.2 Agar Assay.....	32
6.1.6.3 Medio LM17.....	32
6.1.6.4 Agar Oxford.....	32
6.1.6.5 Medio LEB.....	32
6.1.6.6 Agar LMP.....	33
6.1.6.7. Medio ASTEL.....	33
6.2 MÉTODOS.....	33
6.2.1 Tratamiento de leche entera por APH.....	33
6.2.2 Elaboración de queso tipo panela con leche presurizada.....	34
6.2.3 Activación de <i>L. Lactis</i> UQ2 rif L+ para microencapsulación y posterior incorporación como inóculo en queso panela.....	35
6.2.4 Microencapsulación de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L+ para su adición en la elaboración de queso tipo panela.....	36
6.2.4.1 Recuperación del cultivo.....	36
6.2.4.2 Preparación del agente encapsulante.....	36
6.2.4.3 Secado por aspersión.....	37
6.2.5 Curva de desarrollo de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L+ microencapsulado.....	38
6.2.6 Estudio de estabilidad de <i>L. lactis</i> microencapsulado.....	38
6.2.7 Morfología de las microcápsulas de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L+.....	38
6.2.8 Determinación de la actividad de nisina.....	39
6.2.8.1 Activación de <i>Micrococcus luteus</i> .....	39
6.2.8.2 Curva estándar de nisina.....	39
6.2.8.3 Tratamiento de las muestras de leche y queso.....	40
6.2.8.4 Método de difusión en agar.....	41
6.2.9 Determinación de la población de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L+.....	41
6.2.10 Determinación de la presencia-ausencia de <i>Listeria</i> .....	43
6.2.11 Caracterización fisicoquímica.....	43



6.2.11.1	Determinación de acidez en leche .....	43
6.2.11.2	Determinación de grasa en leche .....	44
6.2.11.3	Determinación de acidez en muestras de queso.....	44
6.2.12	Activación de <i>Listeria innocua</i> .....	44
6.2.13	Efecto del cultivo protector sobre el desarrollo de <i>L. innocua</i> en queso tipo panela.....	45
6.2.14	Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre <i>L. innocua</i> en leche UHT.....	46
6.2.15	Efecto del cultivo protector sobre <i>L. innocua</i> inoculados en leche .....	48
6.2.16	Reto microbiano de <i>Listeria innocua</i> en queso con cultivo protector .....	48
6.2.17	Efecto de la incorporación del cultivo protector libre en leche y microencapsulado en la elaboración de queso tipo Panela.....	49
6.2.18	Reto del CP con <i>L. innocua</i> en queso panela inoculado en pasta. ....	50
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
7.1	Microencapsulación.....	51
7.1.1	Cinética de crecimiento de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L+ .....	51
7.1.2	Microencapsulación de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L+.....	52
7.1.3	Actividad de agua ( $a_w$ ) en microcápsulas obtenidas por secado por aspersión. ....	56
7.1.4	Curva de desarrollo de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L+ microencapsulado.....	57
7.1.5	Estabilidad de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L+ microencapsulado.....	58
7.1.6	Microscopía electrónica de barrido de las microcápsulas de <i>L. lactis</i> .....	60
7.2	Altas presiones hidrostáticas.....	62
7.2.1	Cinética de inactivación de <i>L. innocua</i> .....	62
7.3	Bioconservación .....	66
7.3.1	Efecto <i>L. lactis</i> UQ2 rif L+ sobre el crecimiento de <i>L. innocua</i> en diferentes niveles de inoculo inicial de <i>L. innocua</i> .....	66
7.3.2	Efecto de la incorporación de CP libre en leche y microencapsulado en la elaboración de queso tipo panela en leche pasteurizada.....	69
7.3.3	Efecto del CP sobre <i>Listeria innocua</i> inoculada en pasta durante el almacenamiento del queso panela. ....	72
7.4	Efecto combinado de APH y bioconservación .....	75
7.4.1	Caracterización de la materia prima. ....	75
7.4.2	Efecto combinado de APH y bioconservación en leche UHT sobre el desarrollo de <i>L. innocua</i> .....	76
7.4.3	Determinación del tiempo de adaptación de <i>L. lactis</i> previo al tratamiento APH .....	81
7.4.4	Efecto combinado APH y bioconservación en leche cruda entera de vaca a 600 MPa ..	82
7.4.5	Efecto combinado de APH y bioconservación en la inactivación de <i>L. innocua</i> .....	84
7.4.6	Determinación del rendimiento en queso con leche sometida al tratamiento de APH ....	85

7.5 Efecto combinado de APH y bioconservación bajo condiciones de tratamiento sub-letales en la viabilidad de <i>Listeria</i> .....	87
7.5.1 Efecto combinado bajo tratamiento de APH a 450 MPa por 10 min a temperatura ambiente.....	87
7.5.2 Efecto combinado bajo tratamiento de APH a 550 MPa por 10 min a temperatura ambiente.....	91
VII. CONCLUSIONES.....	97
VIII. LITERATURA CITADA.....	98

## ÍNDICE DE CUADROS

1. Efecto de las APH sobre la reducción de la población de microorganismos patógenos en alimentos. ....	15
2. Condiciones de presión y tiempo para el tratamiento de leche con APH a temperatura ambiente en la inactivación de <i>L. innocua</i> . ....	46
3. Condiciones de presión y tiempo de prueba para el tratamiento de leche por APH a temperatura ambiente en la inactivación de <i>L. innocua</i> . ....	47
4. Efecto de las condiciones de secado por aspersión y materiales de pared utilizados en la microencapsulación de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L+.....	52
5. Efecto de las condiciones de secado sobre la población y rendimiento de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L+.....	55
6. Resultados de la aw de microcápsulas con y sin <i>L. lactis</i> UQ2 rif L+ en un periodo de 30 días de almacenamiento. ....	57
7. Evolución de la concentración de actividad de nisina en leche. ....	68
8. Población de <i>Listeria</i> y <i>L. lactis</i> previo a la elaboración del queso.....	69
9. Determinación de la actividad de nisina en los quesos inoculados con 7 log UFC/g del cultivo protector. ....	71
10. Poblaciones alcanzadas por los inóculos utilizados en caldo, leche y microcápsulas. ....	72
11. Actividad de nisina en los quesos inoculados con 7 log UFC/g del cultivo protector almacenados a 4°C. ....	75
12. Caracterización fisicoquímica de leche cruda de vaca y pasteurizada comercial. ....	75
13. Caracterización microbiológica de leche cruda de vaca y pasteurizada comercial.....	76
14. Evaluación del tiempo de contacto de <i>L. lactis</i> en leche previo al tratamiento de altas presiones hidrostáticas. ....	82
15. Diferentes técnicas de evaluación microbiológica sobre el efecto combinado de APH y bioconservación en la población de <i>L. innocua</i> . ....	83
16. Determinación de Presencia-Ausencia de <i>L. innocua</i> en leche cruda entera de vaca por la técnica de la NOM-143-SSA1-1995.....	84
17. Rendimiento en la elaboración de queso con leche tratada por altas presiones hidrostáticas. ....	86
18. Efecto del cultivo protector sobre <i>L. innocua</i> previo al tratamiento de APH a 450 MPa por 10 min a temperatura ambiente. ....	88
19. Determinación de la actividad de nisina en queso almacenado a 4 °C .....	90
20. Efecto del cultivo protector sobre <i>L. innocua</i> previo al tratamiento de APH a 550 MPa por 10 min a temperatura ambiente. ....	92
21. Determinación de la actividad de nisina en queso almacenado a 4 °C .....	96

## ÍNDICE DE FIGURAS

1 Estructura de la nisina (Chatterjee <i>et al.</i> , 2005). .....	18
2. Mecanismo de acción de la nisina (Lubelski <i>et al.</i> , 2007). .....	19
3. Esquema de equipo de secado por aspersión y sus componentes.....	24
4. Diagrama del procedimiento de elaboración de queso tipo panela. ....	35
5. Procedimiento de activación de la cepa de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L+.....	36
6. Técnica viabilidad de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L+ por la técnica de Miles-Misra. ....	42
7. Procedimiento de elaboración de microdiluciones y técnica Miles-Misra. ....	42
8. Diagrama de activación del patógeno subrogado <i>L. innocua</i> .....	45
9. Tratamientos utilizados en la cinética de contacto de <i>L. lactis</i> contra <i>Listeria innocua</i> .....	45
10. Tratamientos utilizados en la cinética del efecto de <i>L. lactis</i> contra <i>Listeria innocua</i> .....	48
11. Curva de desarrollo de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L+ durante la cuarta activación en leche pasteurizada suplementada.....	51
12. Curva de desarrollo del cultivo de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L+ microencapsulado.....	58
13. Viabilidad de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L+ microencapsulado en un periodo de 30 días de almacenamiento a 4°C. ....	59
14. Micrografías de las microcápsulas de <i>L. lactis</i> UQ2 rif L+ obtenidas mediante secado por aspersión. ....	61
15. Efecto del tratamiento de APH de leche sobre la inactivación de <i>L. innocua</i> a 350 MPa y 550 MPa.....	63
16. Efecto del tratamiento de APH de leche UHT sobre la inactivación de <i>L. innocua</i> a 350, 450 y 550 MPa.....	65
17. Efecto del cultivo protector sobre la población de <i>L. innocua</i> inoculada en leche a una concentración inicial de 4 log UFC/ml. ....	67
18. Efecto del cultivo protector sobre la población de <i>L. innocua</i> inoculada en leche a una concentración inicial de 6 log UFC/ml .....	68
19. Efecto del cultivo protector en forma libre sobre la población de <i>L. innocua</i> inoculada en leche. ....	70
20. Efecto del cultivo protector microencapsulado sobre la población de <i>L. innocua</i> inoculada en leche. ....	71
21. Efecto del cultivo protector inoculado en forma libre sobre la población de <i>L. innocua</i> inoculada en pasta.....	73
22. Efecto del cultivo protector microencapsulado sobre la población de <i>L. innocua</i> inoculada en pasta. ....	74
23. Efecto del tratamiento de APH a 350 MPa y su efecto combinado con bioconservación sobre la población de <i>L. innocua</i> .....	78

24. Efecto del tratamiento de APH a 550 MPa y su efecto combinado con bioconservación sobre la población de <i>L. innocua</i> .....	79
25. Efecto del tratamiento de APH y su efecto combinado con bioconservación sobre la población de <i>L. innocua</i> .....	80
26. Efecto del tratamiento de APH a 550 MPa y su efecto combinado con bioconservación sobre la población de <i>L. innocua</i> .....	81
27. Determinación de presencia-ausencia de <i>L. innocua</i> inoculada en leche por NOM-143-SSA1-1995. ....	85
28. Efecto del tratamiento de APH a 450 MPa y su efecto combinado con bioconservación mediante la adición del inóculo de <i>L. lactis</i> en forma libre sobre la población de <i>L. innocua</i> en queso almacenado por 20 días a 4 °C .....	89
29. Efecto del tratamiento de APH a 450 MPa y su efecto combinado con bioconservación mediante la adición del inóculo de <i>L. lactis</i> microencapsulado sobre la población de <i>L. innocua</i> en queso almacenado por 20 días a 4 °C.....	90
30. Efecto del tratamiento de APH a 550 MPa y su efecto combinado mediante la adición de <i>L. lactis</i> en la población de <i>L. innocua</i> en queso almacenado por 20 días a 4 °C .....	94
31. Efecto del tratamiento de APH a 550 MPa y su efecto combinado con bioconservación mediante la adición del inóculo de <i>L. lactis</i> microencapsulado sobre la población de <i>L. innocua</i> en queso almacenado por 20 días a 4 °C.....	95

## I. INTRODUCCIÓN

Reportes recientes muestran que *Listeria monocytogenes* es el microorganismo con mayor índice de mortalidad, debido a su amplia ubicuidad, ha sido asociado a diversos alimentos, incluyendo quesos frescos. La Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (SAGARPA) reporta que en México éstos quesos son los de mayor consumo, siendo el panela el de mayor popularidad entre los consumidores, debido a sus características de sabor, aroma y textura. La pasteurización es un tratamiento eficiente para el aseguramiento de la inocuidad de alimentos, pero al ser un tratamiento térmico, los cambios sensoriales se hacen evidentes. Sin embargo el creciente interés del consumidor por ingerir alimentos además de aceptables sensorialmente, seguros y libres de aditivos químicos día con día es aún mayor.

En respuesta a esta demanda, la Ciencia y Tecnología de Alimentos ha desarrollado nuevas tecnologías no térmicas para la conservación de alimentos, que además de asegurar la inocuidad del mismo, conserven al máximo sus características sensoriales y nutritivas. Los tratamientos con altas presiones hidrostáticas (APH) muestran ser una tecnología prometedora en este ámbito, ya que además de asegurar la calidad microbiana del alimento, tiene la capacidad de conservar el resto de los atributos buscados en un alimento natural.

En las últimas décadas se ha producido un incremento en el desarrollo de nuevas tecnologías para la conservación y obtención de alimentos, como consecuencia del creciente interés de la industria alimentaria por la innovación tecnológica. Por otra parte, el aumento en la demanda, por parte de los consumidores, de productos de calidad, con características organolépticas y nutritivas similares a los productos frescos o naturales, con el mínimo riesgo sanitario, ha contribuido en gran medida el desarrollo de estas nuevas tecnologías.

Aunado a esto, se plantea otro mecanismo de conservación que no implique el uso de aditivos químicos, siendo una buena alternativa la bioconservación, ya que el uso de bacterias o sus metabolitos, son agentes naturales de conservación que pueden proteger al alimento durante todo su periodo de almacenamiento. *Lactococcus lactis*, una bacteria ácido láctica productora de nisina, un metabolito secundario con capacidad bactericida, la nisina es una bacteriocina con estatus GRAS que es sintetizada por algunas cepas de *Lactococcus*, en este caso, *L. lactis* UQ2 rif L+ es una cepa aislada en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Esta cepa muestra un buen crecimiento en leche, y además de tener la capacidad de sintetizar la bacteriocina genéticamente identificada como nisina A.

Sin embargo, las condiciones adversas presentes en una matriz tan compleja como lo es un alimento, no permite que las bacterias sobrevivan por periodos largos de tiempo, por ello, la microencapsulación de la bacteria *L. lactis* UQ2 rif L+ es una buena alternativa para la conservación de la viabilidad del microorganismo. Con la microencapsulación se pretende que *L. lactis* UQ2 rif L+ se desarrolle adecuadamente, para así provocar el menor estrés posible en el microorganismo por efecto de las características del alimento.

La búsqueda de alternativas a los tratamientos térmicos, ha sido motivada por el conocimiento de las pérdidas de valor nutritivo y cambios en las características organolépticas que sufren los alimentos cuando se someten a este tipo de tratamientos. Esto ha forzado el estudio y desarrollo de nuevas tecnologías con el objetivo de asegurar la calidad microbiológica, así como también el valor nutritivo y las características sensoriales de los alimentos.

Así, mediante la aplicación de la tecnología de obstáculos o combinación de factores, empleando por ejemplo, las altas presiones hidrostáticas aplicadas para “pasteurizar” a bajas temperaturas la leche en combinación con el uso de cultivos protectores, puede ser una alternativa para asegurar la calidad e inocuidad de los quesos tipo panela. En el producto final se evaluará la habilidad de la cepa de interés para sintetizar la nisina en este medio complejo a través del tiempo.



## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's) son un problema que debe ser considerado en un ámbito de carácter social, tecnológico, económico y político. Las ETA's son un problema real y creciente tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. Si bien en cierto que la preocupación por parte de las industrias por controlar sus productos y procesos en materia de inocuidad día con día es mayor, también es real que los alimentos son un vector fundamental para el surgimiento de las más de 250 enfermedades que pueden ser adquiridas por los alimentos.

La FDA (2011), reporta como enfermedades más comunes transmitidas por leche cruda a la listeriosis, fiebre tifoidea, tuberculosis, difteria y brucelosis. En 2011 el sistema FoodNet en USA (CDC, 2011) reportó un total de 18,964 Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's), con 4,398 hospitalizaciones de las cuales 82 resultaron en casos de muerte. La infección por *Salmonella* presentó la mayor incidencia con 7,813 casos (29 muertes). Sin embargo, *Listeria* con 145 casos (28 muertes) mostró la tasa de mortalidad más alta (CFR, por sus siglas en inglés, Case Fatality Ratio) con valor de 19.31 la cuál es 52 veces mayor que la de *Salmonella* (CFR 0.37) y 6 veces mayor que para *Vibrio* (CFR 3.2). Además es importante mencionar que la población más susceptible a listeriosis son las mujeres embarazadas, los niños entre 1 y 4 años y los adultos mayores de 70 años, con una tasa de letalidad de 32.2%.

#### 2.1.1 *Listeria monocytogenes* en productos lácteos.

La listeriosis en humanos y animales fue reconocida por primera vez como una infección causada por una bacteria en la década de 1920, posteriormente llamada *Listeria monocytogenes*, Esta es una de las 6 especies en el género y es el único que se considera un patógeno importante. El primer vínculo concluyente

de que el organismo causa enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) fue por un brote en 1981 que estimuló el trabajo de investigación y estudio para determinar la ubicuidad del organismo y su método de transmisión (Todd *et al.*, 2011).

*Listeria spp.* incluyendo *L. monocytogenes*, son ubicuas en el medio ambiente incluyendo el suelo, agua, drenaje, la vegetación (por ejemplo, la hierba, prados, bosques, ensilaje), las heces de animales silvestres, así como en las granjas y en las instalaciones de procesamiento de alimentos (Sauders y Wiedmann, 2007). Los animales de explotación pueden ser asintomáticos o causar encefalitis, abortos septicemia y pueden ser una fuente de *L. monocytogenes* en el entorno de granja. (Rožman y Jeršek, 2009).

*L. monocytogenes* se ha ganado es reconocido como uno de los principales patógenos alimentarios, sin embargo la tasa de mortalidad por este microorganismo no parece disminuir con los años, a pesar de que el número de casos pareciera ser pequeño en comparación con las enfermedades estimadas asociadas con la salmonelosis y campilobacteriosis (Todd *et al.*, 2011).

Por otra parte, se ha demostrado que los principales alimentos asociados a brotes de listeriosis son los alimentos listos para su consumo (RTE, por sus siglas en ingles ready-to-eat), implicando esto que el alimento sea consumido sin ninguna medida de control adicional para el patógeno, así el consumidor tiene nulas oportunidades para destruir el patógeno antes de consumirlo.

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. Se ha demostrado que este patógeno posee la capacidad de sobrevivir a baja actividad de agua, a elevadas concentraciones de sal soportando el estrés osmótico e incluso puede multiplicarse desde -1 a 45 °C.

Por lo tanto, debido a que la *Listeria* posee la capacidad de sobrevivir en condiciones de conservación ligeras además de poder multiplicarse incluso a temperaturas de refrigeración el riesgo de proliferación del patógeno y por tanto los riesgos de infección por este mismo, son aún mayores. (García *et al.*, 2008) (Linton *et al.*, 2008)

### **2.1.2 Queso tipo panela**

De acuerdo con la NOM-121-SSA1-1994 para las especificaciones sanitarias de los quesos frescos y madurados un queso se define como: “Producto elaborado con la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin la adición de crema, obtenida por coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos por su proceso pueden ser; fresco, madurado o procesado”.

Así mismo y en base a esta misma norma, un queso fresco es definido como un “producto que se caracteriza por contar con alto contenido de humedad, sabor suave y no tener corteza, pudiendo o no ser agregados ingredientes opcionales y tener un periodo de vida de anaquel corto, requiriendo condiciones de refrigeración”.

El queso fresco generalmente contiene una mezcla de bacterias ácido lácticas *Lactococcus lactis*, *L. lactis* spp. *cremoris*, *L. lactis* spp. *lactis* o *Leuconostoc mesenteroides* que otorgan el aroma ácido y/o la textura característicos de este tipo de queso (Grattepanche, *et al.*, 2007). La acidificación de la leche generada por los cultivos agregados es un paso determinante en el sabor del queso fresco, no obstante la calidad del mismo está determinada por su sabor, aroma, propiedades reológicas y su apariencia visual (Garde *et al.* 2007).

El queso panela, al ser un alimento de alta humedad es susceptible a contaminación, aunado a que generalmente es elaborado con leche sin tratamiento, por las características de sabor que este adquiere, ha sido asociado a diversos brotes, centrándose la atención principalmente en un caso ocurrido en el año de 1985 en Estados Unidos relacionado al consumo de queso tipo panela, donde el agente causal identificado fue la *Listeria* causando un total de 48 muertes (Linnan *et al.*, 1988).

## **2.2 Tratamientos de conservación en leche.**

En la industria láctea, los tratamientos en leche son los mismos que se han venido utilizando desde que la pasteurización fue descubierta en 1864 por el científico francés Louis Pasteur, aprovechando la ventaja que se tiene de lograr la denominada “esterilización parcial” de la leche, sin embargo, los cambios en las propiedades sensoriales que ocurren en el alimento es prácticamente imposible que no sea detectado por el consumidor (Shakeel *et al.*, 2000).

Actualmente, existen tres tipos de procesos bien diferenciados. La denominada pasteurización lenta (Low Temperatura Long Time, LTLT) que consiste en calentar la leche a 63 °C por 30 minutos. Se tiene la pasteurización a altas temperaturas durante un breve período de tiempo (High Temperature Short Time, HTST), calentando a 72°C durante 15 segundos. El proceso a altas temperaturas (Ultra High Temperature, UHT) se efectúa calentando 138 °C durante un período de al menos dos segundos. A pesar de los tres tipos de tratamientos térmicos que existen, de la facilidad de adquisición de la leche pasteurizada, y de los antecedentes reportados sobre el riesgo que implica el consumo de leche no tratada, los quesos elaborados a partir de leche cruda se venden en todo el mundo, y son especialmente populares entre algunos consumidores, debido a su fuerte sabor y aroma característico.

La pasteurización es un procedimiento eficiente en la eliminación de microorganismos patógenos, pero en general se acepta que el queso de leche cruda posee un sabor más intenso y madura más rápidamente que el queso elaborado con leche pasteurizada (Hickey *et al.*, 2007).

### **2.3 Tecnologías emergentes de conservación.**

Con el objetivo de satisfacer las crecientes demandas de los consumidores por alimentos frescos, nutritivos y seguros, recientemente han surgido nuevas tecnologías como alternativas de conservación para su aplicación en productos alimenticios. Dichas tecnologías incluyen nuevos procesos térmicos, tales como microondas y calentamiento óhmico, que son mucho más rápidos que los métodos actualmente generalizados para producir alimentos no perecederos. Por otra parte, se han desarrollado procesos que no utilizan el calor como forma primaria de inactivación de los microorganismos en los alimentos, como son; los campos eléctricos pulsados, las ondas de ultrasonido, la luz pulsada de alta intensidad y las altas presiones hidrostáticas (Barbosa-Cánovas & Rodríguez, 2005).

Es importante mencionar que dentro de las denominadas tecnologías emergentes de conservación se destacan las tecnologías no-térmicas para el procesamiento de alimentos, ya que el objetivo final es que estas puedan ser equivalentes a su contraparte de procesamiento térmico, pero sin dañar las características sensoriales de los alimentos, como es el caso de las altas presiones hidrostáticas (APH). Una de las ventajas más importantes de las APH, es que tienen efecto mínimo sobre los enlaces covalentes en los compuestos de los alimentos, por lo que hay poco daño en sabores, aromas, así como en el contenido de provitaminas y vitaminas (Trujillo *et al.*, 2002).

Cada una de estas tecnologías alternativas posee características únicas y el potencial de amplia aplicación en diferentes categorías de productos alimenticios. Finalmente, el objetivo de todos los nuevos procesos es reducir el

tiempo total de exposición de los alimentos, por lo que como producto final se busca obtener alimentos similares a los frescos o naturales pero que confieran la misma inocuidad que uno procesado. Finalmente, los métodos no térmicos, buscan reemplazar a la pasteurización tradicional de alimentos (Barbosa-Cánovas & Rodríguez, 2005).

### **2.3.1 Altas presiones hidrostáticas (APH)**

Uno de los desarrollos tecnológicos de mayor éxito en el siglo XXI es el procesado por altas presiones hidrostáticas (HPP ó HHP; por sus siglas en inglés High Pressure Processing o High Hydrostatic Pressure respectivamente). Las altas presiones hidrostáticas han sido ampliamente utilizadas en la industria alimentaria, en productos como; carnes, hortalizas, frutas, purés, jugos, productos marinos, productos lácteos, entre otros, tanto con objetivos de investigación como de comercialización. La leche fue el primer alimento en el cual se estudió el efecto de las APH de acuerdo a lo reportado por Hite (1899) citado por Mújica-Paz *et al.* (2011) donde reportan el tratamiento a 670 MPa por 10 minutos logrando reducir de 5 a 6 logaritmos la población microbiana. Por otra parte, el guacamole, fue el primer producto comercializado en Estados Unidos aplicando esta tecnología (Mújica-Paz *et al.*, 2011). Es importante mencionar que el uso de las APH se destaca en los productos denominados listos para su consumo o redy-to-eat (Haiqiang, 2006).

### **2.3.2 Procesamiento de alimentos por APH**

La tecnología de APH es una técnica de proceso en frío que consistente en someter al alimento, previamente sellado en su envase final flexible, a altos niveles de presión hidrostática, donde el agente trasmisor de la presión generalmente es agua y se utilizan presiones en alimentos de hasta 600 MPa oscilando en tiempos de tratamiento desde 10 segundos hasta más de 20 minutos dependiendo del alimento y del microorganismo que se desee eliminar (Huppertz *et al.*, 2002; Huppertz *et al.*, 2004; Haiqiang, 2006)

De acuerdo a lo reportado por Berlin *et al.* (1999), para inactivar especies de *Vibrio*, que son relativamente sensibles a la presión, es necesario el uso de presiones alrededor de 250 MPa por 15 min o bien de 300 MPa por 5 min a 25 °C para reducir significativamente las poblaciones de *Vibrio* en alimentos marinos reduciendo hasta 6 unidades logarítmicas. Por otra parte, *Staphylococcus aureus* es un microorganismo que presenta mayor barorresistencia, son necesarios tratamientos alrededor de 500 MPa para lograr la inactivación completa del patógeno (Yuste *et al.*, 2004).

La presurización es una técnica muy reciente en el campo alimentario, empleado desde 1990 (Téllez *et al.*, 2001) Por su parte, las altas presiones hidrostáticas se basan principalmente en los dos fenómenos por los cuales están regidos. El primero es el principio isostático, que establece que los cambios de presión son prácticamente instantáneos y uniformes, independientemente del volumen y geometría de la muestra. El segundo es el principio de Le Chatelier, el cual postula que todo fenómeno químico, físico o de transición de fase que va acompañado de una disminución de volumen se ve favorecido por la presión y viceversa (Cheftel, 1999).

### **2.3.3 Efecto de las APH en los componentes del alimento**

Si bien es cierto que diversas investigaciones han demostrado que los efectos de las altas presiones en los alimentos son casi nulas (Huppertz *et al.*, 2002; Yuste *et al.*, 2004) y que es por ello que las características sensoriales de los mismos no se ven afectadas (Trujillo *et al.*, 2002), otros autores aseguran que si hay efectos adversos principalmente en las características de textura y apariencia de los alimentos (Mújica-Paz *et al.*, 2011).

El comportamiento de macromoléculas biológicas en virtud de la presión es importante para la comprensión de los efectos de las APH en la leche. Bajo presión, las biomoléculas obedecen al principio Le Chatelier-Braun, es decir, cada vez que se aplica un esfuerzo a un sistema en equilibrio, el sistema reaccionará con el fin de contrarrestar la tensión aplicada, por lo que, las reacciones que

resultan en la reducción del volumen se promoverá bajo altas presiones. Tales reacciones pueden dar lugar a la inactivación de microorganismos o enzimas y los cambios de textura en alimentos.

Lo expuesto anteriormente puede conducir a modificación en las moléculas de los sistemas bioquímicos cuando sobre ellas actúan las altas presiones. Son de particular interés los efectos de las altas presiones en las proteínas de los alimentos. En su estado nativo, las proteínas se estabilizan mediante enlaces covalentes (incluyendo puentes disulfuro), además de interacciones electrostáticas (pares de iones y grupos polares), puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas y éstos no se ven afectados por las APH, o por lo menos no se afectan a una temperatura relativamente baja (0-40°C), y por lo tanto la estructura primaria de las proteínas se mantiene intacta durante el tratamiento de APH. Así los enlaces covalentes, debido a su baja compresibilidad no se ven alterados a presiones inferiores a 1000 MPa, por lo que la estructura primaria de las proteínas no se modifica (Trujillo *et al.*, 2002).

Por otro lado, los cambios en la estructura secundaria se producen a presiones elevadas y conducen a una desnaturalización irreversible, debido a la desestabilización de los enlaces de hidrógeno (Huppertz *et al.*, 2002). A bajas presiones se ve favorecida la formación de puentes de hidrogeno, la estructura secundaria se ve modificada debido a una pequeña reducción del volumen, por efecto de la presión, en algunas ocasiones esta disminución de volumen puede ser compensada por medio de interacciones hidrofóbicas o de estructuras más voluminosas (Bozoglu *et al.*, 2004). Algunos otros autores han postulado que la estructura secundaria no se ve afectada (Smelt, 1998; Anema *et al.*, 2004; Considine *et al.*, 2006).

Los cambios significativos en la estructura terciaria de las proteínas, que se mantienen principalmente por interacciones hidrofobas e interacciones iónicas, se observan a presiones mayores a 200 MPa (Huppertz *et al.*, 2002). La alteración de



las interacciones electrostáticas dependerá de la disposición de las cargas iónicas, así como de su signo. En general, las altas presiones favorecen este tipo de interacción si los grupos ionizados de signos opuestos se encuentran solvatados, mientras que una deshidratación de los grupos ionizados, las dificultará. En general, las interacciones hidrofóbicas, encargadas del mantenimiento de la estructura terciaria de las proteínas, se ven desfavorecidas por el incremento de presión, y requieren un aumento de volumen, aunque algunos autores han observado un incremento de éstas a determinadas presiones (Bozoglu *et al.*, 2004). Por otra parte, el establecimiento de interacciones como puentes de hidrogeno parece que varía notablemente en función de la presión que se aplique (Toepfl *et al.*, 2006). Del mismo modo, las interacciones hidrofóbicas entre los grupos alifáticos se caracterizan por aumentos en el volumen y por lo tanto se desestabilizan al aumento de las presiones (Huppertz *et al.*, 2002).

Se han realizado diversos estudios en los que se concluye que los efectos de la presión sobre las propiedades funcionales de las proteínas y sus modificaciones se deben a cambios en las interacciones intra e intermoleculares entre grupos funcionales de los aminoácidos (Téllez *et al.*, 2001).

Por otra parte los enlaces iónicos se desestabilizan bajo presión, debido que al incrementarla, las moléculas de agua que rodean a cada ion se ordenan con una mayor densidad. Este empaquetamiento más denso entre el agua, dificulta los enlaces entre iones (Rendueles *et al.*, 2010).

En general, la aplicación de APH superiores a 200 MPa a temperatura ambiente, provocan la disociación de macroestructuras en subunidades, así como el despliegue y desnaturalización de estructuras monómeras, probablemente debido al debilitamiento de las interacciones hidrófobas y la separación de los puentes salinos inter o intramoleculares, según el caso (Trujillo *et al.*, 2002). Por otra parte, cuando la presión y concentración proteica de la matriz alimentaria son elevadas, las interacciones antes mencionadas, causadas por las altas presiones,

conducen a agregaciones y gelificaciones de sistemas biológicos. En general los efectos que sufren la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas pueden ser reversibles, aunque dependiendo de factores como la temperatura, pH y otros pueden tener lugar de forma irreversible (Voigt *et al.*, 2010).

En resumen los enlaces covalentes y los puentes de hidrogeno, no se ven afectados por el tratamiento con APH, por otro lado, las interacciones hidrofóbicas y los enlaces iónicos sí podrían ser afectados por la presión, dependiendo de los niveles y tiempos de contacto utilizados. Las moléculas más pequeñas que tienen pocas estructuras secundaria, terciarias y cuaternarias, tales como aminoácidos, vitaminas y componentes de sabor y aroma que contribuyen a la calidad sensorial y nutricional, no se verán afectados por los tratamientos con APH en los alimentos (Huppertz *et al.*, 2002).

#### **2.3.4 Efecto de APH en leche y productos lácteos**

En la leche, los fenómenos que ocurren en las caseínas se deben a cambios producidos en la estructura micelar y las consecuencias que de ellos se derivan. Se han realizado investigaciones (Voigt *et al.*, 2010) en las que se demuestra que la leche al ser sometida a presión sufre variaciones en el tamaño micelar. Así presiones inferiores a 200 MPa el cambio es apenas perceptible por los métodos de estudio, sin embargo a presiones entre 200 y 400 MPa se produce una parcial disgregación de la micela, aunque dependiendo de la temperatura del tratamiento puede producirse una reagrupación (Téllez *et al.*, 2001), no obstante, presiones superiores a 400 MPa conducen a una disgregación micelar evidente, lo que provoca un incremento de la transmitancia de la leche, dando como resultado un aumento de la caseína soluble en el suero, así como un incremento en la relación superficie volumen, que facilita las interacciones de las caseínas (Toepfl *et al.*, 2006).

Se ha reportado hasta el momento la manufactura de cinco variedades de queso usando leche tratada con altas presiones: Queso cheedar (Voigt *et al.*, 2010), queso a base de leche de cabra (González *et al.*, 2007), queso fresco

(Sandra *et al.*, 2004), queso reducido en grasa (Molina *et al.*, 2000) y queso Camembert (Linton *et al.*, 2008). En general se ha reportado que la manufactura de queso con leche procesada por AHP, resulta en mayores niveles de humedad, con incrementos en el rendimiento por disrupción de interacciones no covalentes resultando en la incorporación de la  $\beta$ -lactoglobulina en la matriz de caseína del queso (Gervilla *et al.*, 2000).

### **2.3.5 Efecto de las APH en los microorganismos**

Existe evidencia en reportes científicos de que las APH son efectivas en eliminar o reducir microorganismos patógenos en el tratamiento de alimentos, en la tabla 1 se hace evidente el sinnúmero de estudios que revelan a las APH como una tecnología segura y eficiente para su uso en alimentos.

La alta presión al afectar los enlaces más débiles, las fuerzas de van der Waals, las interacciones electrostáticas y los puentes de hidrogeno, son cambios que pueden explicar el efecto de la conservación por tratamiento con APH. La presión al causar cambios en la estructura de la membrana resulta en efectos de inactivación microbiana. Sin embargo, también la presión puede ayudar a facilitar el acceso de una enzima a su sustrato, causando esto el deterioro del producto durante su almacenamiento. Por otra parte los cambios en la estructura de macromoléculas importantes como ADN (ácido desoxirribonucleico) y proteínas con actividad enzimática contribuyen también a la conservación de los alimentos (Mújica-Paz *et al.*, 2011).

El efecto de las APH en los microorganismos se ve reflejado en la compresión de las vacuolas, alargamiento celular, separación de la membrana de la pared, contracción de la membrana, modificación del núcleo y organelos intracelulares, liberación de material intracelular hacia espacios extracelulares, incremento de ATP (Adenosintrifosfato) extracelular, el decremento del pH intracelular y el flujo de protones, han sido algunas de las teorías expuestas sobre el modo de actuación de las APH (Rendueles *et al.*, 2010).

**Cuadro 1.** Efecto de las APH sobre la reducción de la población de microorganismos patógenos en alimentos.

Microorganismo	Condiciones de operación			Reducción log	Referencia
	Presión (MPa)	Tiempo (min)	Temp. (°C)		
<i>Vibrio</i>	250	15	25	6.0	Berlin <i>et al.</i> , 1999
	300	5	25	6.0	
<i>Listeria monocytogenes</i>	600	0.5	21.5	6.7	Haiqiang Chen, 2006
<i>Shigella Flexneri</i>	600	6	21.5	7.6	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	600	10	21.5	1.7	Haiqiang Chen, 2006
	600	10	50	7.6	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	250	20	21.5	7.0	Haiqiang Chen, 2006
	300	12	21.5	9.0	
<i>Listeria monocytogenes</i>	345	20		7.0 (buffer)	Haiqiang Chen, 2006
<i>Listeria monocytogenes</i>	345	20		2 (leche UHT)	
<i>Listeria innocua</i>	600	20	20	8.0	Buzrul <i>et al.</i> , 2008
<i>E. coli</i> O157:H7	600	10		6.0	Huppertz <i>et al.</i> , 2006
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	600	10	20	7.5 leche UHT entera	
<i>Listeria innocua</i>	400	27	8	6.0 leche UHT descremada)	Mc. Clements <i>et al.</i> , 2001
	400	27	8	6.0 leche UHT descremada)	
<i>Listeria innocua</i>	500	5	20	3.8 (leche reconstituida)	Black <i>et al.</i> , 2005
	500	5	20	3.8 (leche reconstituida)	
<i>S. aureus</i>	600	30	20	5.0 (leche UHT)	Huppertz <i>et al.</i> , 2006
	330	15	34	5.6 (leche UHT descremada)	
<i>E. coli</i> O157:H7	200	15	60	8.0 (leche UHT descremada)	Huppertz <i>et al.</i> , 2006
<i>Listeria monocytogenes</i>	500	1	50	6.5 (leche UHT)	Haiqiang Chen, 2006
<i>Listeria monocytogenes</i>	400	12	50	7.0 (leche UHT)	

## 2.4 Bioconservación

Se consideran cultivos protectores a los microorganismos que confieren factores de seguridad adicionales que resultan en la estabilidad microbiológica del alimento, reduciendo el riesgo de desarrollo de microorganismos patógenos o deterioradores.

Se ha demostrado que la bioconservación puede extender la vida de anaquel y mejorar la calidad microbiológica, minimizando el impacto en las propiedades nutricionales y sensoriales de los alimentos (García *et al.* 2010). La

bioconservación es una alternativa que involucra el uso de bacterias y/o sus metabolitos como medio de protección de la inocuidad de diversos alimentos.

Las bacterias más utilizadas e investigadas recientemente son aquellas que pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL), que se caracterizan por fermentar azúcares hasta transformarlos en ácido láctico y otros metabolitos es de importancia básica en las estrategias de conservación biológica de alimentos (Settanni y Moschetti, 2010).

#### **2.4.1 Bacteriocinas**

La actividad antimicrobiana generada por las BAL ayuda a controlar la flora microbiana presente en el alimento. Las BAL producen diferentes sustancias antimicrobianas incluidos ácidos orgánicos, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, diacetilo, etanol y bacteriocinas. La producción de bacteriocinas por BAL se puede aplicar en la conservación de alimentos debido a sus ventajas tecnológicas (Leroy y De Vuyst, 2004).

#### **2.4.2 *Lactococcus lactis***

*Lactococcus lactis* es una bacteria ácido láctica, Gram positiva, mesófila, ampliamente utilizada en la fermentación de productos lácteos, por su capacidad de fermentar la lactosa con producción de ácido láctico, además de tener la habilidad de sintetizar nisina, una bacteriocina de amplio uso en la industria de alimentos lácteos (Mireau *et al.*, 2005).

En el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro se aisló una cepa de *Lactococcus lactis*, identificada como *L. lactis* UQ2, es una cepa aislada de un queso mexicano, productora de la bacteriocina genéticamente identificada como nisina A (García *et al.*, 2008). Dicha cepa fue posteriormente modificada por conjugación para favorecer su desarrollo en leche, la cepa resultante denominada *L. Lactis* UQ2 rif L+ muestra un buen crecimiento en leche (García *et al.*, 2009).

*L. lactis* resulta de interés, por su habilidad en la síntesis de bacteriocinas, que son polipéptidos de bajo peso molecular capaces de inhibir el desarrollo de diversos microorganismos patógenos o deterioradores de alimentos. Las bacteriocinas derivadas de BAL tienen estatus GRAS (Generalmente reconocido como seguro, FDA 1988) y son atractivas para la industria de alimentos debido a su actividad contra bacterias Gram-positivas involucradas en enfermedades transmitidas por alimentos como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, entre otros (Sobrino *et al.*, 2008).

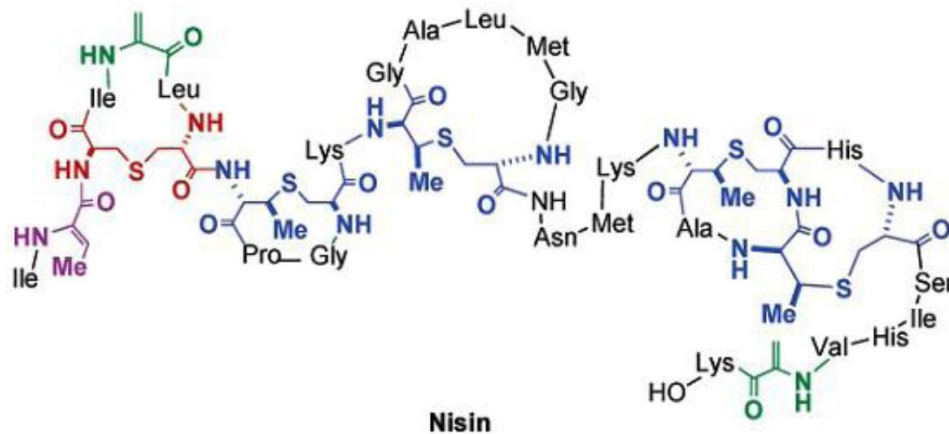
### 2.4.3 Nisina

Se ha resaltado la importancia de las bacterias ácido lácticas, en especial *L. lactis* por su capacidad de producción de nisina, sin embargo es importante mencionar que la producción de nisina por *Lactococcus lactis* spp. *lactis* está regulada por el mecanismo conocido como percepción en quórum (*Quorum sensing*) a nivel transcripcional en el que la nisina actúa como molécula inductora (Pongtharangkul y Demirci, 2006).

La nisina es un péptido antimicrobiano que muestra actividad antibacteriana tanto en microorganismos deterioradores como en patógenos en alimentos. Sin embargo, ha mostrado una mayor eficiencia en la eliminación principalmente bacterias Gram-positivas como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* y *Staphylococcus aureus* (García *et al.*, 2010; Settanni y Moschetti, 2010).

La primera bacteriocina aislada de *L. lactis* fue la nisina, un lantibiótico compuesto de 34 aminoácidos, tiene una masa molar de 3.4 kDa (Figura 1). Actualmente está aprobada debido a que es considerada como una molécula GRAS (generalmente reconocida como segura) estatus que fue otorgado en 1988 debido a que sus aminoácidos constituyentes se metabolizan junto con los procedentes de otras proteínas (García-parra *et al.*, 2009). La nisina es utilizada en cerca de cincuenta países como aditivo alimentario y a la fecha, se han

identificado cinco variantes naturales de la nisina; A, Z, Q, U y F (Alegria *et al.*, 2010).



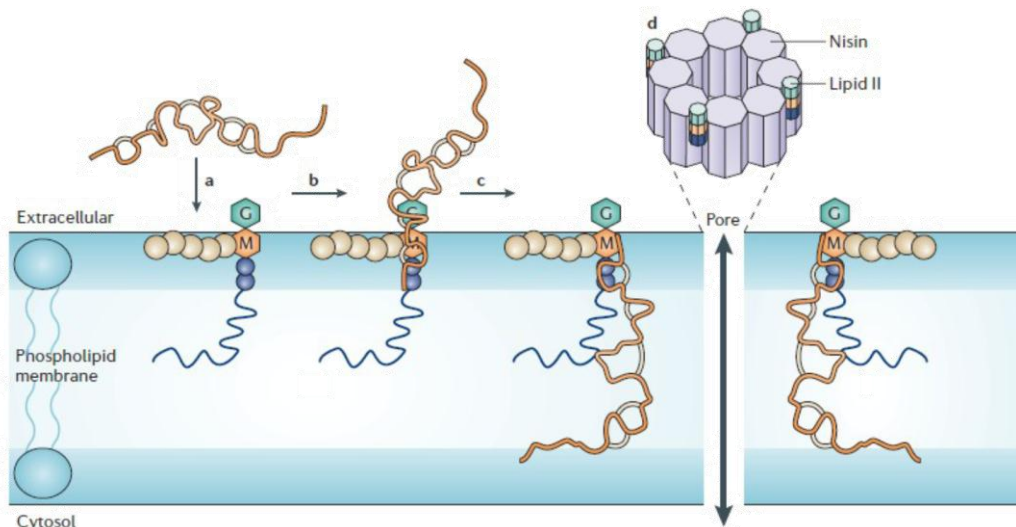
**Figura 1** Estructura de la nisina (Chatterjee *et al.*, 2005).

#### 2.4.4 Mecanismo de acción

En bacterias Gram-positivas, este proceso involucra moléculas específicas que actúan como señales para la inducción de la expresión de genes sólo cuando una cierta concentración de estas moléculas es alcanzada en el medio ambiente en el cual se encuentran; e implica una comunicación célula a célula (García-Parra *et al.*, 2009). Toda la maquinaria biosintética para la producción de nisina se encuentra localizada en un transposón de 70 kb que también contiene los determinantes de la utilización de sacarosa (Horn *et al.*, 1991).

Se ha demostrado que en bacterias Gram-positivas la nisina actúa a nivel de la membrana perturbando la movilidad iónica, inhibiendo la capacidad de captar los aminoácidos y causando liberación de aminoácidos acumulados (Gujarathi *et al.*, 2008). La acumulación de nisina en la monocapa externa de lípidos de la membrana, conduce a la agregación de nisina en monómeros, seguido de la formación de estructuras porosas de corta duración. La relajación de dichas estructuras permite la traslocación de los péptidos a través de la bicapa lipídica (Breukink y de Kruijff, 2006).

Otro mecanismo reportado más eficiente depende del lanzamiento del precursor del peptidoglucano, presentando un mecanismo de acción dual, como se muestra en la Figura 2. El Lípido II, y la consecuente formación de poros. El lípido II y la nisina forman un poro híbrido, compuesto de ocho moléculas de nisina y cuatro moléculas de lípido II, lo cual causa pérdida de pequeños componentes citoplasmáticos como aminoácidos y ATP. Además de este efecto, se colapsa el gradiente de iones, causando un desbalance en el gradiente de pH y en la fuerza protón motriz (Lubelski *et al.*, 2007).



**Figura 2.** Mecanismo de acción de la nisina (Lubelski *et al.*, 2007).

## 2.5 Microencapsulación

El problema que se presenta al incorporar cultivos protectores en cualquier alimento, es la resistencia de los microorganismos a los procesos tecnológicos y a condiciones ambientales adversas de pH, oxígeno o temperatura. Por todo esto, se han implementado metodologías para que los microorganismos se introduzcan protegidos por una barrera física que evite su exposición a las condiciones adversas del entorno. Una de las técnicas propuestas es la microencapsulación, que consiste en el recubrimiento de microorganismos con un material protector generalmente de naturaleza polimérica. La microencapsulación



protege a los microorganismos permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad (Villena *et al.*, 2009).

La microencapsulación puede ser considerada imaginariamente como una forma especial de empaquetar, en la que un material particular puede ser cubierto de manera individual para protegerlo del ambiente y de influencias deletéreas. En un sentido amplio, la microencapsulación provee un medio de envasar, separar y almacenar materiales en escala microscópica para su liberación bajo condiciones controladas. Dentro del término microcápsulas, macropartículas, nanocápsulas y sustancias activas atrapadas o embebidas, aunque existe una terminología dependiendo de la industria de aplicación, en general el término se usa de manera indistinta. La microencapsulación es un proceso por medio del cual las células son empaquetadas con un material que las protege del ambiente desfavorable (Talwalkar y Kailasapathy, 2004).

El inicio de la aplicación de la microencapsulación en los productos lácteos cobró importancia debido a que los probióticos son generalmente de origen intestinal, muchas cepas no pueden crecer en un medio con base láctea y son inactivadas cuando son expuestas a temperaturas altas, a los ácidos o al oxígeno durante el proceso de los mismos (Zhao *et al.*, 2009). Por lo tanto, la sensibilidad de los probióticos impulsó a la Ciencia y Tecnología de Alimentos a investigar, desarrollar y aplicar tecnologías con las cuales sea posible proteger a estas células en los alimentos y una de estas tecnologías es la microencapsulación, ya que ésta soluciona problemas de proceso mediante la captura de un ingrediente clave como núcleo central y recubrirlo con una capa de material inerte o protector (Vasishtha, 2003). Esta permite la protección de los ingredientes bioactivos y mejora su estabilidad durante el proceso alimentario en la industria y además en el paso por el tracto gastrointestinal, permitiéndolos así llegar vivos al intestino.

Existe una importante razón tecnológica por la cual son usados los productos lácteos como acarreadores de probióticos: muchos de estos productos han sido optimizados para la sobrevivencia de microorganismos fermentativos.

Según Kailasapathy (2002) en los microorganismos la encapsulación se produce naturalmente en las células bacterianas al crecer y producir exopolisacáridos. Las células microbianas están atrapadas dentro de sus propias secreciones que actúan como una estructura de protección o una cápsula, lo que sucede es una reducción de la permeabilidad del material a través de la cápsula y por lo tanto la célula se encuentra menos expuesta a factores ambientales adversos. Muchas bacterias ácido lácticas poseen la capacidad de sintetizar exopolisacáridos, sin embargo, estos son producidos de forma insuficiente por lo que no son capaces de encapsular completamente.

Por lo tanto, la microencapsulación ayuda a separar un material biótico o abiótico a partir del núcleo donde se encuentra de su medio ambiente, hasta que este se libera. El núcleo inestable es protegido de su entorno, mejorando así su estabilidad, prolongando la vida del núcleo y proporcionando una liberación del mismo de forma controlada. La estructura formada por el agente microencapsulante alrededor de la sustancia básica a encapsular, es conocida como "pared". Los materiales de pared, deben ser compuestos muy específicos, con características fisicoquímicas adecuadas para cada medio a encapsular. Las propiedades del sistema de pared están diseñados para proteger el núcleo y para liberarlo a velocidades controladas bajo condiciones específicas, mientras que en teoría debe permitir que las moléculas pequeñas puedan pasar dentro y fuera de la membrana (Kailasapathy, 2002). Las cápsulas pueden variar en forma y tamaño dependiendo del material de pared utilizado y del material a encapsular.

Según Mortazavian *et al.*, (2007) la microencapsulación en comparación con las técnicas de inmovilización o retención, posee muchas ventajas; una de

ellas es que la microcápsula se compone de una pared (membrana) semipermeable, esférica, delgada y fuerte.

Esta membrana permite que las células bacterianas sean retenidas dentro de las microcápsulas formadas un mayor tiempo, esto en comparación con una matriz de retención, debido a que en esta no hay núcleo sólido o gelificado en la microcápsula y su diámetro pequeño ayuda a reducir las limitaciones de transferencia de masa (Kailasapathy, 2002).

Los nutrientes y metabolitos de la célula pueden difundirse a través de la membrana semipermeable fácilmente. Esta membrana sirve como una barrera para la liberación celular y minimiza la contaminación. El material del núcleo encapsulado se libera por varios mecanismos, tales como ruptura mecánica, la disolución, la fusión y difusión a través de la pared.

Son objeto de estudio los materiales de pared utilizados para la microencapsulación ya que dependiendo de las características fisicoquímicas del mismo, serán las características y propiedades de barrera de las microcápsulas formadas y ahí su capacidad de protección al microorganismo. De acuerdo a lo reportado por Shahin *et al.* (2011) los cuales mencionan el impacto de la microencapsulación por alginato, entre otras cualidades, se destaca que este método es simple de realizar y de bajo costo, además, no es tóxico y por lo tanto puede usarse de manera segura en alimentos.

Además de la microencapsulación por alginato, existen otras opciones y se han dividido en métodos físicos y químicos. Como métodos químicos pueden citarse: Coacervación compleja, polimerización interfacial, gelificación iónica, incompatibilidad polimérica y encapsulación en liposomas. Entre los métodos físicos se encuentran: el secado por aspersión y la encapsulación por lecho fluidificado como los más comunes (Mortazavian *et al.*, 2007).

### 2.5.1 Secado por aspersión

El secado por aspersión es el método de microencapsulación más comúnmente utilizado en la industria alimentaria, debido a que es económico y flexible, además de ofrecer un producto final de buena calidad (Dziezak, 1988). El proceso implica la dispersión del material del núcleo en una solución de polímero, formando una emulsión o dispersión, seguido de homogeneización del líquido y posteriormente la atomización de la mezcla en la cámara de secado (Jackson y Lee, 1991). Esto conduce a la evaporación del disolvente (agua) y por lo tanto la formación de la matriz de tipo micro cápsulas.

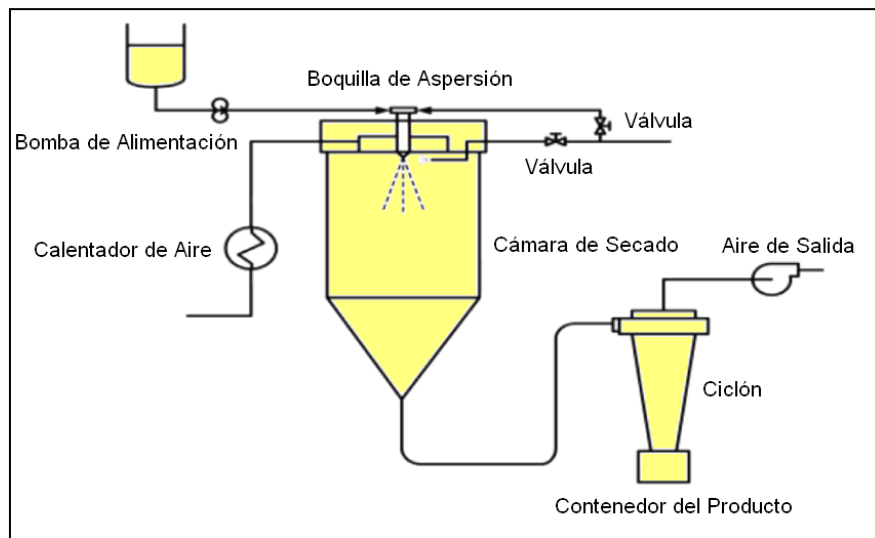
La ventaja del procedimiento es que puede ser operado en una base continua. La desventaja es que las altas temperaturas utilizadas generalmente en el proceso pueden no ser adecuadas para encapsular bacterias probióticas o cualquier cultivo bacteriano. Sin embargo, un buen ajuste y control de las condiciones de procesamiento, tales como la temperatura de entrada y la temperatura de salida, pueden dar como resultado células encapsuladas viables, con una distribución deseada de tamaño de partícula.

En una temperatura de entrada de 100° C y temperatura de salida baja de 45° C, las células de *Bifidobacterium* se encapsularon satisfactoriamente para producir microesferas con almidón gelatinizado modificado como un material de revestimiento (O'Riordan *et al.*, 2001). En este estudio, el secado por pulverización/aspersión se encontró que era un valioso proceso para encapsular *Bifidobacterias*. El proceso de secado por pulverización es económico, fácil de ampliar y utiliza equipo fácilmente disponible en la industria alimentaria. Un informe anterior indicó que la supervivencia de las bacterias probióticas durante el secado por aspersión se redujo con el aumento de las temperaturas de entrada (Mauriello *et al.*, 1999). Las temperaturas de entrada menores a 60° C dieron como resultado un secado deficiente y producto pegajoso con frecuencia acumulado en el ciclón y en algunos casos en el vaso receptor. Las altas temperaturas de entrada (>120°C) dio lugar a temperaturas de salida más altas

(>60°C) y redujo significativamente la viabilidad de encapsulado *Bifidobacterias* (O'Riordan *et al.*, 2001).

### 2.5.2 Operaciones del secado por aspersión

El proceso de secado incluye las siguientes operaciones: atomización, contacto del líquido atomizado y aire caliente, evaporación del agua y separación del producto. El proceso de secado se inicia con la formación de una fase acuosa acarreadora; la muestra es alimentada a la cámara de aire caliente del secador mediante una cabeza atomizadora. Las partículas son calentadas inmediatamente formando una película en la superficie de las gotas retardando la difusión de la molécula, mientras que las moléculas de agua y algunos volátiles difunden rápidamente hacia la superficie vaporizándose. Las partículas secas son removidas para prevenir sobrecalentamiento. La Figura 3 muestra un esquema de un equipo de secado por aspersión.



**Figura 3.** Esquema de equipo de secado por aspersión y sus componentes.

### 2.6 Efecto combinado de Altas Presiones Hidrostáticas y Biocoservación

Si bien es cierto, que existen un sinnúmero de investigaciones de los efectos de las altas presiones hidrostáticas, por ejemplo, la reducción logarítmica

de microorganismos patógenos presentes en alimentos, sus efectos en la calidad sensorial y nutritiva de los alimentos. Por su parte, también ha sido reportado el efecto y modo de acción de la nisina sobre diversos microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes* y *E. Coli* O157:H7 (Rodríguez *et al.*, 2005; Breukink y De Kruijff, 2006; García *et al.*, 2008), pero más allá del potencial que poseen cada una de estas tecnologías individualmente, es importante destacar el impacto que pueden generar cuando se usan en combinación. Se sabe que el efecto de la presión en los microorganismos es altamente variable, existen grandes diferencias entre especies, y dentro de las cepas. Muchos factores afectan la sensibilidad de los microorganismos a los tratamientos por altas presiones, incluyendo la magnitud de la presión, el tiempo de presurización y la temperatura, así como las especies microbianas y las cepas, la fase crecimiento celular y el medio de suspensión a tratar (Patterson, 1999).

De acuerdo con el concepto de barreras múltiples de conservación de alimentos, los tratamientos de altas presiones pueden usarse en combinación con otras estrategias de conservación, para así incrementar la letalidad microbiana y que el efecto de los tratamientos sea más satisfactorio utilizándolos en conjunto que los que muestran cuando se utilizan individualmente (Elaine *et al.*, 2005).

Existen reportes a cerca de los tratamientos de altas presiones hidrostáticas en combinación con otros sistemas como la lactoperoxidasa, lactoferrina y lactoferricina, la lisozima y bacteriocinas en diferentes modelos alimenticios contaminados por agentes patógenos y organismos deterioradores. Por lo tanto, en varios estudios se ha concluido que es posible lograr una mayor inactivación microbiana mediante la combinación de alta presión con calor o agentes antimicrobianos que con la aplicación de tratamiento de altas presiones por sí solo (Elaine *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2005; M. Avila *et al.*, 2006; Charles *et al.*, 2009).

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidos por bacterias, que tienen efectos bactericidas o bacteriostáticos sobre otras bacterias. La nisina, al ser la única bacteriocina purificada y aceptada para aplicaciones comerciales actuales la convierte en una alternativa viable para su aplicación en productos alimenticios. Esta bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*, actúa sólo contra bacterias Gram-positivas, tales como *Listeria*, *Clostridium*, y bacterias ácido lácticas. Por su parte, se ha reportado que las altas presiones hidrostáticas, poseen una capacidad de inhibición adecuada tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, siendo más eficiente en estas últimas. Sin embargo, se ha demostrado que en bacterias Gram-positivas la nisina actúa a nivel de la membrana perturbando la movilidad iónica, inhibiendo la capacidad de captar los aminoácidos y causando liberación de aminoácidos acumulados (Gujarathi *et al.*, 2008).

La acumulación de nisina en la monocapa externa de lípidos de la membrana, conduce a la agregación de nisina en monómeros, seguido de la formación de estructuras porosas de corta duración. La relajación de dichas estructuras permite la traslocación de los péptidos a través de la bicapa lipídica (Breukink y de Kruijff, 2006).

Por lo tanto el uso combinado de APH con nisina puede tener efecto sinérgico en la reducción microbiológica tanto de bacterias Gram-positivas como de las Gram-negativas. Elaine *et al.* (2005) reportan que en suspensiones de amortiguador las altas presiones causan lesión subletal a bacterias Gram-negativas que, a su vez, sensibilizan estas células a los agentes antimicrobianos tales como la nisina.

### III. JUSTIFICACIÓN

La FDA (2010), reporta como enfermedades más comunes transmitidas por leche cruda son listeriosis, fiebre tifoidea, tuberculosis, difteria y brucelosis. Se ha demostrado que la bioconservación puede extender la vida de anaquel y mejorar su calidad microbiológica, minimizando el impacto en las propiedades nutricionales y sensoriales (García *et al.* 2010).

La bioconservación es una alternativa que involucra el uso de bacterias y/o sus metabolitos como medio de protección de la inocuidad de diversos alimentos. Las bacterias más utilizadas e investigadas recientemente son aquellas que pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL), que se caracterizan por fermentar azúcares hasta transformarlos en ácido láctico y otros metabolitos.

El problema que se presenta al incorporar cultivos protectores en cualquier alimento, es la resistencia de los microorganismos a los procesos tecnológicos y a condiciones ambientales adversas de pH, oxígeno o temperatura. Por todo esto, se han implementado metodologías para que los microorganismos se introduzcan protegidos por una barrera física que evite su exposición a las condiciones adversas del entorno. Una de las técnicas propuestas es la microencapsulación, que consiste en el recubrimiento de microorganismos con un material protector generalmente de naturaleza polimérica. La microencapsulación protege a los microorganismos permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad.

Por lo tanto, es de gran importancia presentar alternativas para el control de la incidencia de este microorganismo mediante la aplicación de la tecnología de obstáculos, como el uso de las altas presiones hidrostáticas en combinación con el uso de cultivos protectores, puede ser una alternativa para asegurar la calidad e inocuidad de los quesos tipo panela.



## IV. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Elaborar queso tipo panela con leche tratada por altas presiones hidrostáticas en combinación con bioconservación por adición de un cultivo protector *Lactococcus lactis* UQ2 rif L+ microencapsulado para garantizar su calidad sensorial e inocuidad.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Microencapsular el cultivo protector *L. lactis* UQ2 rif L+ mediante secado por aspersión evaluando el efecto de las condiciones de secado y el tipo de los materiales de pared sobre la viabilidad final de las células.
2. Evaluar el efecto combinado del tratamiento de leche con el cultivo protector y su posterior tratamiento con altas presiones hidrostáticas sobre la inactivación de *L. innocua* como patógeno subrogado de *L. monocytogenes*.
3. Determinar las condiciones de tratamiento por altas presiones hidrostáticas en leche entera de vaca para la inactivación de *L. innocua* como patógeno subrogado de *L. monocytogenes*.
4. Evaluar el efecto combinado de altas presiones hidrostáticas y bioconservación para la inactivación del patógeno subrogado en leche cruda entera de vaca.
5. Utilizar el efecto combinado de los factores de conservación en estudio para la elaboración de queso tipo panela, con las condiciones empleadas de manera individual.
6. Evaluar la viabilidad y producción de nisina por el cultivo protector *L. lactis* en queso panela almacenado en refrigeración por 30 días.

## V. HIPOTESIS

Dentro de las ventajas de conservación que ofrece el tratamiento de altas presiones hidrostáticas en la elaboración de queso tipo panela, se puede resaltar que además de no dañar las propiedades organolépticas del producto ayuda a incrementar el rendimiento en la elaboración del queso. Por otra parte la adición del cultivo protector *L. lactis* UQ2 rif L+ al queso elaborado con leche tratada por APH, puede ofrecer un alimento seguro por el efecto combinado que otorga el cultivo protector por su capacidad de síntesis de nisina a lo largo de la vida de anaquel del queso. Por otra parte, la tecnología de la microencapsulación ofrece protección a los microorganismos contra las condiciones adversas del alimento ayudando a una mejor incorporación y adaptación del cultivo, por lo que las tecnologías utilizadas convierten al producto en un alimento inocuo con características tanto sensoriales como nutricionales similares a las de un producto sin procesar.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Querétaro en colaboración con la Escuela de Biotecnología y Alimentos del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey campus Monterrey, Nuevo León.

Para la microencapsulación se llevó a cabo un diseño experimental unifactorial con 4 niveles de temperatura evaluando como variable de respuesta la población del cultivo microencapsulado, el rendimiento de proceso y el porcentaje de viabilidad al proceso de secado por aspersión.

Para el efecto combinado del tratamiento de Altas presiones Hidrostáticas y bioconservación se llevaron a cabo cinéticas para evaluar únicamente el efecto de la presión y comparar con el efecto combinado sobre la viabilidad de *L. innocua* utilizado como microorganismo patógeno subrogado de *L. monocytogenes*. Se utilizó como factor la presión y el tiempo de tratamiento y las variables de respuesta fueron; la población de *L. innocua* y *L. lactis*.

El efecto combinado de APH y bioconservación fue evaluado en la elaboración de queso, donde a partir de tratamientos bajo condiciones letales y subletales se observó el efecto de ambas tecnologías sobre la población de *L. innocua*. Las variables de respuesta monitoreadas por mediciones repetidas en el tiempo fue la población de *Listeria*, la viabilidad de *L. lactis* UQ2 rif L+ y la concentración de nisina producida *in situ* por el cultivo protector.

### 6.1 MATERIALES

#### 6.1.1 Cepas microbianas

*Lactococcus lactis* UQ2 rif L+ y *Micrococcus luteus* NCBI 8166, fueron proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología del Departamento de

Investigación y Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química. *Listeria innocua* fue proporcionada por el laboratorio de Inocuidad del departamento de Microbiología de la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### **6.1.2 Enzima coagulante**

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

### **6.1.3 Antimicrobianos**

Se utilizó nisina comercial (MP Biomedical, LLC) para la elaboración de la curva estándar y rifampicina (Sigma) 10,000 µg/L para la preparación del medio púrpura de bromocresol (PBC).

### **6.1.4 Materiales de pared**

Para la microencapsulación de *L. lactis* UQ2 rif L+ se utilizó almidón modificado (National Starch), maltodextrina (Ingredion S.A. de C.V) y concentrado de proteína de suero de leche (CPS) por sus siglas en inglés (WPC whey protein concéntrate).

### **6.1.5 Soluciones**

- Solución de alcohol etílico (JT Baker) al 70% (v/v).
- Solución de sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>, Mallinckrodt) al 10% (p/v).
- Solución de sulfato de manganeso (MnSO<sub>4</sub>, Sigma) al 10% (p/v).
- Tween 20 (Hycel) al 50% (v/v).
- Solución de ácido clorhídrico (HCl, JT Baker) 0.02 N.
- Solución de hidróxido de sodio (NaOH, JT Baker) 0.1 N.
- Solución de ácido clorhídrico (HCl, JT Baker) 5 N.
- Solución de hidróxido de sodio (NaOH, JT Baker) al 2% (p/v).
- Solución de cloruro de sodio (NaCl, JT Baker) al 0.85% (p/v).
- Solución de peptona de caseína (Bioxon) al 0.1% (p/v).
- Solución de lactosa (Sigma, Aldrich) al 10% (p/v).

- Solución Ringer. Por 1 L de solución se pesaron 9 g de cloruro de sodio (JT Baker), 0.42 g de cloruro de potasio (JT Baker), 0.24 g de cloruro de calcio anhidro (Fermont), 0.20 g de bicarbonato de sodio (JT Baker).
- Solución Ringer ¼: se diluyó la solución Ringer 1:4 en agua.

### **6.1.6 Medios de cultivo**

#### **6.1.6.1 Agar lactosa purpura de bromocresol (PBC)**

Por cada L de medio de cultivo se pesaron 5 g de peptona (Bioxon), 3 g de extracto de carne (Bioxon), 10 g de lactosa (Sigma, Aldrich) 0.04 g de púrpura de bromocresol (Merck) y 10 g de agar (Bioxon). Se agregaron 200 µg/L de rifampicina (Sigma)

#### **6.1.6.2 Agar Assay**

Por cada 1 L de medio de cultivo se pesaron 10 g de peptona de caseína (Bioxon), 3 g de extracto de carne (Bioxon), 3 g de cloruro de sodio (JT Baker), 1.5 g de extracto de levadura (Bioxon), 1 g de azúcar mascabado (Dillis) y 10 g de agar (Bioxon). Se ajustó pH a  $6.5 \pm 0.01$ .

#### **6.1.6.3 Medio LM17**

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

#### **6.1.6.4 Agar Oxford**

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

#### **6.1.6.5 Medio LEB**

Usando el medio LEB (*Listeria* Enrichment Broth) se resuspendieron 36.1 g del medio en 1 L de agua destilada. Se esterilizó en autoclave (121°C por 15 min).

#### **6.1.6.6 Agar LMP**

Medio de cloruro de litio feniletanol-moxolactamo (LMP) Para 1 L de medio se resuspendieron 35.5 g de agar fenil etanol y se esterilizó (sin moxolactamo) en autoclave a 121°C durante 15 min. Se enfrió a 48°C y se agregó la solución de moxolactam (7 discos por cada 100ml) previamente esterilizada por filtración. Se vertieron en cajas Petri estériles con poco agar ya que las placas delgadas facilitan la observación de las colonias.

#### **6.1.6.7. Medio ASTEL**

Agar soya tripticaseína con 0.6% de extracto de levadura (ASTEL). Para 1 L de medio se pesaron 40 g de agar soya tripticaseína y 6 g de extracto de levadura, se calentó hasta ebullición y se ajustó el pH final a 7.3 ±0.2 se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

### **6.2 MÉTODOS**

#### **6.2.1 Tratamiento de leche entera por APH.**

La leche cruda entera se mantuvo a temperatura de refrigeración (4°C) hasta su tratamiento. Se empacaron 500 ml de leche cruda en bolsas estériles de polietileno, y posteriormente fueron selladas al vacío (Empacadora al vacío TOR REY) para después ser tratadas por el equipo de Altas Presiones Hidrostáticas (High Pressure Food Processor marca Avure Technologies modelo 2 L provisto con el software RSView32). De acuerdo a cada tratamiento diseñado en algunos casos, la leche cruda fue inoculada con *L. innocua* y *L. lactis* UQ2 rif L+ según el caso, previo al tratamiento de APH. El medio de generación de presión utilizada fue agua, y la presión a utilizar fue determinada en investigaciones preliminares. Una vez presurizadas las muestras fueron colocadas inmediatamente en un baño de hielo para enfriar las bolsas y fueron mantenidas en refrigeración hasta su procesamiento de obtención del queso.

### 6.2.2 Elaboración de queso tipo panela con leche presurizada

En primer lugar se llevaron a cabo análisis fisicoquímicos y microbiológicos de leche cruda de vaca a partir de dos diferentes proveedores, con el fin utilizar la materia prima con mejores características para el presente estudio. Para la elaboración del queso se utilizó leche tratada por APH en condiciones de presurización determinadas en una investigación desarrollada en paralelo. La leche presurizada se acondicionó a una temperatura de 30 °C, y se adicionó el inóculo del cultivo protector líquido *L. Lactis* UQ2 rif L+ al 1% (v/v), se dejó reposar por 15 min, transcurrido este tiempo se agregó el cloruro de calcio (0.4 ml/L, Baker). Posteriormente, se adicionó el cuajo microbiano, 0.05 g/L (QuaLact, México), se agitó constantemente para lograr su completa incorporación. Se dejó reposar por 30 min para favorecer la formación de la cuajada, para posteriormente realizar el corte y dejar reposar 10 min manteniendo una temperatura de 32 °C enseguida la cuajada fue agitada lentamente para favorecer el desuerado.

Se procedió a la eliminación parcial del suero (3/4 partes), seguido de la etapa de salado, empleando NaCl 0.6% (p/v) respecto al volumen inicial de leche, seguido de un desuerado total. En este momento se inoculó el cultivo protector *L. Lactis* UQ2 rif L+ microencapsulado en cantidades equivalentes a la población determinada previamente (Piña, 2012).

De la pasta obtenida fue tomada una muestra representativa para realizar los análisis correspondientes al tiempo cero de estudio ( $t_0$ ), el resto de la pasta fue colocada en moldes por un periodo de 8 a 12 horas en refrigeración para favorecer un mejor desuerado, concluido este periodo el queso se desmoldó para posteriormente ser empacado al vacío. Como variables de respuesta para el queso se monitoreó la población de *L. lactis* UQ2 rif L+ así como los niveles de nisina, pH y acidez durante el almacenamiento en refrigeración por 20 días.

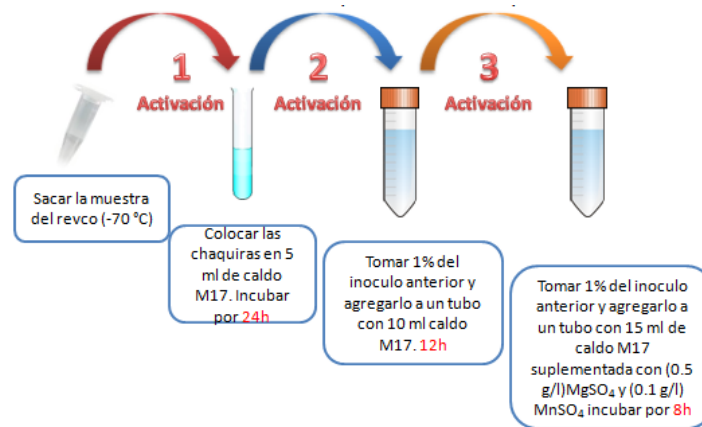


**Figura 4.** Diagrama del procedimiento de elaboración de queso tipo panela.

### 6.2.3 Activación de *L. Lactis* UQ2 rif L+ para microencapsulación y posterior incorporación como inóculo en queso panela.

*L. lactis* UQ2 rif L<sup>+</sup> proveniente de una conserva a -70°C, para lograr una máxima población fue necesario realizar 3 activaciones como se muestra en la figura 5. La primera fue colocada en un tubo con caldo M17 adicionado al 0.5% (p/v) con una solución de lactosa estéril y se incubó durante 24 h a una temperatura de 30°C. La segunda resiembra del cultivo se inoculó al 1% (v/v) en caldo M17 adicionado al 0.5% (p/v) de lactosa y se incubó a 30°C durante 12 h. La tercera resiembra se realizó nuevamente en caldo M17 adicionado al 0.5% de lactosa y suplementado con soluciones estériles de sulfato de magnesio 0.5 g/L y sulfato de manganeso 0.1 g/L, posteriormente se incubó a 30°C por 8 h. Finalizado el periodo de incubación se tomó una muestra para determinar la población final del cultivo. La cantidad de caldo M17 a utilizar en cada activación se ajustaron dependiendo de la cantidad necesaria de cultivo pero siempre respetando la concentración de inóculo al 1% (v/v) (Piña, 2012).





**Figura 5.** Procedimiento de activación de la cepa de *L. lactis* UQ2 rif L+

## 6.2.4 Microencapsulación de *L. lactis* UQ2 rif L+ para su adición en la elaboración de queso tipo panela.

### 6.2.4.1 Recuperación del cultivo

El cultivo de *L. lactis* UQ2 rif L+ activado se centrifugó en tubos falcon® estériles para centrifuga, la velocidad de centrifugación utilizada fue de 4500 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en solución salina estéril al 0.85% (p/v) para ser centrifugado nuevamente bajo las mismas condiciones de centrifugación, esta operación de lavado se repitió dos veces más. El producto final obtenido fue un pellet concentrado de bacterias.

### 6.2.4.2 Preparación del agente encapsulante

Inicialmente la preparación del agente encapsulante se realizó en agua estéril (en un volumen igual al de la última activación) en una suspensión al 10% de sólidos, variando la concentración de almidón modificado, maltodextrina y concentrado de proteína de suero lácteo (CPS) dependiendo de los resultados de viabilidad y comportamiento de la mezcla. Durante su incorporación la mezcla fue homogenizada durante 3 minutos a velocidad máxima con un agitador magnético estéril, una vez incorporados, se ajustó el pH con NaOH al 2% para posteriormente ser calentados a baño María en una parrilla de calentamiento hasta alcanzar 80°C manteniendo la temperatura por 10 minutos. La mezcla se

enfrió a temperatura ambiente y se adicionó el pellet de bacterias, sin embargo se encontraron algunos inconvenientes bajo esta metodología por lo que se decidió replantearla.

El agente encapsulante fue preparado en un buffer de fosfatos 0.1 mM estéril a pH 7, agregando 10% de sólidos de una mezcla de polímeros (almidón modificado, maltodextrina y CPS). Al momento de la adición de los agentes encapsulantes el amortiguador fue mantenido en agitación constante con un agitador magnético estéril. Una vez añadidos los almidones la suspensión se colocó en baño maría a 80°C por 10 minutos. Se enfrió a 4°C en una parrilla de agitación refrigerada (aproximadamente 2 horas) y una vez frío, se adicionó el pellet de bacterias, se homogenizó y se tomó una muestra de forma aséptica para la evaluación de la viabilidad en esta etapa.

#### **6.2.4.3 Secado por aspersión.**

Las microcápsulas fueron obtenidas mediante el proceso de secado por aspersión en un secador Mini Spray Dryer Büchi, Modelo B-191 (Laboratoriums Technik, AG, Flawil, Switzerland). Las condiciones de secado se variaron de; temperatura de entrada de 160 a 110°C y temperatura del aire de salida de 90 a 55°C. La capacidad de la bomba de alimentación se operó entre 17 y 35 % y el porcentaje de aspiración entre 85 y 95% y con un diámetro de boquilla de 0.7 mm. Las cápsulas fueron recolectadas del cilindro recolector de la muestra para posteriormente ser almacenadas en frasco de vidrio estéril con sello hermético a 4 °C hasta su uso. Para el aseguramiento de la inocuidad del equipo se tomaron ciertas medidas de higiene como; pasar agua destilada estéril por el equipo una vez estabilizadas las condiciones de operación, así como también la utilización de agua electrolizada neutra a 40 ppm de cloro total en la desinfección de las piezas del equipo.

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

El % de viabilidad se calculó con la siguiente fórmula

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

Donde:

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

Población ME; Población del *L. lactis* microencapsulado

### **6.2.5 Curva de desarrollo de *L. lactis* UQ2 rif L+ microencapsulado.**

Se llevó a cabo el estudio del desarrollo del microorganismo microencapsulado para verificar su capacidad de adaptación al alimento en el cual es inoculado y verificar si la técnica de conservación del microorganismo fue la adecuada. De un cultivo de células microencapsuladas con una población de  $10^6$  UFC/g se tomaron 2 g de polvo y se resuspendieron en 200 ml de leche UHT con el objetivo de observar si su incorporación es adecuada y verificar la capacidad de desarrollo del cultivo microencapsulado.

### **6.2.6 Estudio de estabilidad de *L. lactis* microencapsulado.**

Se realizó un estudio de viabilidad de las microcápsulas por un periodo total de 30 días almacenadas en refrigeración a 4°C, tomando muestras al día 0, 5, 10, 20 y 30 días de almacenamiento. La cuantificación de la población se llevó a cabo bajo la técnica de Miles-Misra en agar PBC.

### **6.2.7 Morfología de las microcápsulas de *L. lactis* UQ2 rif L+**

La morfología de las microcápsulas se realizó mediante microscopía electrónica de barrido de acuerdo con la metodología descrita por Gunning *et al.*, (1999) con algunas modificaciones. Se utilizó un microscopio electrónico de

barrido (ESEM Phillips, modelo XL30, Holanda), en condiciones de bajo vacío (0.7 mBar) con un voltaje de aceleración de 15.0-20.0 kV, aproximadamente 50  $\mu$ A de corriente, un detector GSE (Gaseous Secondary Electron) y un spotsize del láser de 3.8-4.6. Las muestras de las bacterias microencapsuladas fueron fijadas en un portamuestras de aluminio con semicírculos de cinta adhesiva doble cara de grafito, expandidas por medio de aire comprimido y observadas a un aumento de 5000X.

### **6.2.8 Determinación de la actividad de nisina**

La determinación de la actividad de nisina se realizó en base a una modificación al Estándar Británico 4020, metodología descrita por Tramer y Fowler (1964).

#### **6.2.8.1 Activación de *Micrococcus luteus***

*M. luteus* proveniente de una conserva a  $-70^{\circ}\text{C}$  se coloca en un tubo con caldo assay y se incuba 48 h a  $30^{\circ}\text{C}$ . Finalizado el periodo de incubación, se siembra por estriado en un tubo inclinado y en placas con agar assay al 1% (p/v), para verificar la pureza de la cepa (González, 2009).

De la cepa aislada se toma una azada y se siembra por estriado en tubos inclinados con agar assay al 1%. Para realizar los ensayos de actividad se toma el cultivo de los tubos, diluyendo con 1 ml de solución Ringer  $\frac{1}{4}$  y se guarda en un frasco estéril; de esta solución concentrada, se toman 10, 20, 30, y 40  $\mu\text{L}$  y se llevan a 1 ml con la solución Ringer  $\frac{1}{4}$ , para ajustar la concentración del microorganismo a una absorbancia de  $0.30 \pm 0.01$ , leyendo a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 650 nm, la solución obtenida se denomina solución de trabajo.

#### **6.2.8.2 Curva estándar de nisina.**

La curva estándar de nisina se realizó preparando una solución de 100 UI/ml, para lo cual se pesaron 0.01 g de nisina (MP Biomedical, LLC) y se disolvieron en 8 ml de HCl (JT Baker) 0.02 N. Se sometió a un calentamiento de  $98^{\circ}\text{C}$  en baño

de agua por 5 min. Se enfrió a 20°C y se dejó reposar durante 2 h. Se aforó la solución a 10 ml utilizando HCl 0.02 N.

De ésta solución se hicieron diluciones decimales en HCl 0.02 N hasta obtener una concentración de 10 UI/ml. De la última solución se tomaron 10, 20, 30, 50, 70 y 90 µL y se aforaron a 1 ml con HCl 0.02 N para tener soluciones de 1, 2, 3, 5, 7 y 9 UI/ml. Las diluciones se colocaron en pozos en placas de agar inoculado con 2% v/v de la solución de trabajo de *M. luteus* y 2% de Tween 20 al 50% p/v. Las placas se incubaron a 30°C por 48 h. Después del tiempo de incubación se midieron los halos de inhibición utilizando un vernier. Se graficó el promedio de tres réplicas del halo de inhibición contra el Log de UI/ml para generar la ecuación de la recta.

#### **6.2.8.3 Tratamiento de las muestras de leche y queso.**

Las muestras de leche se colocaron en matraces de 250 ml y se les ajustó el pH a 2 con HCl 0.5 M, se colocó en un baño de agua hirviendo durante 5 min para inactivar proteasas, se enfrió rápidamente en un baño de hielo, las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 min a 4°C y se tomó el sobrenadante. Se ajustó el pH a 6.5 con NaOH 0.5 M y se ajustó a un volumen igual en todas las muestras con agua destilada a pH de 6.5, posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm por 20 min y se tomó la fase intermedia del sobrenadante para ser filtrada por una membrana con tamaño de poro de 0.45 µm para obtener el extracto de nisina.

Las muestras de 40 g de queso se disuelven en 160 ml de ácido clorhídrico 0.02 M, se ajusta el pH a 2.0 con HCl 0.5 M y se calientan en baño maría por 5 minutos cuidando que la muestra alcance 80°C, para inactivar proteasas.

Se ajustó el pH a 6.5 con NaOH 0.5 M, las muestras se llevan a un volumen final de 200 ml con HCl 0.02 M, luego se centrifugan durante 15 min a 11,000 rpm a una temperatura de 4°C. Al finalizar se forman tres fases y se toma una alícuota de la fase líquida intermedia debajo de la grasa. El sobrenadante se esteriliza mediante una membrana de poro de 0.45 µm para obtener el extracto de nisina.

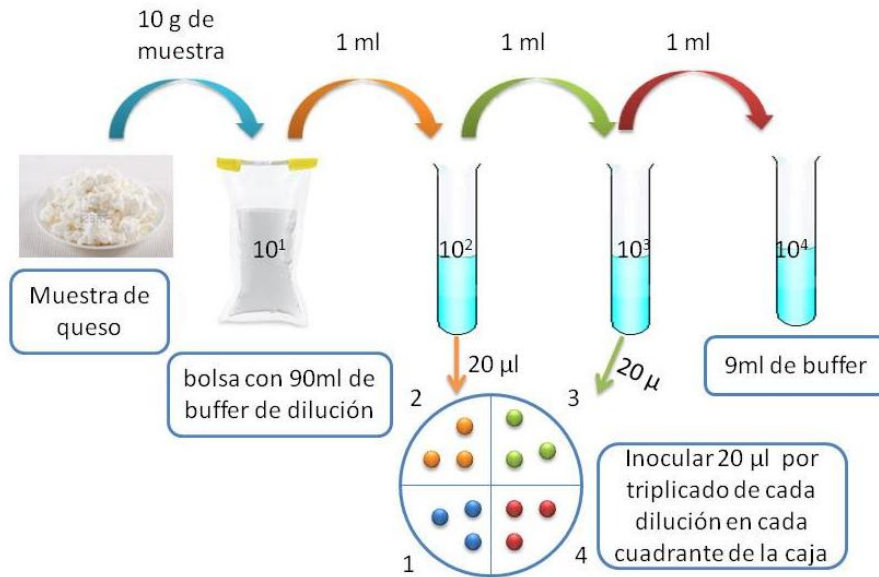
#### **6.2.8.4 Método de difusión en agar**

Las placas para la determinación de actividad se preparan con medio assay, inoculado con 2% v/v de la solución de trabajo de *M. luteus* y 2% v/v de solución Tween 20 estéril al 50%. En cada caja preparada se hacen perforaciones con un horador número 4 estéril. En cada perforación se colocan 60 µl de la dilución del extracto correspondiente, con sus respectivas replicas. Las placas inoculadas se incuban durante 48 h a 30°C, para observar la formación de halos de inhibición alrededor de los pozos. Después del periodo de incubación, se mide el halo de inhibición, siguiendo la metodología señalada en el estándar Británico (BS 4020, 1974). Para la cuantificación de nisina, la actividad antimicrobiana de los extractos se expresa en Unidades Internacionales (UI). Este valor se calcula extrapolando el halo de inhibición obtenido, en la curva de calibración, y multiplicando por el inverso de la dilución de la muestra.

#### **6.2.9 Determinación de la población de *L. lactis* UQ2 rif L+**

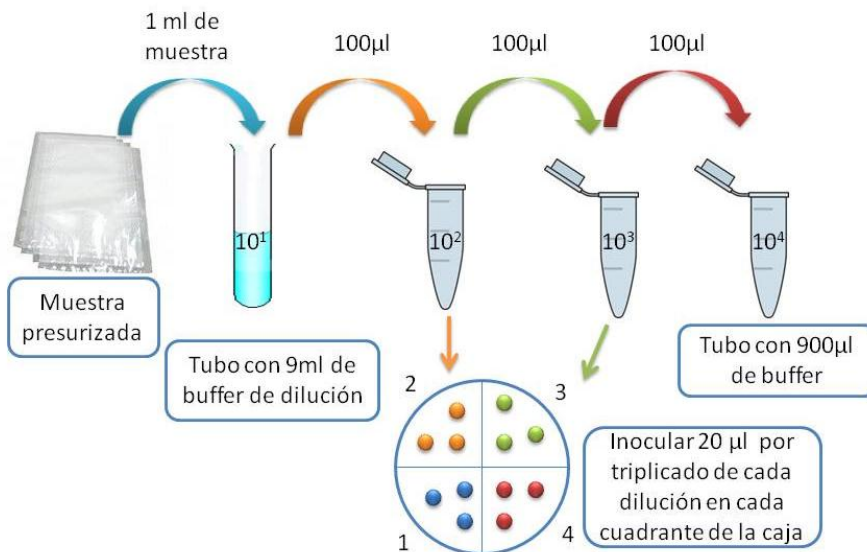
La determinación de la población se llevó a cabo por el método de Miles-Misra o método de la gota como se describe en la Figura 6. De cada una de las muestras de queso se prepararan una serie de diluciones decimales seriadas; para ello se tomaron 10 g de queso y se colocaron en una bolsa (Whirl-Pak® NASCO) con 90 ml de agua peptonada al 0.1% (p/v). Se homogenizaron en vórtex, se tomó 1 ml de la dilución anterior y se adicionó en un tubo con 9 ml de agua peptonada, se homogeniza y se repite el procedimiento hasta obtener las diluciones necesarias dependiendo de la población microbiológica esperada (Vanderzant *et al.*, 1992).

Para realizar la cuenta se colocan tres gotas de 20 µl de las diluciones correspondientes en un cuadrante de las placas de agar PBC al 1% adicionado con rifampisina y se deja secar a temperatura ambiente en la campana de flujo laminar, se incuban a 30°C y después de 24 h y 48h se procede a contar las colonias en las placas.



**Figura 6.** Técnica viabilidad de *L. lactis* UQ2 rif L+ por la técnica de Miles-Misra.

En algunas ocasiones dependiendo de la cantidad de muestra disponible y del microorganismo a determinar se realizaron microdiluciones que se basan en el fundamento explicado con anterioridad, solo que se realizan a una escala de µl como se detalla en la figura 7.



**Figura 7.** Procedimiento de elaboración de microdiluciones y técnica Miles-Misra.

### **6.2.10 Determinación de la presencia-ausencia de *Listeria*.**

Esta técnica se desarrolló bajo el procedimiento descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995. Para el enriquecimiento se inocularon 25 g de queso en 225 ml de caldo LEB (Oxoid) en bolsas (Whirl-Pak® NASCO) y se incubaron a 37°C por 48 h.

Concluido el tiempo de incubación se tomó una azada para proceder al aislamiento y se inoculó en 2 cajas con agar Oxford (Oxoid) y 2 cajas de agar LMP (BD Difco™) con suplemento antimicrobiano moxolactamo (BD Difco™). Las cajas con agar OXA se incubaron a 37°C por 48h y las cajas de LMP se incubaron a 30°C por el mismo periodo de tiempo. Se consideraron positivas las colonias negras con halo negro en agar Oxford y en agar LMP las colonias de color blanco o azul iridiscentes observadas bajo luz blanca.

Se seleccionaron cinco colonias típicas del medio de OXA y LMP y se pasaron a placas de medio ASTEL para evitar confundir las colonias aparentemente aisladas en los medios OXA y LMP ya que estas pueden estar contaminadas con flora competitiva parcialmente inhibida, invisible a simple vista en esos medios.

### **6.2.11 Caracterización fisicoquímica.**

#### **6.2.11.1 Determinación de acidez en leche**

La determinación de acidez en la leche, se llevó a cabo según lo descrito en la NMX-F-511-1988. Se titularon 20 ml de leche diluidos en 20 ml de agua con NaOH 0.1 N, utilizando fenoftaleína como indicador. La acidez se calculó como se indica en la ecuación.

$$\% \text{ de ácido láctico} = \frac{(\text{ml de NaOH gastados}) (0.009)}{\text{volumen de la muestra}} \times 100$$

$$^{\circ}D = (\% \text{ de ácido láctico})(100)$$



### 6.2.11.2 Determinación de grasa en leche

Se llevó a cabo como se describe en la NMX-F-387-1982. Se tomaron 10 ml de ácido sulfúrico (JT Baker) y se colocaron en el butirómetro evitando bañar las paredes internas del cuello; se agregaron resbalando por las paredes y sin mezclar, 11 ml de leche, inmediatamente se agregó 1.0 ml de alcohol iso-amílico (JT Baker). Se cerró con tapón de hule y se agitó para lograr la digestión completa. Se centrifugó por dos minutos a 1100 rpm y se leyó el espesor de la capa de grasa acumulada en la parte superior; la cual expresa directamente la cantidad en por ciento de la grasa contenida en la leche.

### 6.2.11.3 Determinación de acidez en muestras de queso.

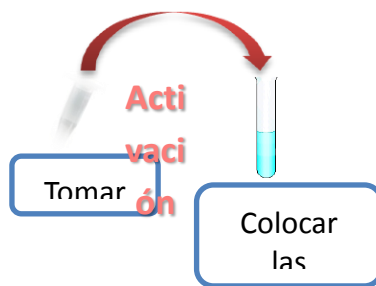
Para la determinación de acidez se maceraron 20 g de la muestra de queso correspondiente con agua tibia a 40 °C para producir un volumen total de 210 ml, posteriormente se filtró con manta de cielo. Se titularon 25 ml del filtrado anterior con NaOH 0.1 M usando fenolftaleína como indicador y la acidez se calculó como porcentaje de ácido láctico (Pearson, 1976).

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

$$^{\circ}D = (\% \text{ de ácido láctico})(100)$$

### 6.2.12 Activación de *Listeria innocua*

Se tomó un tubo con una chaquiras de *L. innocua* conservada por ultracongelación a -70°C y dicho contenido del tubo fue inoculado en 10 ml de caldo soya tripticaseína. A esta se le denomina primera activación, este se incubó a 37°C en agitación orbital a 120 rpm por un periodo de 16 horas. Cuando por efectos experimentales fueron requeridos más de 10 ml de inóculo de *Listeria* se realizó una segunda activación al 0.1% v/v proporcional a la cantidad de población necesaria.

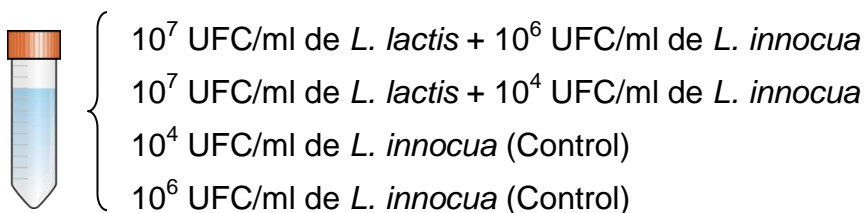


**Figura 8.** Diagrama de activación del patógeno subrogado *L. innocua*.

### 6.2.13 Efecto del cultivo protector sobre el desarrollo de *L. innocua* en queso tipo panela.

Se llevó a cabo una cinética de contacto del cultivo protector *L. lactis* UQ2 rif L+ en presencia de *L. innocua* como microorganismo subrogado de *L. monocytogenes*, esto con el objetivo de verificar si la presencia de *L. lactis* así como la producción de nisina inhiben el desarrollo de *L. innocua* en un periodo de incubación de 12 horas. Se inoculó la leche con dos diferentes concentraciones iniciales tanto del patógeno subrogado como del cultivo protector, como se describe en la Figura 9. Fue evaluada la viabilidad de ambos microorganismos por la técnica de Miles-Misra en microdiluciones, todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Se activaron las cepas; *L. lactis* 3 activaciones subsecuentes de 24, 12 y 8 horas incubadas a 30°C y la activación de *L. innocua* fue por 16 horas a 37°C en agitación a 180 rpm.



**Figura 9.** Tratamientos utilizados en la cinética de contacto de *L. lactis* contra *Listeria innocua*.

Se tomó 1 ml de muestra cada 2 horas para su análisis y 2 ml de muestra para ser almacenados en congelación por si fuese necesario repetir alguna

muestra. También se tomaron 40 ml de muestra al tiempo cero, a las 6 y a las 12 horas de la cinética para la determinación de la actividad de nisina en la cinética.

Se determinó la concentración de nisina al tiempo 0, 6 y 12 de contacto, para la extracción de nisina se tomaron 30 ml de leche y se ajustó el pH a 2 para solubilizar la nisina, posteriormente se colocó en un baño de agua hirviendo por 5 minutos para inactivar proteasas, se enfrió a 4°C y se ajustó el pH a 6.5, se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos, y la fase intermedia fue filtrada en una membrana con tamaño de poro de 0.45 µm. La concentración de nisina fue determinada por la técnica de difusión en agar.

#### 6.2.14 Efecto de altas presiones hidrostáticas sobre *L. innocua* en leche UHT

Para evaluar el efecto de las APH sobre la inhibición de *L. innocua* se realizaron tratamientos a 350 MPa y 550 MPa para las cuales se tomaron 10 ml de leche UHT y se colocaron en bolsas plásticas, posteriormente se inocularon con *L. innocua* con un nivel de inóculo de  $10^7$  UFC/ml de leche, se cerraron las bolsas en condiciones de vacío y posteriormente se llevaron a cabo los tratamientos con altas presiones. Las condiciones de operación se muestran en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Condiciones de presión y tiempo para el tratamiento de leche con APH a temperatura ambiente en la inactivación de *L. innocua*.

350 MPa	550 MPa
T <sub>0</sub>	T <sub>0</sub>
CUT	CUT
5 min	1 min
10 min	3 min
15 min	8 min
20 min	14 min
30 min	20 min

CUT= Tiempo necesario para llegar la presión especificada

Además de las condiciones descritas en el cuadro 2 se llevaron a cabo dos análisis más, el recuento del microorganismo inoculado en la leche, al que se le llamó T<sub>0</sub> y otro al que se le denominó control, este recibió las mismas condiciones

de procesamiento y empacado al vacío, se mantuvo en refrigeración en sistemas por duplicado durante todo el tiempo del análisis y se analizó por triplicado al igual que el resto de las muestras.

Seguido de esto con el objetivo de comprobar las condiciones de operación observadas se llevaron a cabo más estudios de inactivación microbiana, para lo cual se tomaron 10 ml de leche UHT y se colocaron en bolsas para empacar al vacío, posteriormente se inocularon con *L. innocua* con un nivel de inóculo de  $10^7$  UFC/ml de leche, se llevaron a cabo los tratamientos con altas presiones. Las condiciones de operación se muestran en el Cuadro 3. Lo que se pretendió con este estudio fue ampliar las condiciones de tratamiento determinadas con anterioridad y obtener más parámetros.

**Cuadro 3.** Condiciones de presión y tiempo de prueba para el tratamiento de leche por APH a temperatura ambiente en la inactivación de *L. innocua*.

350 MPa	450 MPa	550 MPa
T <sub>0</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>0</sub>
CUT	CUT	CUT
5 min	1 min	20 seg
10 min	3 min	40 seg
15 min	5 min	60 seg
20 min	7 min	90 seg
15 min	9 min	120 seg
30 min	12 min	150 seg
40 min	15 min	180 seg

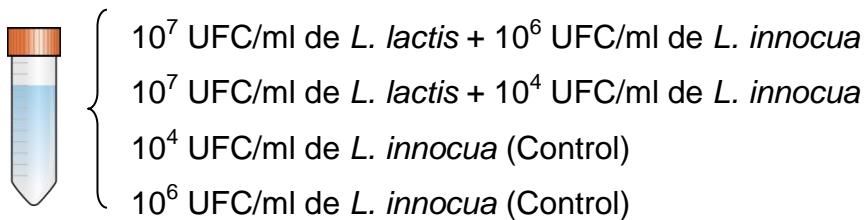
El denominado CUT (come-up-time) o tiempo de levantamiento, es decir, el tiempo que tarda el equipo en alcanzar la presión requerida se determinó con el objetivo de evaluar si éste poseía un efecto de sobre la viabilidad del microorganismo de interés. Además de las condiciones descritas en el Cuadro 3 se llevaron a cabo dos análisis más; el recuento del microorganismo inoculado en la leche al que se le llamó T<sub>0</sub> y otro al que se le denominó control, el cual las mismas condiciones de procesamiento y empacado al vacío, se mantuvo en

refrigeración durante todo el tiempo del análisis y se analizó por triplicado al igual que el resto de las muestras.

#### 6.2.15 Efecto del cultivo protector sobre *L. innocua* inoculados en leche

Se llevó a cabo una cinética del efecto de *L. lactis* UQ2 rif L+ en presencia de *L. innocua* como microorganismo subrogado de *L. monocytogenes*, con el objetivo de verificar si la presencia de *L. lactis* así como la producción de nisina inhiben el desarrollo de *L. innocua* en un periodo de incubación de 12 horas. Se inoculó la leche con dos diferentes concentraciones iniciales tanto del patógeno subrogado como del cultivo protector, como se describe en la Figura 10. Fue evaluada la viabilidad de ambos microorganismos por la técnica de Miles-Misra en microdiluciones, todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Para la activación de las cepas de *L. lactis* 3 activaciones subsecuentes de 24, 12 y 8 horas incubadas a 30°C y la activación de *L. innocua* fue por 16 horas a 37°C en agitación a 180 rpm.



**Figura 10.** Tratamientos utilizados en la cinética del efecto de *L. lactis* contra *Listeria innocua*.

Se tomó 1 ml de muestra cada 2 horas para su análisis y 2 ml de muestra para ser almacenados en congelación por si fuese necesario repetir alguna muestra. También se tomaron 40 ml de muestra al tiempo cero, a las 6 y a las 12 horas de la cinética para la determinación de la actividad de nisina en la cinética.

#### 6.2.16 Reto microbiano de *Listeria innocua* en queso con cultivo protector

Una conserva de *Listeria innocua* se colocó en caldo soya tripticaseína 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  $1 \times 10^7$  UFC/ml o UFC/g, respectivamente. El queso además de ser inoculado con *L. innocua* se incorporó el cultivo protector *L. lactis* UQ2 rif L+ con una población de  $1 \times 10^7$  UFC/ml o UFC/g de acuerdo al tipo de inóculo agregado. El procedimiento para la elaboración del queso es el mismo descrito en el punto 6.2, la única variación es que *L. innocua* y *L. 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 llevaron a cabo mediciones repetidas en el tiempo cada 7 días con un total de 4 muestreos, por un periodo total de 21 días, en donde se evaluaron como variables de respuesta la población de *L. innocua*, *L. lactis*, producción de nisina, producción de ácido láctico y pH.

#### **6.2.17 Efecto de la incorporación del cultivo protector libre en leche y microencapsulado en la elaboración de queso tipo Panela.**

El cultivo de *L. innocua* fue inoculado en la leche, a una concentración teórica de  $1 \times 10^7$  UFC/ml con un tiempo de adaptación de 30 minutos. Posteriormente se inoculó también *L. lactis* a la misma concentración del patógeno subrogado, a lo que se le denominó tratamiento 2, continuando con el procedimiento de elaboración convencional reportado por Piña, 2012. Para el tratamiento 1 se partió de la leche inoculada con el patógeno subrogado y se llevó a cabo el procedimiento general para la elaboración del queso, y al momento de la adición de la sal se agregaron las microcápsulas de *L. lactis*. Finalmente el tratamiento 3 se elaboró a partir de la leche inoculada con *Listeria*, por lo que a este tratamiento se le denominó como control.

Lis+LacME = Queso con *Listeria* y *L. lactis* microencapsulado

Lis+Lac = Queso con *Listeria* y *L. lactis* libre

Lis = Queso con *Listeria* (control)

### 6.2.18 Reto del CP con *L. innocua* en queso panela inoculado en pasta.

Se realizó nuevamente el denominado reto de bioconservación contra *L. innocua* como patógeno subrogado de *L. monocytogenes*, con la variante del paso de proceso en el que el patógeno se inoculó al sistema y la concentración inicial deseada (5 log UFC/g). En este caso, *L. innocua* se adicionó en la pasta, en la etapa de salado, al igual que el cultivo protector, esto con el objetivo de evaluar el comportamiento similar al de una contaminación post-proceso de pasteurización en el queso y no en la leche como en el caso anterior y verificar la capacidad de *L. lactis* de inhibir o atenuar el desarrollo del patógeno subrogado.

Lis+LacME = *Listeria* 10<sup>5</sup> UFC/g de pasta + *L. lactis* 10<sup>7</sup> UFC/g (Cultivo protector microencapsulado inoculado en pasta)

Lis+Lac = *Listeria* 10<sup>5</sup> UFC/g de pasta + *L. lactis* 10<sup>7</sup> UFC/g (Cultivo protector libre inoculado en leche)

Lis = *Listeria* 10<sup>5</sup> UFC/g de pasta (Control sin cultivo protector)

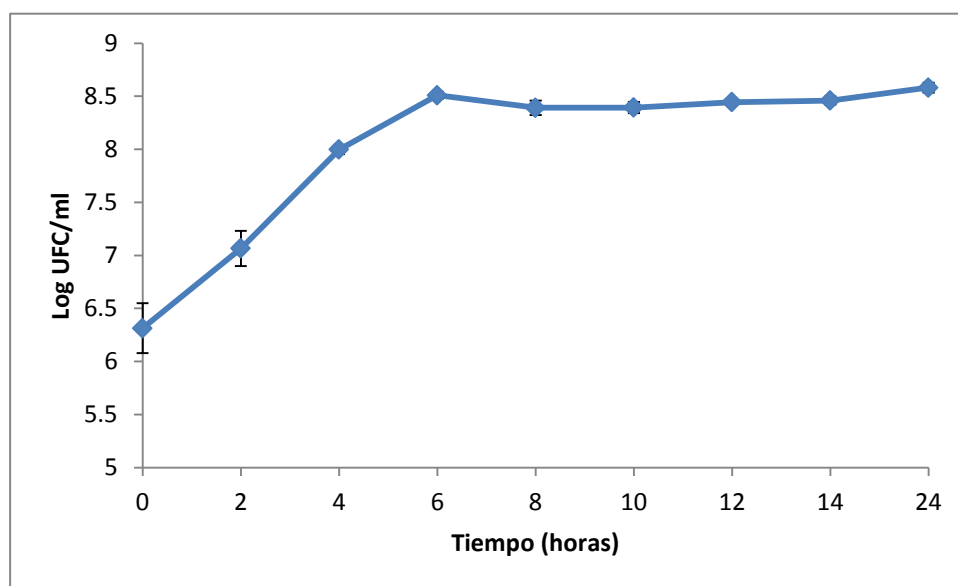
## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Microencapsulación

#### 7.1.1 Cinética de crecimiento de *L. lactis* UQ2 rif L+

En investigaciones previas (Piña, 2012) se realizaron estudios de crecimiento del cultivo protector en leche hasta la tercera activación, en la que se determinó el tiempo de incubación de *L. lactis* para ser tomado en su fase exponencial de crecimiento y este es el método de activación que se ha utilizado.

Sin embargo surgió la duda, de lo que podría suceder al inocular el cultivo protector en leche pasteurizada y del tiempo que la bacteria puede seguir creciendo en una cuarta inoculación, por ello se decidió realizar un estudio de crecimiento, inoculando 100 ml de leche pasteurizada a partir de la tercera activación con 0.1% (v/v) del tercer inóculo y monitorearla por un periodo total de 24 horas. Los resultados se muestran en la Figura 11.



**Figura 11.** Curva de desarrollo de *L. lactis* UQ2 rif L+ durante la cuarta activación en leche pasteurizada suplementada.



Los resultados de la cinética demuestran que la activación de *L. lactis* fue adecuada, ya que claramente se observa que el microorganismo no posee fase de adaptación, siendo detectado desde el tiempo cero de muestreo el microorganismo en su fase exponencial, lo que evidencia que el cultivo protector se encuentra listo para ser inoculado al alimento sin poseer decremento en su desarrollo al ser inoculado.

### 7.1.2 Microencapsulación de *L. lactis* UQ2 rif L+

En investigaciones en paralelo realizadas en el laboratorio de Biotecnología se sugirió al almidón modificado y maltodextrina como posibles materiales de pared adecuados para la obtención de microcápsulas del cultivo de *L. lactis* UQ2 rif L+, por lo que se realizaron estudios preliminares para comprobar que operativamente dichos materiales de pared mostraran un comportamiento adecuado durante el secado.

**Cuadro 4. Efecto de las condiciones de secado por aspersion y materiales de pared utilizados en la microencapsulación de *L. lactis* UQ2**

Condiciones de operación		Material de pared	Población			Rendimiento	
T <sub>entrada</sub> (°C)	T <sub>salida</sub> (°C)	Polímero	Caldo UFC/ml	Agente UFC/ml	Polvo UFC/g	Sólidos %	Viabilidad %
145±0	86.1±2.8	AM®	1.4x10 <sup>9</sup>	1.25x10 <sup>9</sup>	3.5x10 <sup>8</sup>	76	2.41
		CPS 90:10%	9.41±0.30	9.09±0.17	8.54±0.32		
165.5±9.7	79±3.3	AM®	1.1x10 <sup>9</sup>	6.5x10 <sup>8</sup>	4.0x10 <sup>6</sup>	81	0.09
		CPS 90:10%	9.04±0.01	8.81±0.42	6.60±0.41		
145±0	84.1±3.6	AM®	1.5x10 <sup>9</sup>	1.05x10 <sup>9</sup>	4.0x10 <sup>8</sup>	74	2.53
		Maltodex 50:50%	9.17±0.22	9.02±0.27	8.60±0.22		
153.18±7.8	81.3±5.3	AM®	2.6x10 <sup>9</sup>	1.33x10 <sup>9</sup>	2.5x10 <sup>7</sup>	78	0.15
		Maltodex 70:30%	9.41±0.09	9.12±0.31	7.39±0.91		

AM: Almidón modificado, CPS: concentrado de proteína de suero, maltodex: maltodextrina. Los datos se expresan como la media ± la desviación estándar de tres determinaciones.

El primer bloque de secados se realizó utilizando los materiales anteriormente señalados, las condiciones de operación y las concentraciones de los materiales utilizados se muestran en el Cuadro 4 donde además se presenta la población, el rendimiento y el porcentaje de viabilidad obtenido en cada proceso realizado.

Se determinó la población en el caldo de cultivo de la última activación, en la suspensión de almidones usados como agentes encapsulantes y por último en el polvo obtenido mediante secado por aspersión. El porcentaje de sólidos se calcula en base al rendimiento de proceso.

Se presentan los resultados de una muestra como ejemplo de los cálculos para la obtención de los resultados de rendimiento tanto para % de sólidos y % de viabilidad mostrados en el cuadro 4.

% de sólidos

$$\% \text{ de sólidos} = \frac{\text{Sólidos obtenido en el secado (g)}}{\text{Sólidos pesados para el agente encapsulante (g)}} \times 100$$

Ejemplo;

$$\% \text{ de sólidos} = \frac{15.2 \text{ g}}{20 \text{ g}} \times 100 = 76 \%$$

% de viabilidad

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Población total en el polvo}}{\text{Población total en los agentes encapsulantes}} \times 100$$

Ejemplo;

*Agentes encapsulantes*

$$1.25 \times 10^9 \frac{\text{UFC}}{\text{ml}} (200 \text{ ml}) = 2.5 \times 10^{11} \text{ UFC}$$

*Polvo*

$$4.0 \times 10^8 \frac{\text{UFC}}{\text{g}} (15.1 \text{ g}) = 6.4 \times 10^9 \text{ UFC}$$

$$\% Viabilidad = \frac{6.4 \times 10^9 \text{ UFC}}{2.5 \times 10^{11} \text{ UFC}} \times 100 = 2.416$$

Una vez demostrado que el almidón modificado y la maltodextrina presentaban un comportamiento adecuado, operativamente hablando en el proceso de secado, es decir, que durante su uso en el secador éste no se tapara y que la mezcla no gelificara en ningún momento del secado. Se decidió agregar a la formulación concentrado de proteína de suero lácteo (CPS) ya que de acuerdo a lo demostrado por Riaz y Masud, 2013, la aplicación de este compuesto en combinación con polímeros confieren una mayor protección durante el proceso de secado a altas temperaturas, ayudando así a obtener una viabilidad elevada al final de la operación.

Por lo anterior, se utilizó un diseño unifactorial para evaluar el efecto del secado por aspersión sobre la viabilidad del cultivo a encapsular, empleando en la nueva formulación del material de pared los 3 sistemas (almidón modificado, maltodextrina y CPS) en una misma formulación. Se realizó un estudio preliminar (sin células) donde se observó el comportamiento a lo largo del secado por aspersión y al momento de realizar la mezcla, las concentraciones utilizadas fueron de 60:30:10% respectivamente.

Por su parte, en el segundo bloque de experimentos de secado se realizó resuspendiendo los agentes encapsulantes en un buffer de fosfatos 0.1 mM estéril ajustado a pH de 7, el cual posteriormente fue enfriado a 4°C en una parrilla de agitación refrigerada y una vez frío se agregó el pellet de bacterias.

Aunado a esto, para este bloque, se utilizó una concentración de células 6 veces respecto al volumen de activación inicial, es decir, se inoculó 1.5 L de caldo LM17 y el pellet de bacterias se resuspendió en 250 ml de materiales de pared. Los resultados de la población de *L. lactis* UQ2 rif L+ antes y después del secado se muestran en el Cuadro 5.

De acuerdo a los resultados descritos en el Cuadro 5 se puede observar que en la población del cultivo microencapsulado obtenido a una temperatura de entrada de 110 °C presenta una diferencia estadísticamente significativa respecto al resto de las temperaturas utilizadas, siendo esta temperatura la que provee microcápsulas con mayor población al final del secado.

**Cuadro 5.** Efecto de las condiciones de secado sobre la población y rendimiento de *L. lactis* UQ2 rif L+

Condiciones de operación		Población			Rendimiento	
T <sub>entrada</sub> (°C)	T <sub>salida</sub> (°C)	Caldo UFC/ml	Agentes UFC/ml	Polvo UFC/g	Sólidos %	Viabilidad %
164±1.0	67.6±5.5	1.2X10 <sup>9</sup> 9.09±0.07	1.3X10 <sup>10</sup> 10.18±0.37	3.2X10 <sup>9</sup> 9.51±0.66 <sup>b</sup>	73.66±5.5 <sup>a</sup>	2.77±0.2 <sup>b</sup>
140±3.2	76.2±6.8	3.3x10 <sup>9</sup> 9.50±0.02	5.0x10 <sup>9</sup> 9.60±0.05	1.5x10 <sup>8</sup> 8.19±0.21 <sup>c</sup>	80.02±3.1 <sup>ab</sup>	0.048±0.01 <sup>b</sup>
125±1.6	60.5±1.5	1.1x10 <sup>9</sup> 9.0±0.21	4.3x10 <sup>9</sup> 9.63±0.08	4.1x10 <sup>9</sup> 9.61±0.02 <sup>ab</sup>	78.60±4.7 <sup>ab</sup>	3.90±0.4 <sup>b</sup>
110±0.0	57.2±4.9	2.6x10 <sup>9</sup> 9.41±0.32	3.02x10 <sup>11</sup> 11.25±1.13	6.0x10 <sup>10</sup> 10.78±0.34 <sup>a</sup>	71.63±7.25 <sup>b</sup>	21.54±4.34 <sup>a</sup>

Los datos se expresan como la media ± la desviación estándar <sup>(abcd)</sup>. Letras diferentes entre columnas indican diferencia estadísticamente significativa (p≤0.05) con la prueba de Tukey.

Por otra parte, en cuanto al rendimiento de sólidos en el proceso, el producto obtenido a partir del tratamiento realizado a 165°C presenta diferencias estadísticamente significativas (p≤0.05) respecto al resto de las muestras analizadas. Sin embargo, a pesar de que el rendimiento es mayor a temperaturas de secado mayor, el % de viabilidad se ve seriamente afectado bajo condiciones de tratamiento superiores a 125°C.

Es importante considerar que la sobrevivencia de *L. lactis* UQ2 rif L+ al proceso de microencapsulación puede ser afectada por diferentes factores, pero principalmente por la temperatura usada en el proceso de secado.

Con los resultados anteriores, se puede demostrar que la temperatura de proceso es un factor importante en la variabilidad de la población de las microcápsulas, presentando un fuerte impacto de disminución celular si son utilizadas temperaturas elevadas. De acuerdo con lo sugerido por O’Riordan *et al.*, 2001 temperaturas de entrada similares a 120°C y temperaturas de salida inferiores a 60°C son las condiciones de operación adecuadas para la obtención de la mayor sobrevivencia de las células de *Bifidobacterium* mediante secado por aspersión.

De acuerdo a lo reportado por Shahin-Zomorodi *et al.* (2011), una viabilidad adecuada comprende a viabilidades superiores a 8.0 log UFC/g. En dicho reporte se realiza la microencapsulación de *L. plantarum* donde se logró obtener una población máxima de 8.15 log UFC/g, es decir, aún la población más baja obtenida en la presente investigación es superior a lo obtenido en el artículo citado.

Por otra parte, la microencapsulación ofrece la ventaja de poder realizar la concentración de las células, de tal manera que es posible la introducción a la matriz alimentaria de pequeñas cantidades, que son imperceptibles para el consumidor, por lo que 9 log como población máxima obtenida se considera una población adecuada para su incorporación a la matriz de queso.

### **7.1.3 Actividad de agua ( $a_w$ ) en microcápsulas obtenidas por secado por aspersión.**

La  $a_w$  es una medida importante que determina la vida de anaquel de los productos ya que por encima de 0.6 de  $a_w$  los microorganismos comienzan a presentar actividad metabólica y esto es riesgoso para la conservación de los alimentos.

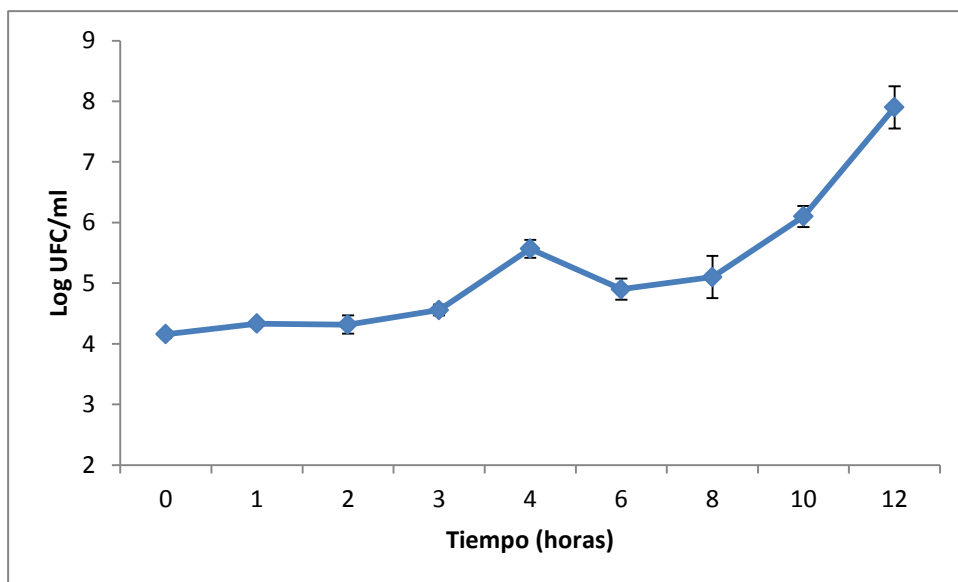
**Cuadro 6.** Resultados de la aw de microcápsulas con y sin *L. lactis* UQ2 rif L+ en un periodo de 30 días de almacenamiento.

Muestra	Actividad de agua	Temperatura (°C)
Cápsulas sin MO	0.296±0.002	23.9 °C
<i>L. lactis</i> ME	0.272±0.001	24.8 °C

La actividad de agua para las microcápsulas sin células fue de  $0.296\pm 0.006$  y para las microcápsulas de *L. lactis* fue de  $0.272\pm 0.001$  lo que implica que el microorganismo no puede tener actividad metabólica, sin embargo este se conserva viable para la producción de nisina y así permite que prevalezca por más tiempo su carácter protector. La actividad de agua en la microcápsula es un factor importante ya que como se sabe si los microorganismos se encuentran a una actividad de agua menor que la que necesitan, su crecimiento se detiene. Esta detención del crecimiento no suele llevar asociada la muerte del microorganismo, sino que éste se mantiene en condiciones de latencia durante un cierto período de tiempo que también va a depender de otros factores asociados al medio en el que éste se encuentre.

#### 7.1.4 Curva de desarrollo de *L. lactis* UQ2 rif L+ microencapsulado.

La población de las microcápsulas inoculadas en leche tras un intervalo del tiempo se presenta en la Figura 12. Se puede observar que aunque los materiales de pared utilizados poseen características completamente solubles, en este caso se presenta un retraso de 6 horas de crecimiento respecto al microorganismo inoculado a partir de su tercera activación. Esta adaptación que experimenta el microorganismo puede deberse a dos factores, uno podría ser al tiempo que le toma ser liberado de la cápsula (solubilizarse) o bien debido a las condiciones de estrés a las que fue sometido el microorganismo durante el proceso de secado.



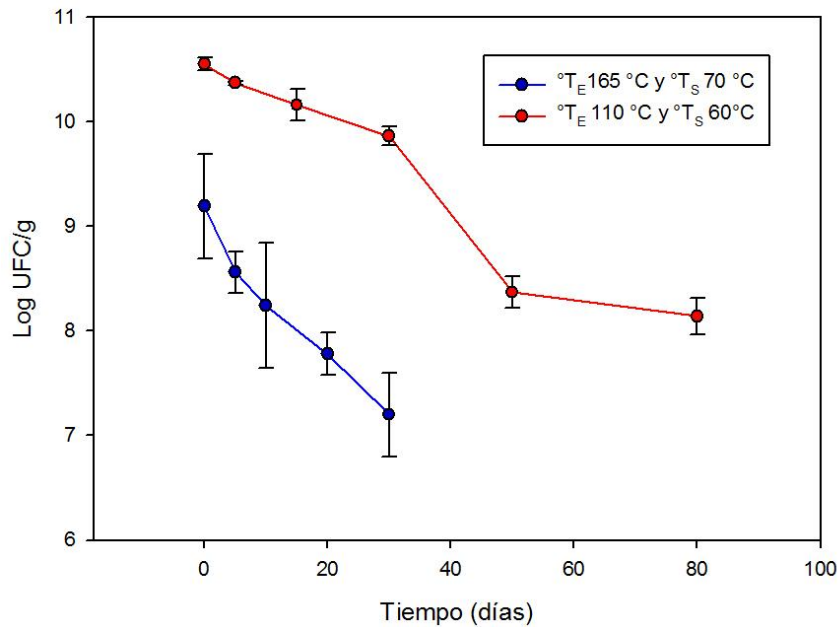
**Figura 12.** Curva de desarrollo del cultivo de *L. lactis* UQ2 rif L+ microencapsulado

De acuerdo a lo reportado por Anal *et al.*, (2007) el patrón de comportamiento del cultivo microencapsulado que se presenta en la Figura 12 refleja que la microencapsulación es adecuada, ya que el sistema de liberación de las células es lento, y esto permite que el cultivo se adapte de manera paulatina a las condiciones del alimento en el que fue incorporado.

#### **7.1.5 Estabilidad de *L. lactis* UQ2 rif L+ microencapsulado.**

Se evaluó la estabilidad de las células de *L. lactis* UQ2 rif L+ microencapsuladas mediante secado por aspersión a la temperatura más alta y más baja, ( $164 \pm 2.1$  y  $74.2 \pm 9.9$  °C /  $110$ °C y  $57.2 \pm 4.9$ ). La población del cultivo protector microencapsulado se ve seriamente afectada en los tratamientos sometidos a microencapsulación a altas temperaturas desde el inicio del estudio de estabilidad y se observa el mismo patrón de comportamiento a lo largo del periodo de estudio. Por otra parte, la población del cultivo microencapsulado a bajas temperaturas presentando una mayor estabilidad con una población de 8 log durante un periodo de 80 días de almacenamiento.

En el secado a altas temperaturas se obtuvo una disminución de la población de 1 log UFC/g a partir del día 10 y de 2 log a los 30 días, como se muestra en la Figura 13. Estos resultados son similares a lo reportado por Rodríguez *et al.* (2007), quienes reportan una reducción de 2 log de viabilidad iniciando con una población de  $1.26 \times 10^8$  UFC/g finalizando con una población de  $6 \times 10^6$  UFC/g en 30 días.



**Figura 13.** Viabilidad de *L. lactis* UQ2 rif L+ microencapsulado en un periodo de 30 días de almacenamiento a 4°C.

De acuerdo a lo reportado por Anal *et al.*, (2007) el secado por aspersión ha sido utilizado en la microencapsulación de *Lactobacilos* y *Bifidobacterias*, así como también en *L. paracasei* *Lactobacillus* y *Bifidobacterium curvatus ruminantium*, entre otras. Sin embargo, la mayoría de las bacterias microencapsuladas mediante esta tecnología no sobreviven lo suficiente en condiciones extremas de temperatura y presión osmótica a los que están expuestos durante el proceso de secado. Cuando el secado por aspersión se

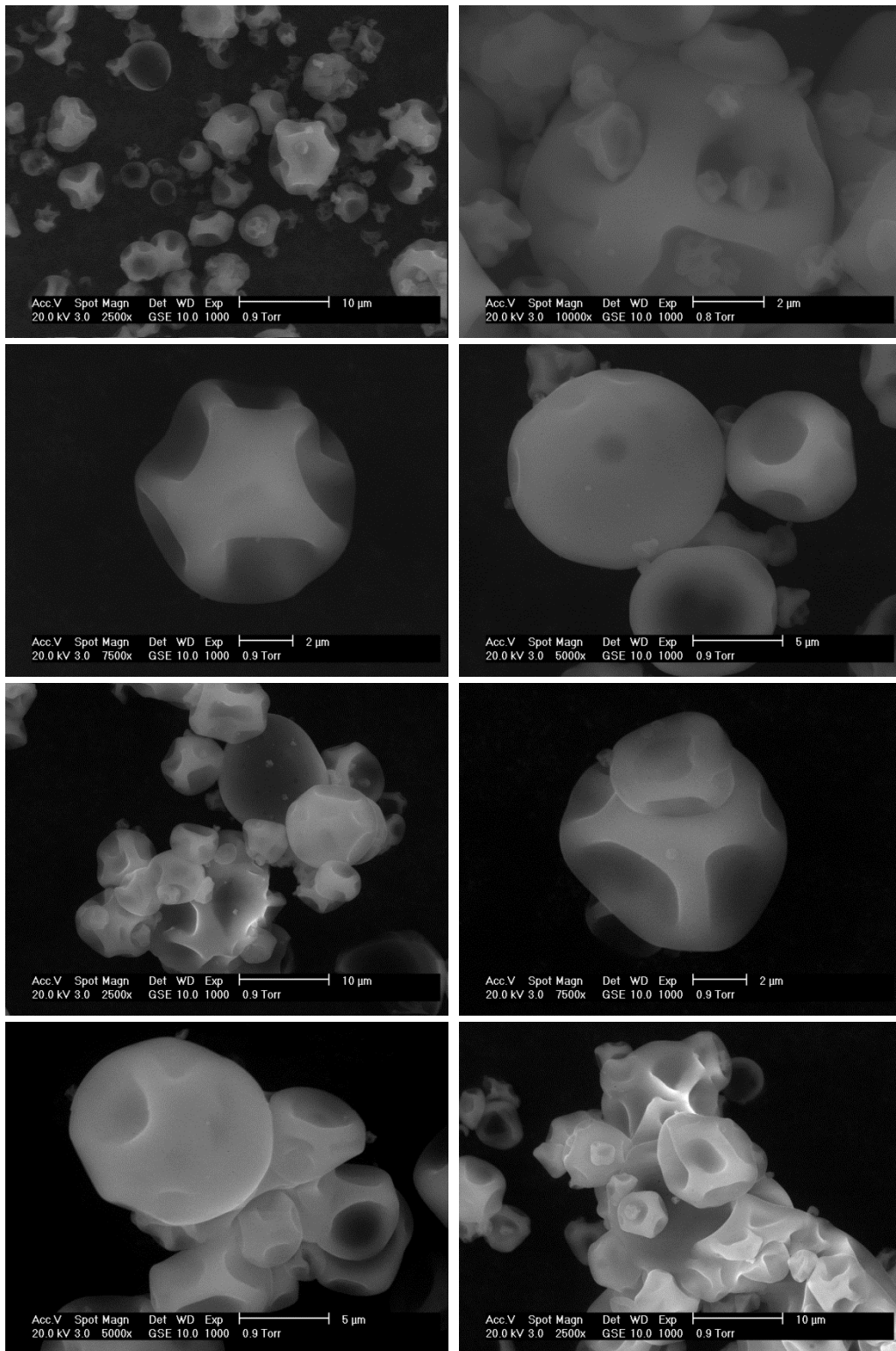


utiliza para la preservación de los cultivos, gran parte de su actividad se pierde normalmente a las pocas semanas de almacenamiento a temperatura ambiente. Esto se asocia con el estrés inducido por los cambios de temperatura, cambios de fase y el secado, una combinación que tiende a dañar las membranas celulares y las proteínas asociadas.

Un enfoque para mejorar la sobrevivencia de las células microencapsuladas es la adición de agentes termo protectores para los medios de encapsulación antes del secado. Por su parte, otros autores, (Desmond *et al.*, 2002; Crittenden *et al.*, 2001) mencionan que el principal factor para una logar una mayor estabilidad de almacenamiento de las microcápsulas, es la temperatura de proceso utilizada para su obtención. Por lo que a menores temperaturas tanto de entrada como de salida, mayor será la resistencia de los microorganismos, y la viabilidad que presentarán a lo largo de su almacenamiento.

#### **7.1.6 Microscopía electrónica de barrido de las microcápsulas de *L. lactis***

En las micrografías presentadas en la Figura 14, se puede observar que en general las microcápsulas presentan una formación esférica y homogénea con tamaños de microcápsulas que oscilan alrededor de 6 a 8  $\mu\text{m}$  de diámetro. Estos resultados son de menor tamaño que lo reportado por Jiménez-Pranteda *et al.*, (2012) quienes encapsularon *Lactobacillus plantarum* y obtuvieron tamaños de cápsulas de 2.47  $\mu\text{m}$  mediante la tecnología de extrusión. Por otra parte Rodríguez *et al.*, (2009) reportan la microencapsulación de *Bifidobacterium bifidum* mediante la técnica de secado por aspersion, y obtienen tamaños de microcápsulas 10-12  $\mu\text{m}$ .



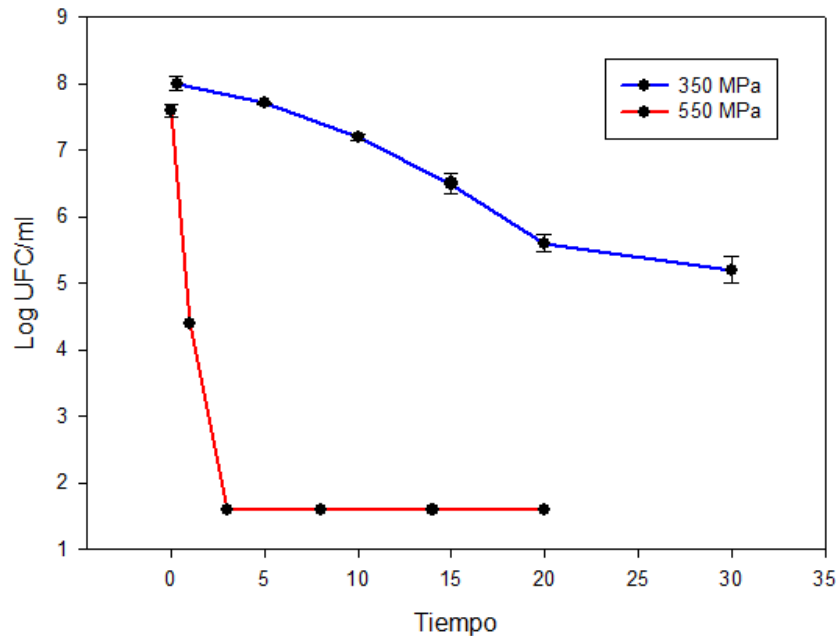
**Figura 14.** Micrografías de las microcápsulas de *L. lactis* UQ2 rif L+ obtenidas mediante secado por aspersión.

Por otra parte, es importante tomar en cuenta que en las micrografías también se pueden observar pequeñas implosiones en las cápsulas que se pueden deber al efecto de la temperatura de proceso utilizada que en este caso fueron de  $164\pm 1.0^{\circ}\text{C}$  temperatura de entrada y  $67.6\pm 5.5^{\circ}\text{C}$  de temperatura de salida.

## **7.2 Altas presiones hidrostáticas**

### **7.2.1 Cinética de inactivación de *L. innocua***

En la Figura 15 se presentan los resultados de las poblaciones de *L. innocua* tras el tratamiento de APH llevadas a cabo a 350 MPa y 550 MPa a temperatura ambiente se puede observar una disminución de 3.5 log UFC/ml a los 30 minutos de tratamiento a 350 MPa, si bien es cierto que no se logra la completa inactivación del patógeno, estos resultados presentan una mayor inactivación que lo reportado por Buzrul *et al.*, (2008), donde de igual manera se inocula *L. innocua* en su fase exponencial de desarrollo, bajo el mismo sistema alimenticio, leche UHT, los tratamientos reportados se realizaron a 400 MPa logrando una disminución de 2 log en la población del patógeno subrogado, por su parte ellos logran una inactivación de 3.5 log de *L. innocua* a los 30 minutos de tratamiento pero a una presión de 450 MPa.



**Figura 15.** Efecto del tratamiento de APH de leche sobre la inactivación de *L. innocua* a 350 MPa y 550 MPa.

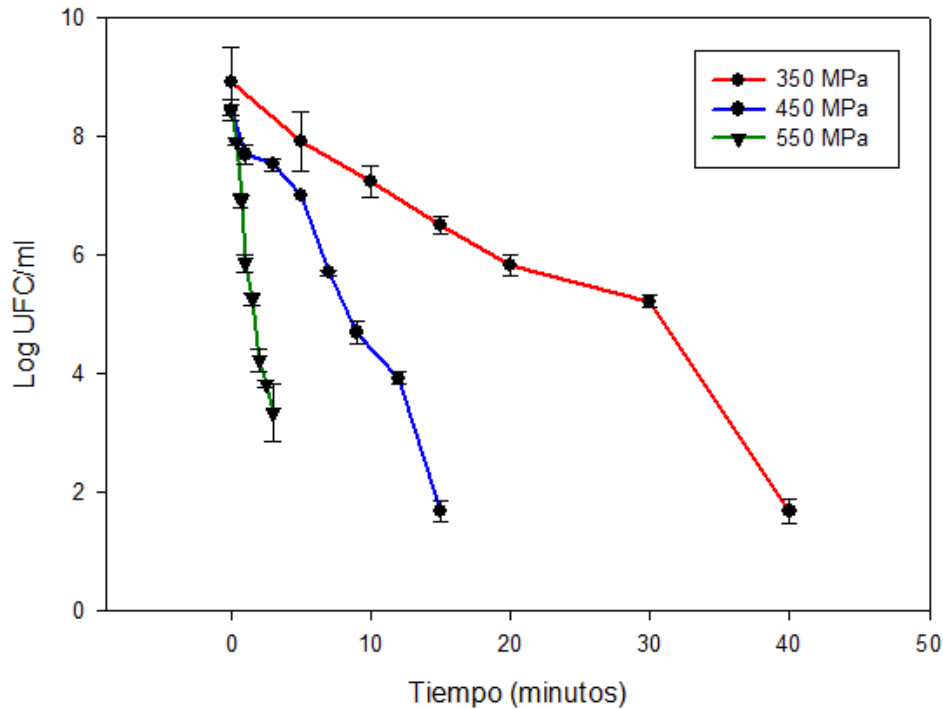
Por otra parte, los en los tratamientos de APH llevados a cabo a 550 MPa, se puede observar en la Figura 15 la inactivación del patógeno se obtiene después de 3 minutos de tratamiento, estos resultados difieren a lo reportado en cinéticas de inactivación presentadas por Buzrul *et al.*, (2008) donde a presiones de 550 MPa se logra la inactivación de 8 log de *L. innocua* en 20 min de tratamiento.

La diferencia en los tiempos de inactivación de acuerdo a lo mencionado por Black *et al.*, (2007) puede deberse al impacto baroprotector que puede ofrecer la grasa y las proteínas presentes en cada tipo de leche, estos componentes otorgan a las células microbianas una barrera de protección ante la presión. Los principales elementos que pueden proteger a los microorganismos ante los cambios de pH durante el tratamiento de las altas presiones hidrostáticas con el

fosfato y el citrato, mientras que los cationes divalentes de calcio y magnesio pueden proteger a las membranas de las células ante los tratamientos de APH.

Una vez obtenido el patrón de comportamiento del inóculo de *Listeria* en leche UHT a 350 MPa y 550 MPa de presión, se realizó la comprobación de los resultados presentados en la Figura 16, además de realizó un estudio de cinética con una presión de 450 MPa. Los resultados de las cinéticas se muestran en la Figura 17, donde se puede observar que a una presión de 350 MPa se tiene una disminución de 4 log UFC/mL a los 30 minutos de tratamiento, y obteniendo la completa inactivación del patógeno a los 40 minutos de operación de la APH.

Por otra parte los tratamientos realizados a 450 MPa generan una inactivación total de *L. innocua* a los 15 minutos de tratamiento. Ambos resultados de inactivación de 8 log de células, tanto a 350 MPa como a 450 MPa, son menores a los tiempos de disminución reportados por Buzrul *et al.*, (2008), quienes tras un tratamiento de 80 min a 450 MPa únicamente se logran la disminución de 5 ciclos logarítmicos del microorganismo subrogado. Por otra parte los tratamientos realizados a 550 MPa confirman una inactivación de 6 log UFC/ml a los 3 minutos de tratamiento.



**Figura 16.** Efecto del tratamiento de APH de leche UHT sobre la inactivación de *L. innocua* a 350, 450 y 550 MPa.

Estos resultados de inactivación son similares a lo reportado por Haiqiang, (2006), en un estudio con microorganismos patógenos encontraron una reducción de 6.7 log UFC/ml de *L. monocytogenes* bajo un tratamiento a 600 MPa durante 0.5 min a 21.5 °C. Sin embargo ellos mencionan que dicho tratamiento fue extendido por 6 min más, y únicamente se logró una inactivación adicional de 0.9 log UFC/ml. De acuerdo a lo reportado por Dongsheng *et al.*, (2005) cuando este fenómeno sucede, puede ser atribuido a que una pequeña población de bacterias son mucho más resistentes a la presión que el resto de la población, sin embargo, la razón por la que este comportamiento sucede no ha sido claramente elucidada, elucidada; una posible explicación es que probablemente una parte de la población es heterogéneamente sensible a la presión, causado por los diferentes estados fisiológicos del cultivo.

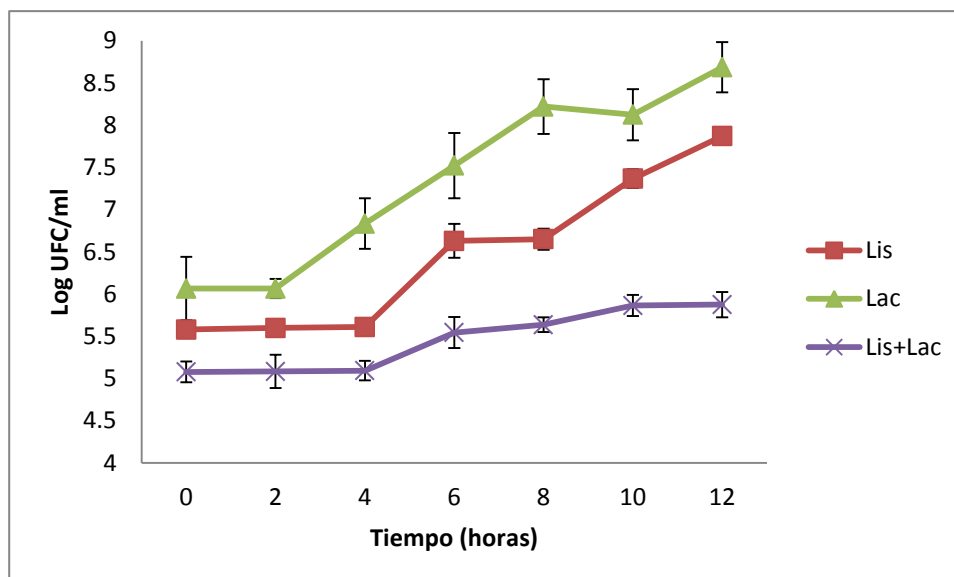
Este fenómeno indica que para obtener una completa inactivación de los microorganismos patógenos no es deseable extender el tiempo de tratamiento a altas presiones, por lo que los autores sugieren que el tiempo de tratamiento tiene una mayor significancia en la inactivación efectiva que el incremento de la presión o de la temperatura.

Es importante mencionar que en el gráfico se presenta una población mínima de 1.6 log UFC/ml debido a la sensibilidad de la técnica utilizada, Miles-Misra es una técnica que posee una sensibilidad de  $\pm 50$  células (1.6 log) es por ello que la población mínima detectada se reporta como el logaritmo de la sensibilidad de la técnica.

### **7.3 Bioconservación**

#### **7.3.1 Efecto *L. lactis* UQ2 rif L+ sobre el crecimiento de *L. innocua* en diferentes niveles de inóculo inicial de *L. innocua*.**

Originalmente el tiempo total de muestreo durante la cinética fue de 24 horas, sin embargo la apariencia de la leche no era agradable, presentando aspecto cortado por el efecto del metabolismo de las bacterias incorporadas a la muestra, por lo cual se decidió evaluar la cinética hasta las 12 horas. Los resultados de la cinética de población de *L. innocua* se presentan en la Figura 18 donde se puede observar que no existe una completa inactivación del cultivo subrogado por parte del cultivo protector a las 12 horas de contacto.

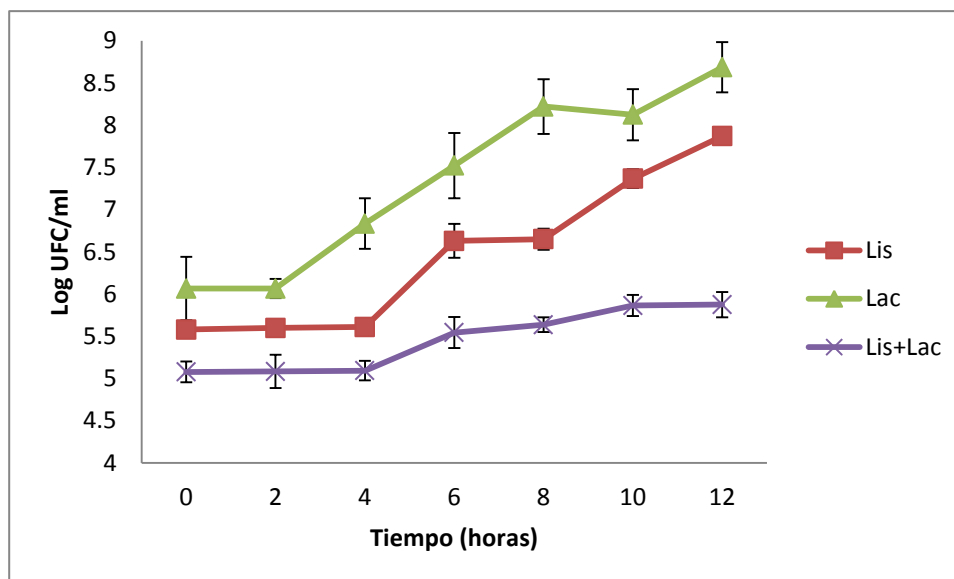


**Figura 17.** Efecto del cultivo protector sobre la población de *L. innocua* inoculada en leche a una concentración inicial de 4 log UFC/ml.

Los resultados de la cinética de *L. innocua* se presentan en la Figura 17 donde se puede observar que no existe una completa inactivación del patógeno subrogado por parte del cultivo protector a las 12 horas de contacto. Sin embargo, si existe atenuación del desarrollo del cultivo subrogado cuando éste se encuentra en contacto con el cultivo protector, debido a la producción *in situ* de la nisina.

Por otra parte, el inóculo de *L. lactis* se adaptó al sistema alimenticio ya que mostró un crecimiento sin fase de adaptación. Aunque se diseñaron los experimentos para tener una población inicial del cultivo protector de 7 log no se logró en ambos casos, Figura 17 y Figura 18.





**Figura 18.** Efecto del cultivo protector sobre la población de *L. innocua* inoculada en leche a una concentración inicial de 6 log UFC/ml

Los resultados de producción de nisina, evidencian que la inhibición de *L. innocua* que se observa en las figuras 17 y 18 se atribuye a la producción *in situ* de nisina por parte del cultivo protector. En el Cuadro 7 se demuestra que la nisina se está produciendo durante su crecimiento por lo que se considera un metabolito primario.

**Cuadro 7.** Evolución de la concentración de actividad de nisina en leche.

Tiempo de contacto (horas)	Tratamiento 1 Nisina UI/ml	Tratamiento 2 Nisina UI/ml
0	0.00±0.0	0.00±0.0
6	8.64±0.69	8.75±0.37
12	17.38±0.26	17.59±0.13

Se reporta el promedio las determinaciones realizadas cada una por triplicado ± la desviación estándar.

### 7.3.2 Efecto de la incorporación de CP libre en leche y microencapsulado en la elaboración de queso tipo panela en leche pasteurizada.

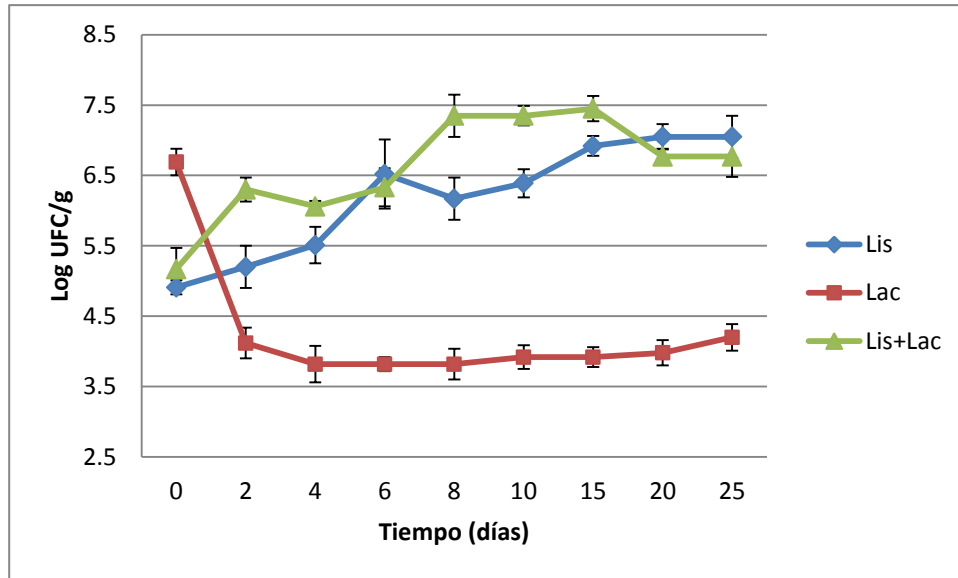
Es importante la determinación de las poblaciones máximas alcanzadas en los cultivos de trabajo, en el cuadro 8 se presentan los resultados de las poblaciones determinadas en el caldo de cultivo de *Listeria* así como también en las microcápsulas de *L. lactis* y el cultivo de la última activación en leche.

**Cuadro 8.** Población de *Listeria* y *L. lactis* previo a la elaboración del queso

Determinación	Población UFC/ml	Log UFC/ml ó g
Inóculo <i>Listeria</i> en caldo	5.5X10 <sup>7</sup>	7.74±0.14
Inóculo de <i>L. lactis</i> en leche	3.3X10 <sup>8</sup>	8.51±0.21
<i>L. lactis</i> en microcápsulas	6.3X10 <sup>7</sup>	7.79±0.18
Leche inoculada con <i>Listeria</i>	8.3 X10 <sup>5</sup>	5.91±0.09
Leche inoculada con <i>L. lactis</i>	1.0 X10 <sup>6</sup>	6.00±0.02
Pasta inoculada con <i>L. lactis</i> ME	5.0 X10 <sup>6</sup>	6.69±0.16

Se reporta el promedio las determinaciones realizadas cada una por triplicado ± la desviación estándar.

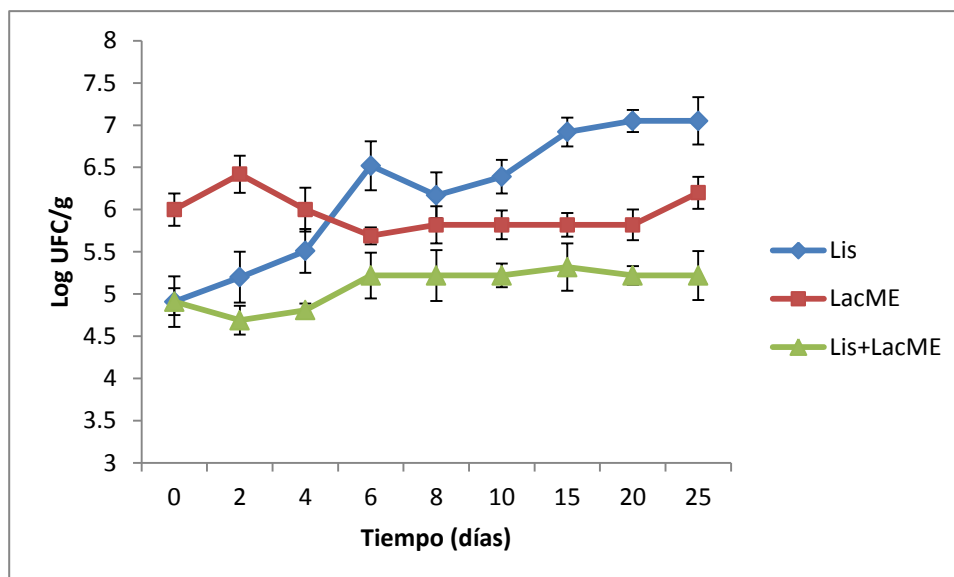
Se decidió inocular el cultivo de *Listeria* desde la leche (5 log UFC/ml), simulando una contaminación de origen y con esto verificar si el microorganismo patógeno subrogado pudiera presentar una disminución en la población por efecto de la nisina producida por el cultivo protector. En la Figura 19 se observa el comportamiento durante el almacenamiento del queso tipo panela de las poblaciones de *Listeria* y de *L. lactis* inoculados de manera individual y combinados, inoculados en la leche previo al cuajado.



**Figura 19.** Efecto del cultivo protector en forma libre sobre la población de *L. innocua* inoculada en leche.

En la figura 20 se observa el comportamiento durante el almacenamiento del queso tipo panela de la población de *Listeria* inoculada en la leche previo al cuajado; además del desarrollo del cultivo protector microencapsulado inoculado en la pasta. Finalmente, también se observa el efecto de agregar *L. lactis* microencapsulado a la pasta, sobre la población de *Listeria*.

La nisina se cuantificó cada cinco días hasta los 20 días, observándose que se incrementa durante el almacenamiento, en ambos tratamientos. Sin embargo, el proceso de microencapsulación favoreció una mayor capacidad de producción de nisina *in situ*.



**Figura 20.** Efecto del cultivo protector microencapsulado sobre la población de *L. innocua* inoculada en leche.

Este efecto antagónico puede deberse al factor de protección que le confiere la microcápsula en la que se encuentra, así como a la producción *in situ* de nisina de manera continua durante el almacenamiento (Cuadro 9). Se muestra en la Figura 20, que la población de *L. lactis* ME se mantiene alrededor de 6 log UFC/g, mientras que adicionándolo en forma libre a la leche pasteurizada, la población del CP disminuye a 3.9 log UFC/g (Fig. 19) provocando así que el cultivo subrogado *L. innocua* posea una mejor capacidad para desarrollarse.

**Cuadro 9.** Determinación de la actividad de nisina en los quesos inoculados con 7 log UFC/g del cultivo protector.

Almacenamiento (días)	Lac ME Nisina UI/g	Lac Nisina UI/g
0	8.77±0.15	0.0±0.00
5	18.2±0.65	10.7±0.02
10	28.3±0.27	17.0±0.57
15	36.2±0.11	24.8±0.32
20	73.4±1.41	44.5±0.80

### 7.3.3 Efecto del CP sobre *Listeria innocua* inoculada en pasta durante el almacenamiento del queso panela.

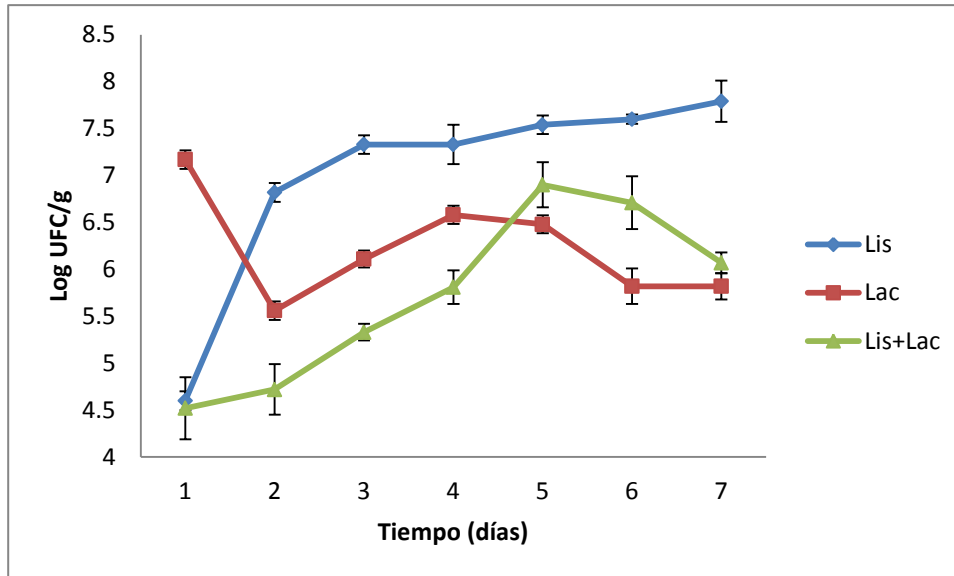
Se determinaron las poblaciones alcanzadas en los cultivos de trabajo (Cuadro 10). La inoculación del cultivo de *Listeria* en la pasta del queso, trata de simular una contaminación de postproceso y verificar así si el cultivo subrogado pudiera ser capaz de disminuir la población de *Listeria* por efecto de la nisina producida por el CP.

**Cuadro 10.** Poblaciones alcanzadas por los inóculos utilizados en caldo, leche y microcápsulas.

Determinación	UFC/ml	Log
Inóculo <i>Listeria</i> en caldo	$1.0 \times 10^7$	7.00±0.00
Inóculo <i>L. lactis</i> en leche	$5.0 \times 10^8$	8.69±0.00
<i>L. lactis</i> microcápsulas	$3.0 \times 10^9$	9.30±0.15

Por otra parte, utilizando la *Listeria* adicionada en pasta pero el cultivo protector en forma libre añadido a la leche pasteurizada (tratamiento Lis+Lac) el desarrollo del cultivo subrogado no se ve afectado incluso hasta el día 7 (Fig. 21).

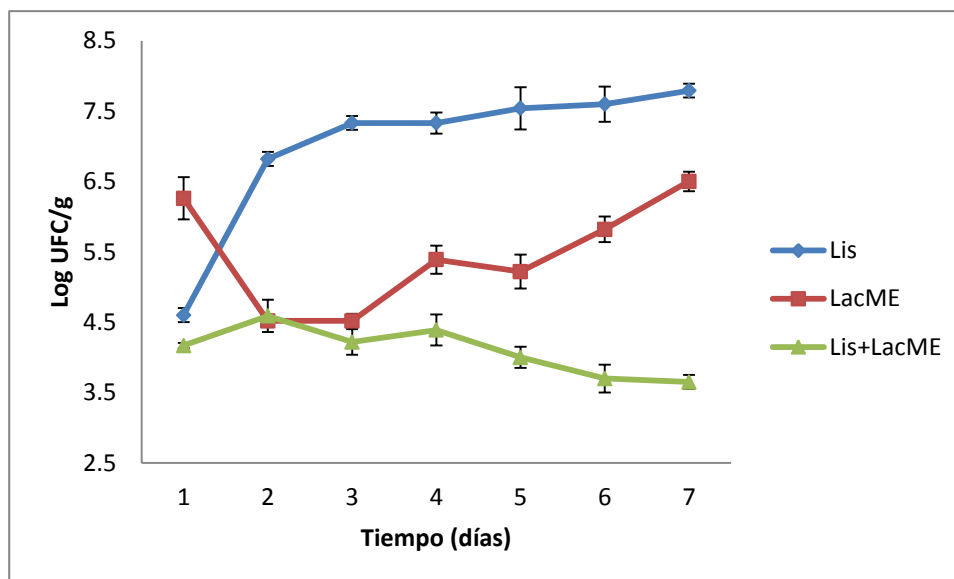
En la Figura 22 se observa el efecto del CP microencapsulado (LacME) sobre *Listeria innocua* inoculada en pasta (Lis+LacME). Se observa un desarrollo atenuado de *Listeria* en el queso. Sin embargo, no se logró una inhibición completa después de 7 días de almacenamiento, presentando una población de 3.65 log UFC/g. El cultivo subrogado utilizado como control mantiene su crecimiento durante los 7 días, alcanzando una población de 7.69 log UFC/g. La presencia del CP microencapsulado y del cultivo subrogado ambos añadidos a la pasta ocasiona un efecto antagónico más eficiente, aunque no logra inhibición completa del cultivo subrogado debido a que no se produjo *in situ* la cantidad de nisina suficiente. Alternativamente pudiera haberse agregado una población inicial mayor del CP ME para asegurar la inhibición del cultivo subrogado.



**Figura 21.** Efecto del cultivo protector inoculado en forma libre sobre la población de *L. innocua* inoculada en pasta.

Los resultados anteriores, permiten observar que la presencia del cultivo protector, en su forma microencapsulada, provee una mayor protección al alimento, si bien es cierto que la población no es inhibida en su totalidad, como lo reportado por Abarca, (2013) quien reporta una inhibición total del patógeno a los 21 días de contacto con *L. innocua* en su forma microencapsulada.

Por otra parte, la viabilidad del cultivo protector, tanto en forma libre como microencapsulada, muestran un patrón de comportamiento de adaptación al medio donde fueron inoculados, esto puede deberse a las condiciones de acidez a las que son expuestas las bacterias, en el caso específico del cultivo en forma microencapsulada, este se realizó con el lote de microcápsulas elaboradas a temperaturas de secado por aspersion 163±1.2 como temperatura de entrada y 64±4.4 como temperatura de salida.



**Figura 22.** Efecto del cultivo protector microencapsulado sobre la población de *L. innocua* inoculada en pasta.

Si bien es cierto que la población final del secado fue elevada  $4.8 \times 10^9$  UFC/g, como se observa en el estudio de almacenamiento de las microcápsulas Figura 13, entre más elevada sea la temperatura utilizada para su obtención, mayor será la pérdida de viabilidad en almacenamiento. Las células utilizadas en este reto, tenían solamente dos semanas de almacenamiento en refrigeración a 4°C, por lo que la disminución de población en las células microencapsuladas pudo ser atribuida a las temperaturas utilizadas en el proceso de obtención de las microcápsulas, o bien al tiempo de almacenamiento de las mismas.

Por otra parte, la disminución de las células en forma libre, poseen el mismo comportamiento que en el reto elaborado con las células de *Listeria* inoculadas en leche, solamente que en este caso, las células en forma libre presentan un mejor crecimiento respecto al reto anterior. Se evaluó la actividad de nisina en queso inoculado con *L. lactis* UQ2 rif L+ en forma libre y microencapsulada.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la inhibición de *Listeria* puede ser atribuida principalmente a la capacidad de producción de nisina del cultivo

protector. Los resultados de la actividad del metabolito secundario, se evaluaron por un periodo de 30 días de almacenamiento en refrigeración obteniéndose los resultados que se presentan en el Cuadro 11.

**Cuadro 11.** Actividad de nisina en los quesos inoculados con 7 log UFC/g del cultivo protector almacenados a 4°C.

<b>Almacenamiento (días)</b>	<b>LacME Nisina UI/g</b>	<b>Lac Nisina UI/g</b>
0	0.00±0.00	0.0±0.00
5	17.6±0.97	8.70±0.87
10	25.5±0.66	14.0±0.49
20	30.1±0.84	20.3±0.91
30	43.7±2.38	32.5±0.40

## 7.4 Efecto combinado de APH y bioconservación

### 7.4.1 Caracterización de la materia prima.

Se realizó la caracterización fisicoquímica y microbiológica de la leche cruda y pasteurizada de vaca, en el cuadro 12 se presentan los resultados de la evaluación fisicoquímica de leche pasteurizada comercial.

**Cuadro 12.** Caracterización fisicoquímica de leche cruda de vaca y pasteurizada comercial.

<b>Muestra</b>	<b>Acidez (°D)</b>	<b>pH</b>	<b>% grasa</b>	<b>Antibiótico</b>
Cruda	17.33±0.010	6.76±0.000	3.88 ± 0.034	Negativo
Pasteurizada	13.00±0.00	7.23±0.005	3.50 ± 0.000	Negativo

Por otra parte se realizó la evaluación microbiológica de la leche cruda y pasteurizada, los resultados obtenidos se presentan en el cuadro 13.



**Cuadro 13.** Caracterización microbiológica de leche cruda de vaca y pasteurizada comercial

Microorganismos	Leche cruda	Leche pasteurizada
Organismos Mesófilos Aerobios	9.16±0.21 Log UFC/ml	3.15 Log UFC/ml
Hongos y levaduras	10.00±0.00 Log UFC/ml	1 Log UFC/ml
Coliformes	6.25±0.020 Log UFC/ml	< 0.1 Log UFC/ml
<i>S. aureus</i>	7.52±0.053 Log UFC/ml	< 1 Log UFC/ml
<i>Listeria spp.</i>	Presencia en 25 ml	Ausencia en 25 ml
<i>Salmonella spp.</i>	Ausencia en 25 ml	Ausencia en 25 ml

Si bien es cierto que no existe una Norma Oficial Mexicana vigente para el establecimiento de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos en leche cruda entera de vaca, se decidió realizarla para determinar las concentraciones microbiológicas iniciales con las que se planeaba trabajar. Por su parte para la leche pasteurizada, se consideró apta para su uso como materia prima en la elaboración del producto ya que cumplió con las especificaciones de la NOM-243-SSA1-2010.

#### **7.4.2 Efecto combinado de APH y bioconservación en leche UHT sobre el desarrollo de *L. innocua*.**

Se realizaron tratamientos de APH y su efecto combinado con la bioconservación, donde además de evaluar el efecto de disminución de la población de *Listeria* por el efecto combinado se buscó verificar si *L. lactis* UQ2 rif L+ poseía características de barorresistencia, conferidas probablemente por el sistema en el que se encuentra microencapsulado, en comparación con las células en forma libre, además de verificar si al inocular la leche con *L. lactis*, por efecto de la producción de nisina, la población de *Listeria innocua* disminuye en condiciones no extremas de tiempo y presión.

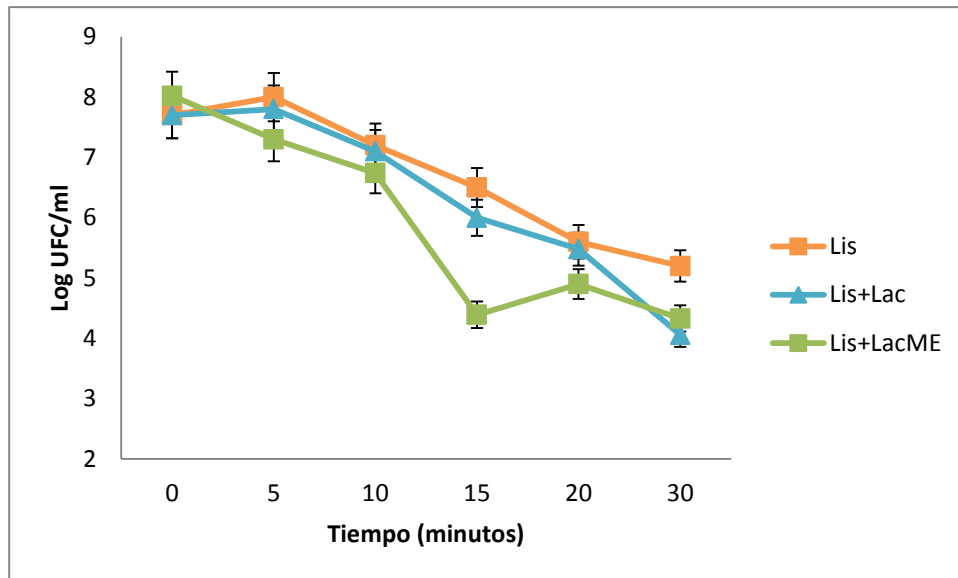
De manera general, se debe mencionar que las muestras de leche inoculadas con *L. lactis* microencapsulado, al final del tratamiento de APH, presentaron una coloración amarillenta, mucho más notable en los tratamientos

realizados a 550 MPa, haciéndose evidente también el precipitado de partículas, aparentemente almidones. Esto puede ser atribuido al material que es usado para la encapsulación del microorganismo.

Los análisis microbiológicos realizados a las muestras inoculadas con *L. innocua* presentaron diferencias a los encontrados en las muestras inoculadas con ambos microorganismos (*L. innocua* y *L. lactis*) como se muestra en la Figura 23, estas diferencias pueden deberse a que al inocular las muestras con *L. lactis*, se disminuye potencialmente el crecimiento de *L. innocua*, esto por la capacidad del cultivo protector de sintetizar la nisina.

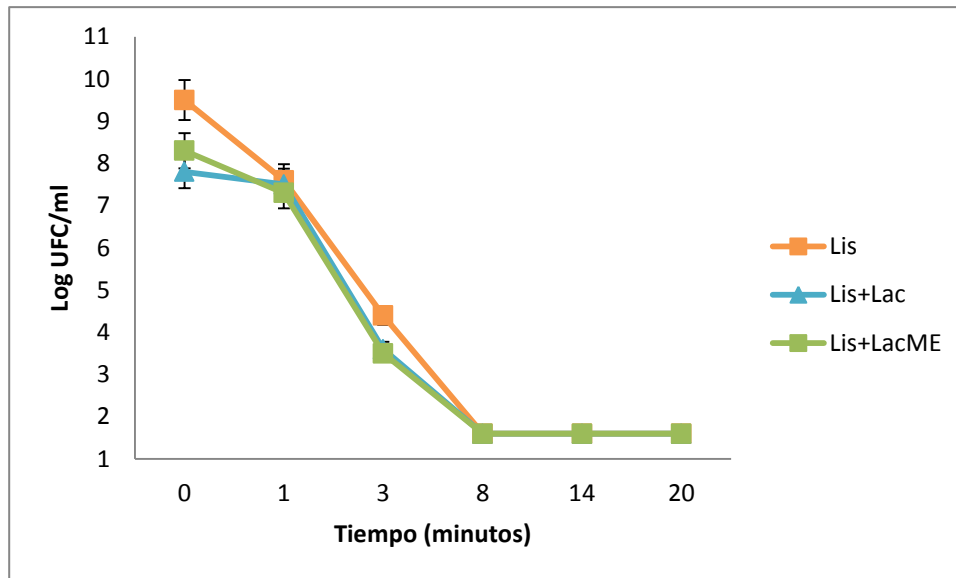
Se sabe que la nisina es una bacteriocina asociada al crecimiento (Mireau *et al.*, 2005), por lo tanto, se presume que al inocular la muestra de leche, con una concentración de inóculo ( $10^6$  UFC/ml), ya se tiene una cierta cantidad de la bacteriocina, capaz de actuar sobre el microorganismo de interés, sin embargo, estas pequeñas concentraciones no es posible detectarlas, debido a la sensibilidad del método de cuantificación empleado en este estudio.

La nisina en bacterias Gram-positivas, como *Listeria*, actúa a nivel de la membrana perturbando la movilidad iónica, inhibiendo la capacidad de captar los aminoácidos y causando liberación de aminoácidos acumulados (Gujarathi *et al.*, 2008). La acumulación de nisina en la monocapa externa de lípidos de la membrana, conduce a la agregación de nisina en monómeros, seguido de la formación de estructuras porosas de corta duración, provocando que el microorganismo sea más susceptible a los tratamientos de altas presiones, y puedan ser inactivados con presiones menores y en tiempos más cortos. (Elaine *et al.*, 2005)



**Figura 23.** Efecto del tratamiento de APH a 350 MPa y su efecto combinado con bioconservación sobre la población de *L. innocua*.

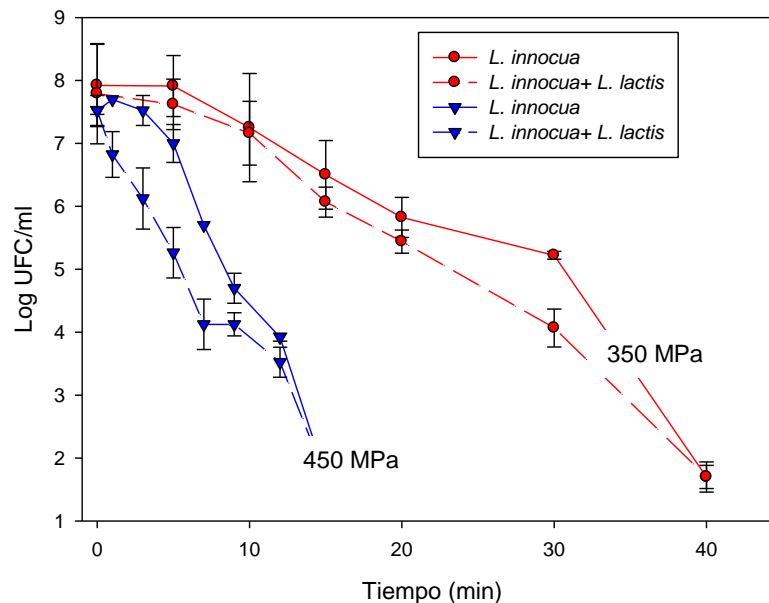
En la Figura 23, se muestra una reducción en la población de *L. innocua* desde el inicio del tratamiento, ya que la nisina producida por la adición del cultivo protector *L. lactis* UQ2 rif L+, evita el desarrollo de la población inicial de *Listeria* que será sometida a tratamiento de APH. Además de la reducción inicial de la población de *Listeria*, se observa una mayor disminución de población en los tratamientos llevados a cabo en combinación con APH y bioconservación que en los elaborados solo por la tecnología de APH.



**Figura 24.** Efecto del tratamiento de APH a 550 MPa y su efecto combinado con bioconservación sobre la población de *L. innocua*.

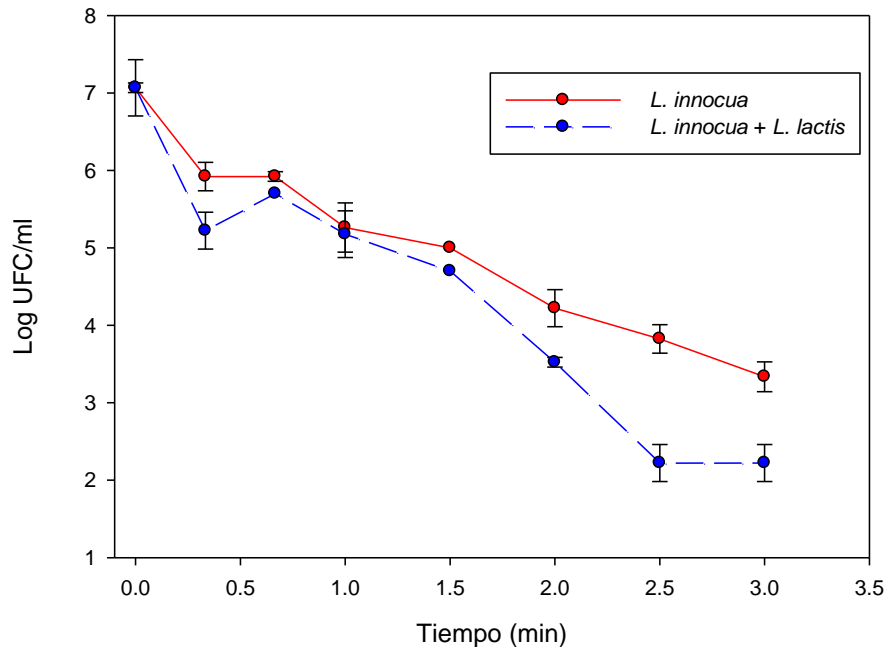
Debido al efecto de inhibición similar observado en leche pasteurizada con el microorganismo en forma libre y microencapsulado, se decidió trabajar con el microorganismo libre en la etapa previa al tratamiento de altas presiones, ya que a pesar de que los agentes encapsulantes utilizados en el secado de *L. lactis* poseen características hidrofílicas, la liberación y producción de nisina del microorganismo es paulatina, y no inmediata como cuando el microorganismo es adaptado e inoculado en leche.

La Figura 25, muestra que entre mayor sea la presión y el tiempo de exposición al tratamiento, mayor será la inactivación microbiana, observándose que una inhibición de 4 log de listeria a 450 MPa por el efecto únicamente de la presión se logra en 12 minutos, y en 8 minutos por el efecto combinado. Esta misma reducción de 4 log, se logra a 350 MPa pero en un tiempo de 35 minutos por el efecto únicamente de la presión, y en 30 minutos por el efecto combinado. Lo que esta figura nos deja claro es que a mayor presión utilizada mayormente visible es el efecto combinado de las altas presiones y el cultivo protector.



**Figura 25.** Efecto del tratamiento de APH y su efecto combinado con bioconservación sobre la población de *L. innocua*.

Estos resultados poseen el mismo patrón de comportamiento que los obtenidos en la Figura 26, donde con la línea continua se representa la *Listeria*, y la línea punteada representa la *Listeria* en contacto con *L. lactis* y se observa que tras un periodo de tratamiento a 550 MPa por 3 minutos, no se logra la inactivación del patógeno subrogado, sin embargo, mediante el efecto combinado se logra la inactivación a los 2.5 minutos de tratamiento, lo que no es posible lograr únicamente con el efecto de las altas presiones hidrostáticas.



**Figura 26.** Efecto del tratamiento de APH a 550 MPa y su efecto combinado con bioconservación sobre la población de *L. innocua*.

Resultados similares a estos efectos encontraron Elaine *et al.*, (2005) en un estudio realizado en leche para la inactivación de *E. coli* O157:H7 y *Pseudomona fluorescens* por medio del efecto combinado de las altas presiones hidrostáticas y la adición directa de 500 UI de nisina, en donde se encontraron reducciones hasta de 4.5 log más cuando se usaron estos dos métodos en conjunto que cuando se utilizaron las APH por si solas.

#### 7.4.3 Determinación del tiempo de adaptación de *L. lactis* en leche previo al tratamiento APH

De acuerdo a los resultados previos del uso de altas presiones hidrostáticas y bioconservación, en los cuales se determinó que existe un efecto combinado de ambas tecnologías sobre la disminución de la población de *Listeria*, logrando mejores efectos de decremento en la sobrevivencia del patógeno subrogado, cuando las tecnologías son utilizadas de manera conjunta, que cuando son

usadas de manera individual. Además se observó un efecto de disminución inmediato en la población de *L. innocua* por acción del cultivo protector. Por lo que se decidió determinar el tiempo de contacto del patógeno subrogado con el cultivo protector, previo al tratamiento de altas presiones hidrostáticas.

Se evaluaron 2 tiempos de contacto; 30 y 45 minutos, en los cuales se determinó la población de *L. lactis* por la técnica de Miles-Misra, el pH de la leche, la acidez y la actividad de nisina por la técnica del estándar británico en ambos tiempos de contacto en leche.

**Cuadro 14.** Evaluación del tiempo de contacto de *L. lactis* en leche previo al tratamiento de altas presiones hidrostáticas.

Parámetro	Leche cruda	30 minutos	45 minutos
pH	6.57	6.34	6.33
Acidez	17.33±0.09	17.93±0.02	18.01±0.04
Población	N/A	9.4±0.2 Log UFC/ml	9.2±0.0 Log UFC/ml
Nisina	N/A	8.77±0.3 UI	8.74±0.6 UI

De acuerdo a los resultados anteriores se determinó que el tiempo de contacto a utilizar en los experimentos posteriores será de 30 minutos, debido a que ambos tiempos de contacto son estadísticamente iguales, tanto en la población del cultivo protector así como la producción de nisina, por lo que por efectos de factibilidad se utilizará el tiempo de 30 minutos, ya que una concentración de nisina de 8.77 UI son suficientes para presentar un efecto en la inhibición de microorganismos.

#### **7.4.4 Efecto combinado APH y bioconservación en leche cruda entera de vaca a 600 MPa**

Una vez determinado el tiempo de contacto se procedió a realizar los tratamientos de altas presiones hidrostáticas a una presión de 600 MPa, determinado en una investigación desarrollada en paralelo, Alcántara (2013) como la mejor condición para inactivar 7 log UFC/ml de *L. innocua* como

microorganismo subrogado de *L. monocytogenes*. Se determinó la población de *Listeria* mediante tres técnicas microbiológicas; Miles-Misra, extensión en superficie y la técnica de la Norma Oficial Mexicana. Además de los tiempos establecidos para la determinación de *Listeria* se determinó la población del patógeno a la leche cruda (contaminación de origen) a la leche recién inoculada y a la leche 30 min después de ser inoculada con *L. lactis* como cultivo protector.

**Cuadro 15.** Diferentes técnicas de evaluación microbiológica sobre el efecto combinado de APH y bioconservación en la población de *L. innocua*.

Tratamiento	Miles-Misra UFC/ml	Extensión en superficie	NOM-143-SSA1- 1995
Leche cruda	$2.1 \times 10^3$	$3.3 \times 10^3$	Presencia
Leche inoculada	$3.3 \times 10^9$	$8.5 \times 10^9$	Presencia
Fin adaptación	$2.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$	Presencia
CUT	$5.0 \times 10^6$	$2.5 \times 10^7$	Presencia
3 min	$1.6 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$	Presencia
6 min	$5.0 \times 10^3$	$1.0 \times 10^4$	Presencia
9 min	<50	<10	Ausencia
12 min	<50	<10	Ausencia

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante los tratamientos combinados de altas presiones hidrostáticas y bioconservación se puede observar que tras el efecto únicamente de la bioconservación, existe una disminución de 2 log UFC/ml en la población de *Listeria*. Esta reducción del microorganismo patógeno subrogado se asocia a la producción de nisina por parte del cultivo protector, la cantidad del metabolito secundario detectado por la técnica de difusión en agar, fue de  $10.72 \pm 0.45$  UI/ml.

Además de la reducción asociada al efecto de la bioconservación se presenta una reducción en la población del patógeno subrogado por efectos del CUT (come-up-time) o tiempo de levantamiento, es decir, el tiempo que tarda el equipo en alcanzar la presión requerida. Estos resultados de inhibición del patógeno difieren a lo reportado por Hoover *et al.*, 2002 donde se logra una reducción de 7 log de *L. monocytogenes* mediante el efecto combinado de altas



presiones hidrostáticas y temperatura a 400 MPa de presión, y 50 °C de temperatura por 12 minutos de tratamiento, mientras que la inactivación del patógeno se logra a 500 MPa de presión, 22 °C de temperatura por 35 minutos de tratamiento.

#### **7.4.5 Efecto combinado de APH y bioconservación en la inactivación de *L. innocua*.**

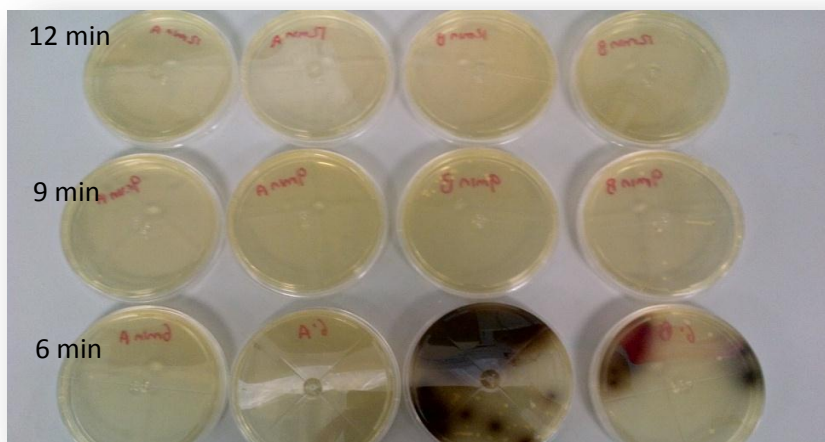
Con la finalidad de comprobar la disminución del tiempo de tratamiento por el efecto combinado, respecto a los tratamientos realizados únicamente por altas presiones hidrostáticas se realizaron nuevamente corridas experimentales para ser determinadas por la técnica de la norma oficial mexicana NOM-143-SSA1-1995. La disminución al tiempo de tratamiento propuesto por Alcántara, 2013 (600 MPa por 12 min a temperatura ambiente) se evaluó usando tres diferentes experimentos realizando las evaluaciones por duplicado y los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro 16.

Los resultados obtenidos en la determinación de presencia-ausencia de *Listeria* por la técnica de la norma oficial mexicana se presentan en el cuadro 16 donde se puede observar claramente que el efecto combinado ayuda a disminuir el tiempo de tratamiento establecido por Alcántara, 2013.

**Cuadro 16.** Determinación de Presencia-Ausencia de *L. innocua* en leche cruda entera de vaca por la técnica de la NOM-143-SSA1-1995.

<b>Tratamiento</b>	<b>Altas presiones hidrostáticas</b>	<b>Efecto combinado</b>	<b>Efecto combinado</b>	<b>Efecto combinado</b>
CUT	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
3 minutos	Presencia	Presencia	Presencia	Presencia
6 minutos	Presencia	Presencia	Ausencia	Ausencia
9 minutos	Presencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
12 minutos	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Estos resultados sustentan la teoría del que los tratamientos combinados son más eficientes en la eliminación del patógeno subrogado en comparación con los tratamientos únicamente de altas presiones hidrostáticas. En la figura 27 se presentan los resultados de la técnica de la NOM-143-SSA1-1995 donde se puede observar que en algunas cajas inoculadas con el tratamiento por 6 minutos presenta ausencia, sin embargo en algunas otras su resultado es presencia, por lo que al no ser consistente, dicho tratamiento fue descartado como un tratamiento factible para su utilización en el tratamiento de eliminación de *L. innocua* en leche tratada por altas presiones hidrostáticas y bioconservación.



**Figura 27.** Determinación de presencia-ausencia de *L. innocua* inoculada en leche por NOM-143-SSA1-1995.

#### **7.4.6 Determinación del rendimiento en queso elaborado con leche sometida al tratamiento de APH**

Los resultados del rendimiento en la elaboración de queso con leche tratada por altas presiones hidrostáticas se muestran en el Cuadro 17 donde se puede observar el evidente incremento del rendimiento en la elaboración del queso. La SAGARPA reporta como máximo 13% de rendimiento en la elaboración de queso panela elaborado a partir de materia prima sin la adición de sólidos de leche. Adicionalmente, se realizó el tratamiento de 550 MPa a dos temperaturas,

observándose que el aumento de la temperatura disminuyó notablemente el rendimiento. Es evidente que el efecto de la temperatura en el tratamiento de APH repercute directamente en el rendimiento del producto. Se observa una tendencia directamente proporcional del rendimiento y la presión utilizada para los tratamientos, es decir, entre mayor es la presión, mayor es el incremento en el rendimiento del producto.

**Cuadro 17.** Rendimiento en la elaboración de queso con leche tratada por altas presiones hidrostáticas.

<b>Tratamiento</b>	<b>Rendimiento</b>
350 MPa 22°C	21.4±2.7 %
450 MPa 22°C	23.6±1.9 %
550 MPa 22°C	24.2±2.3 %
550 MPa 45°C	17.9±1.2 %
600 MPa 22°C	29.2±0.7 %

Dichos resultados de incremento del rendimiento ya habían sido observados por diversos autores, que si bien es cierto el fundamento por el cual esto sucede, no ha sido claramente elucidado, se tienen algunas teorías para fundamentar dicho comportamiento en el rendimiento en la elaboración de quesos a partir de leche tratada por altas presiones hidrostáticas.

Barbosa-Cánovas *et al.*, (2012); Voigt *et al.*, (2010) y Needs *et al.*, (2000) concuerdan que dicho rendimiento puede ser asociado a que las proteínas del suero se desnaturalizan a presiones superiores a 100MPa para la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -lg) y a presiones de 400MPa para la  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$ -la). Lo que ocasiona que dichas proteínas del suero de la leche se incorporen a la cuajada, logrando así obtener mayor cantidad de proteína en el queso. Otra de las teorías que proponen los autores mencionados, es que el incremento en el rendimiento se debe a la fragmentación de la k-caseína en unidades menores, resultando en una rápida agregación de las micelas y una formación de una cuajada más estable.

## **7.5 Efecto combinado de APH y bioconservación bajo condiciones de tratamiento sub-letales en la viabilidad de *Listeria*.**

Se llevaron a cabo tratamientos por APH en leche pasteurizada inoculada con *L. innocua* y su efecto combinado con bioconservación mediante la adición del cultivo protector *L. lactis* UQ2 rif L+

### **7.5.1 Efecto combinado bajo tratamiento de APH a 450 MPa por 10 min a temperatura ambiente.**

Se determinaron las concentraciones de *L. innocua* recién inoculada en leche, en leche con 30 min de reposo y a los 60 min de reposo pero con 30 min de contacto con *L. lactis*. Seguido de esto se llevó a cabo el tratamiento de APH.

Los resultados de cada una de las determinaciones se muestran en el cuadro 18, se puede observar que la población del microorganismo patógeno subrogado no se ve afectada por la presencia del cultivo protector, es decir, no se observa diferencia en la población de *Listeria* al finalizar el periodo de adaptación de ambos microorganismos, esto se encuentra fuertemente asociado a la producción de nisina por parte del cultivo protector, que no logra ser detectada en ningún punto del periodo de adaptación.

Lo que es importante mencionar de los resultados presentados en el cuadro 18 es la población que ingresa al tratamiento de APH, ya que la población máxima alcanzada en cualquiera de los sistemas no fue mayor a 5 log dando esto como resultado una fácil inactivación del microorganismo patógeno subrogado encontrándose la población residual al tratamiento de APH por debajo del límite de detección de la técnica de Miles-Misra, los resultados de las poblaciones menores a 50 UFC/g de queso fueron comprobados por la técnica de la NOM, obteniéndose la presencia del microorganismo de interés tanto en los tratamientos del efecto combinado, así como en el tratamiento control.

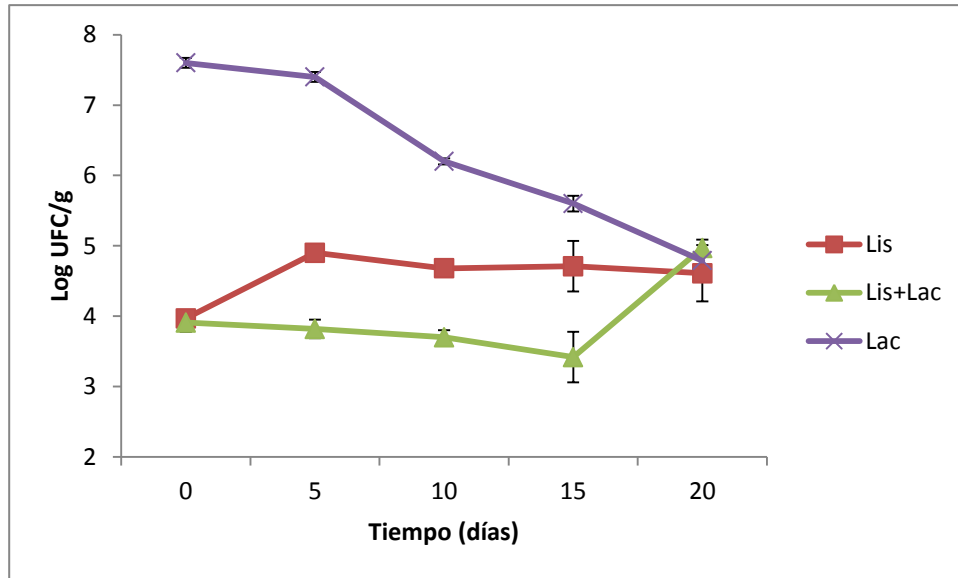
**Cuadro 18.** Efecto del cultivo protector sobre *L. innocua* previo al tratamiento de APH a 450 MPa por 10 min a temperatura ambiente.

TRATAMIENTO		TIEMPO DE CONTACTO			LECHE TRATADA APH	
Trata	M.O.	T <sub>0 min</sub>	T <sub>30 min</sub>	T <sub>60 min</sub>	M-M	NOM
<i>L. lactis</i> libre	<i>Listeria</i>	7.3X10 <sup>5</sup>	7.3X10 <sup>5</sup>	7.3X10 <sup>4</sup>	<50	Presencia
		5.86 log	5.86 log	4.86 log		
<i>L. lactis</i> ME	<i>Listeria</i>	N/A	N/A	2.8X10 <sup>7</sup>	N/A	N/A
				7.45 log		
<i>L. lactis</i> ME	<i>Listeria</i>	4.6X10 <sup>3</sup>	4.6X10 <sup>3</sup>	2X10 <sup>3</sup>	<50	Presencia
		3.6 log	3.6 log	3.3 log		
Control	<i>Listeria</i>	N/A	N/A	2.5X10 <sup>7</sup>	N/A	N/A
				7.39 log		
		4.6X10 <sup>3</sup>	4.6X10 <sup>3</sup>	9.1X10 <sup>3</sup>	<50	Presencia
		3.6 log	3.6 log	3.9 log		

Trata=Tratamiento; ME= Microencapsulado; N/A= No aplica; M-M=Miles-Misra; NOM=Norma Oficial Mexicana.

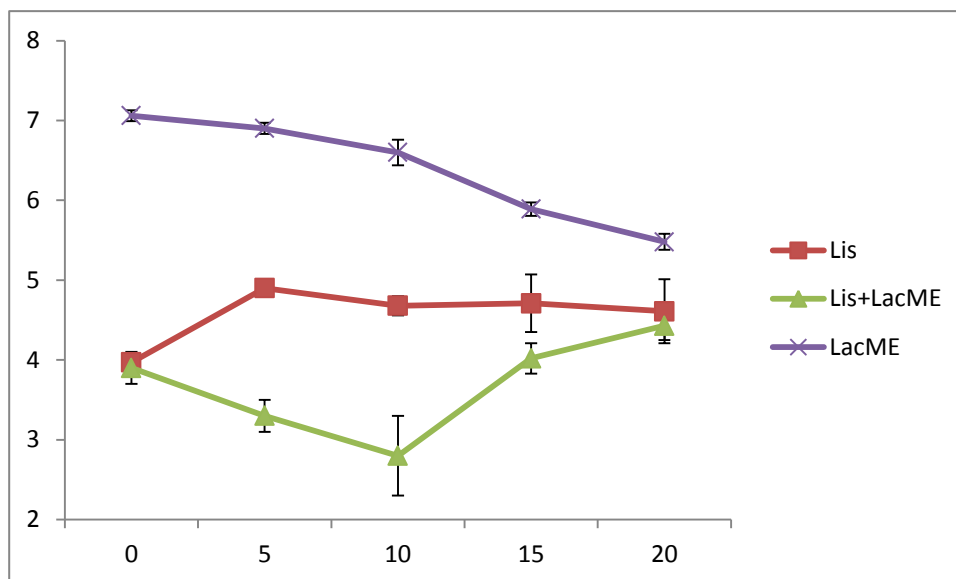
La población inicial de *L. innocua* en el tiempo cero ya en el queso, si pudo ser cuantificada, este “crecimiento” del cultivo puede ser asociado a diversos factores, en primer punto podría ser a las condiciones de proceso (tiempo y temperatura) para la obtención de la cuajada que da origen al queso tipo panela.

Una observación importante que se hace evidente en la figura 29 es que a medida que la población del cultivo protector incrementa a lo largo del periodo de almacenamiento del queso, se observa una tendencia de disminución en la población de listeria, mientras que, cuando la población de *L. lactis* disminuye, la viabilidad del patógeno subrogado se incrementa.



**Figura 28.** Efecto del tratamiento de APH a 450 MPa y su efecto combinado con bioconservación mediante la adición del inóculo de *L. lactis* en forma libre sobre la población de *L. innocua* en queso almacenado por 20 días a 4 °C

En cuanto a la población del cultivo protector, se observa que cuando éste se encuentra inoculado en el sistema en forma libre, presenta una mayor dificultad para mantener su desarrollo, más bien este decrece conforme progresa el tiempo de almacenamiento, sin embargo, cuando el cultivo se encuentra en forma microencapsulada, el cultivo protector, a pesar de no presentar desarrollo, la viabilidad permanece en una concentración superior a 6 log UFC/g durante los primeros 15 días de almacenamiento, lo que nos permite inferir que dicha capacidad de adaptación puede ser atribuida al sistema en el cual se encuentra protegido, la microencapsulación aporta estabilidad a la célula para que permanezca viable en el sistema inoculado por un periodo de tiempo más largo.



**Figura 29.** Efecto del tratamiento de APH a 450 MPa y su efecto combinado con bioconservación mediante la adición del inóculo de *L. lactis* microencapsulado sobre la población de *L. innocua* en queso almacenado por 20 días a 4 °C

En el cuadro 19 se muestran los resultados de las determinaciones de actividad de nisina mediante la técnica de difusión en agar, donde se puede observar su amplia relación en el comportamiento del cultivo.

**Cuadro 19.** Determinación de la actividad de nisina en queso almacenado a 4 °C

Almacenamiento (días)	Lac ME Nisina UI/g	Lac Nisina UI/g
0	0.0±0.00	0.0±0.00
5	17.0±0.57	11.4±0.23
10	22.8±0.12	18.4±1.34
15	24.5±0.37	21.5±0.67
20	12.2±1.34	9.87±0.21

Los resultados obtenidos de la actividad de nisina se asocian a los resultados observados en el comportamiento en refrigeración del desarrollo del cultivo protector inoculado en queso almacenado a 4°C por un periodo total de 20 días, donde claramente se puede observar que el cultivo no logra adaptarse a la

matriz alimentaria en la que fue inoculado, por lo que debido a esto, la producción de nisina por parte del cultivo protector se ve afectada a lo largo del almacenamiento del producto.

Con los resultados anteriores, se tomó la decisión de que una vez realizado el tratamiento de APH, en lugar de procesar inmediatamente las muestras de leche para la elaboración de queso, ésta se dejaría en reposo por un periodo de 12 horas en refrigeración a 4°C, esto con el objetivo de no brindarle las condiciones óptimas de desarrollo a la *Listeria* y evitar su reproducción incontrolable durante el proceso de elaboración del producto. Es importante mencionar que los resultados de crecimiento del cultivo subrogado hace evidente la capacidad que posee dicho microorganismo para sobrevivir y reproducirse aún después del tratamiento para su inactivación, solo basta una pequeña población remanente para que la población se incremente.

#### **7.5.2 Efecto combinado bajo tratamiento de APH a 550 MPa por 10 min a temperatura ambiente.**

Se determinaron las concentraciones de *L. innocua* recién inoculada en leche, en leche con 30 min de reposo y a los 60 min de reposo pero con 30 min de contacto con *L. lactis*. Seguido de esto se llevó a cabo el tratamiento de APH y se determinó la concentración de *Listeria* por la técnica de Miles-Misra y la presencia y ausencia del patógeno subrogado por la técnica de la Norma Oficial Mexicana.

Los resultados de cada una de las determinaciones se muestran en el cuadro 20 donde se puede observar que la población del microorganismo patógeno subrogado se ve afectada por la presencia del cultivo protector, lo que disminuye su capacidad de desarrollo respecto al cultivo inoculado sin la presencia de *L. lactis*, esto por parte del efecto combinado, sin embargo, observando los controles inoculados con el microorganismo patógeno subrogado y el cultivo



protector, respecto al inoculado solamente con *Listeria*, la población se ve claramente disminuida cuando está en contacto con *L. lactis*.

**Cuadro 20.** Efecto del cultivo protector sobre *L. innocua* previo al tratamiento de APH a 550 MPa por 10 min a temperatura ambiente.

TRATAMIENTO		TIEMPO DE CONTACTO			LECHE TRATADA APH	
Trata	M.O.	T <sub>0 min</sub>	T <sub>30 min</sub>	T <sub>60 min</sub>	M-M	NOM
<i>L. lactis</i> libre	<i>Listeria</i>	1.5X10 <sup>5</sup>	1.1X10 <sup>5</sup>	6.6X10 <sup>4</sup>	<50	Presencia
		5.17 log	5.04 log	4.81 log		
<i>L. lactis</i> ME	<i>L. lactis</i>	N/A	N/A	8.6X10 <sup>7</sup>	1.1X10 <sup>6</sup>	N/A
				7.93 log	6.06 log	
	<i>Listeria</i>	1.5X10 <sup>5</sup>	1.1X10 <sup>5</sup>	6.6X10 <sup>4</sup>	N/A	Presencia
		5.17 log	5.04 log	4.81 log		
Control	<i>Listeria</i>	N/A	N/A	8.6X10 <sup>7</sup>	7.8X10 <sup>7</sup>	N/A
				7.93 log	6.06 log	
Control	<i>Listeria</i>	1.5X10 <sup>5</sup>	1.5X10 <sup>5</sup>	6.0X10 <sup>5</sup>	*3.3 X10 <sup>2</sup>	Presencia
		5.17 log	5.17 log	5.69 log	2.52 log	
Control	<i>Listeria</i>	1.5X10 <sup>5</sup>	1.1X10 <sup>5</sup>	6.6X10 <sup>4</sup>	8.3X10 <sup>4</sup>	N/A
		5.17 log	5.04 log	4.81 log	4.92 log	
Ef-C. S/T	<i>L. lactis</i>	N/A	N/A	8.6X10 <sup>7</sup>	1.1X10 <sup>8</sup>	N/A
				7.93 log	8.06 log	
Control	<i>Listeria</i>	1.5X10 <sup>5</sup>	1.5X10 <sup>5</sup>	6.0X10 <sup>5</sup>	1.3X10 <sup>6</sup>	N/A
		5.17 log	5.17 log	5.69 log	8.06 log	

Trata=Tratamiento; ME= Microencapsulado; N/A= No aplica; M-M=Miles-Misra; NOM=Norma Oficial Mexicana; Ef-C. S/T=Efecto combinado sin tratamiento de APH; Li S/T=*Listeria* sin tratamiento.

Son importantes las determinaciones microbiológicas previas al tratamiento de APH, que se presentan en el cuadro 20 ya que estos resultados nos dan una población de lo que realmente está siendo tratado por APH y cuál es la población que está siendo disminuida por efectos del cultivo protector, así como en conjunto cual es el comportamiento del microorganismo patógeno subrogado ante el efecto combinado de las APH y la bioconservación.

En este último experimento se obtuvieron resultados que mostraron un comportamiento totalmente diferente al tratamiento elaborado con anterioridad a 450 MPa, este cambio en el patrón de comportamiento es directamente atribuido a las condiciones de elaboración del producto, es decir, al tiempo de residencia del microorganismo “residual” al tratamiento de altas presiones hidrostáticas así como al tiempo que fue empleado para el desuerado del queso, estos son factores que si no son controlados adecuadamente, podrían propiciar el desarrollo de *Listeria* ocasionando ruidos experimentales que si no son evaluados adecuadamente podrían ser erróneamente atribuidos a una baja capacidad de inhibición de la *Listeria* por parte del cultivo protector.

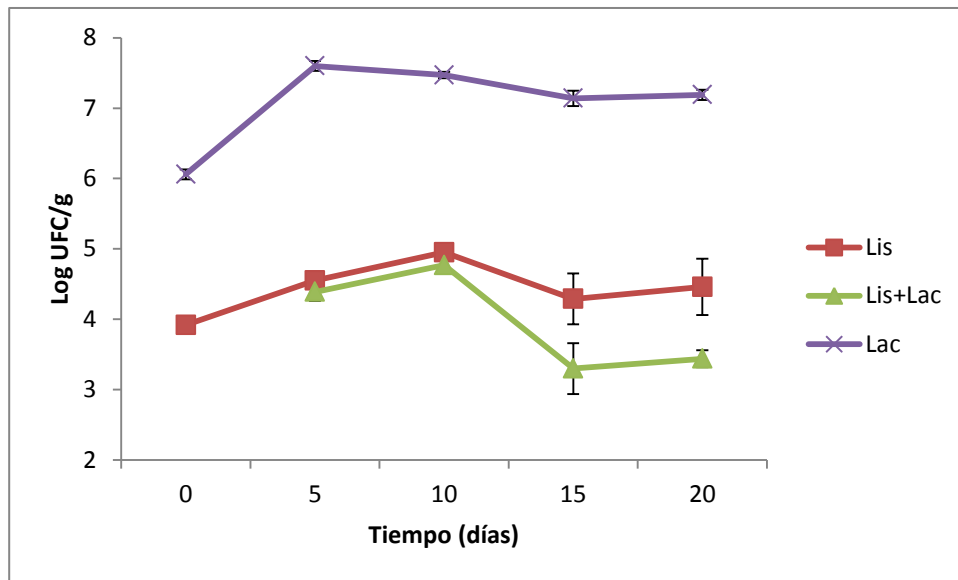
En la Figura 30 se presentan los resultados de la población de *Listeria* así como también del cultivo protector, en el caso de la *Listeria* se puede observar una tendencia similar tanto en los tratamientos del efecto combinado (Lis+Lac) y el tratamiento control (Lis), sin embargo existe una clara diferencia en ambas poblaciones evaluadas a través del tiempo, ya que la población expresada para Lis es el recuento microbiano de colonias típicas de crecimiento de éste cultivo en agar MOX, es decir, colonias negras y brillantes con halo negro, mientras que la población expresada para el efecto combinado, son colonias que presentaron desarrollo en medio MOX, sin embargo, no presentaron desarrollo típico para un cultivo de *Listeria* ya que las colonias no formaban halos de color negro.

Inicialmente dichas colonias fueron atribuidas a contaminación, sin embargo, esta posibilidad fue desacatada cuando se evaluaron tratamientos control (inoculados de la misma forma, sin recibir ningún tipo de tratamiento extra) y en este caso dichos controles si presentaron crecimiento típico.

Este comportamiento en el desarrollo de *Listeria* se atribuyó a un posible daño en las células del microorganismo patógeno subrogado posiblemente por efecto del tratamiento de APH, de bioconservación o de ambas. En el tratamiento del efecto combinado (Lis+Lac) se puede observar que no se presenta la

población del cultivo al tiempo cero, este dato fue omitido ya que si presentó crecimiento de células en forma de colonias típicas,  $1.5 \times 10^3$  UFC/g sin embargo este dato no fue colocado en el grafico para evitar confusión en su interpretación.

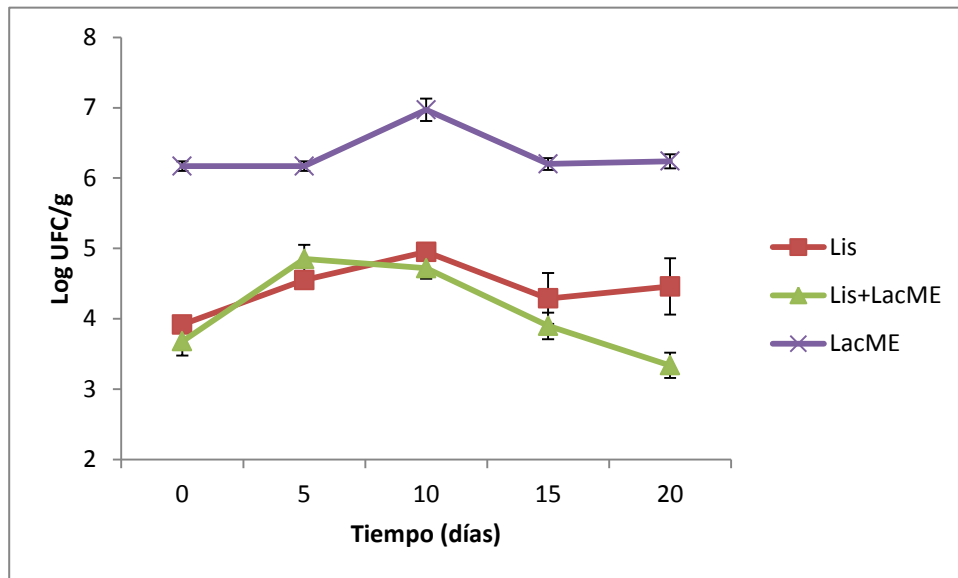
Es importante tomar en cuenta que las colonias típicas de *Listeria* perdieron su capacidad de desarrollo en forma de colonias típicas conforme se incrementa el tiempo de almacenamiento del alimento.



**Figura 30.** Efecto del tratamiento de APH a 550 MPa y su efecto combinado mediante la adición de *L. lactis* en la población de *L. innocua* en queso almacenado por 20 días a 4 °C

Por su parte, en la Figura 31 se presentan los resultados a las poblaciones tanto de *Listeria* como de *L. lactis* pero en este caso, éste último en forma microencapsulada, donde se puede observar el mismo patrón de comportamiento que en el tratamiento anterior, (cuando el CP se encuentra en forma libre) sin embargo, la población de *Listeria* en el sistema microencapsulado se obtiene una concentración, al final del periodo de almacenamiento, menor respecto al sistema del cultivo protector en forma libre, es decir, el efecto de inhibición del cultivo protector contra la *Listeria* presenta una mayor eficiencia cuando *L. lactis* actúa de

manera microencapsulada que cuando éste se encuentra de forma libre en el sistema. Esto podría estar directamente atribuido a la capacidad de adaptación del cultivo a las condiciones adversas del alimento es mayormente eficiente cuando el microorganismo es incorporado con una barrera física que ayude a mejorar su fase de adaptación en el alimento.



**Figura 31.** Efecto del tratamiento de APH a 550 MPa y su efecto combinado con bioconservación mediante la adición del inóculo de *L. lactis* microencapsulado sobre la población de *L. innocua* en queso almacenado por 20 días a 4 °C.

Para la determinación de la actividad de nisina se puede observar que cuando el microorganismo se adiciona al alimento en forma microencapsulada además de presentar mayor capacidad de adaptación, presenta una mejor capacidad de producción de nisina, esto es aceptable, ya que la nisina al ser una metabolito asociado al crecimiento del cultivo protector, si *L. lactis* se adapta mejor para desarrollarse, teóricamente podría tener una mejor capacidad de producción del metabolito secundario de interés.

**Cuadro 21.** Determinación de la actividad de nisina en queso almacenado a 4 °C

<b>Almacenamiento (días)</b>	<b>Lac ME Nisina UI/g</b>	<b>Lac Nisina UI/g</b>
0	0.0±0.00	0.00±0.00
5	31.6±2.03	23.1±2.32
10	32.4±2.80	26.2±2.68
15	52.5±4.60	47.9±0.00
20	54.1±1.37	47.9±0.08

## VII. CONCLUSIONES

- La microencapsulación de *L. lactis* UQ2 rif L+ utilizando almidón modificado, proteína de suero de leche y maltodextrina como materiales de pared mostró ser una tecnología adecuada por mantener la viabilidad y estabilidad del cultivo.
- Los microorganismos encapsulados mediante secado por aspersion a temperaturas de operación más bajas (110°C) mostraron ser tratamientos más eficientes respecto al obtenido a temperaturas superiores (165 ° C) en cuanto a la recuperación de la viabilidad del cultivo así como también en el aporte de estabilidad del cultivo almacenado en refrigeración hasta por un período de 80 días.
- El tratamiento de APH mostró tener un efecto eficiente en la eliminación de *L. innocua* tanto en leche UHT como en leche cruda entera de vaca, sin embargo el efecto combinado de APH y cultivo protector mostró una mayor eficiencia en la eliminación de *L. innocua* respecto al tratamiento únicamente de APH.
- Se determinó que existe una disminución del tiempo de tratamiento por APH logrando la inactivación del cultivo subrogado en un tiempo de 9 minutos cuando esta tecnología es utilizada de manera combinada con *L. lactis* como cultivo protector, mientras que cuando se utilizan únicamente las APH toma 12 minutos la completa inactivación del microorganismo en estudio.
- El tratamiento de leche con APH permite incrementar el rendimiento en la elaboración del queso desde 15% hasta un 29%.
- El cultivo de *L. lactis* UQ2 rif L+ es una cepa capaz de favorecer la bioconservación del queso tipo panela mediante la producción *in situ* de nisina mejorando la eficiencia del tratamiento de APH y con un futuro prometedor para asegurar la inocuidad en leche y sus derivados.

## VIII. LITERATURA CITADA

- 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 Food Microbiology* 143: 61-66.
- Amir Mortazavian, Seyed Hadi Razavi, Mohammad Reza Ehsani, Sara Sohrabvandi. (2007). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. Review Article. *Iranian Journal of Biotechnology*. 5: 1-18
- Anema S., Lowe E., Stockmann R., (2004). Particle size changes and casein solubilisation in high-pressure-treated skim milk. *Food Hydrocolloids*. 19: 257-267
- Barbosa G., Rodríguez J. (2005). *Novel Food Processing Technologies*. Capítulo 9. Thermodynamic Aspects of High Hydrostatic Pressure Food Processing. 186 -205.
- Berlin D., Herson D., Hicks D., Hoover D. (1999). Response of pathogenic *Vibrio* species to high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 2776–2780.
- Binetti A., Bailo N., Reinheimer J. (2004). Aplicaciones de la microfiltración en la industria láctea. *Mundo Lácteo y Cárnico*. Septiembre-octubre 2004.
- Bozoglu F., Alpas H., Kaletunç G., (2004). Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 40: 243-247.
- Breukink E., De Kruijff B. (2006). Lipid II as a target for antibiotics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 10.1038: 1-12.
- Buzrul S., Alpas H., Largeteau A., Demazeau G. (2008). Modeling high pressure inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in whole milk. *Europe Food Research Technology*. 227:433-448.

- CDC. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2011 (Final Report). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. 2012.
- Chatterjee C., Paul M., Xie, L., & van der Donk, W. A. (2005). Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chemical Reviews*, 105: 633–683.
- Cheftel Claude J. (1999). Review: High-pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Science and Technology International*. 2: 75-90
- Considine T., Patel H., Anema S., Singh H., Creamer L., (2006). Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments. A Review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 8: 1-23.
- Debra Gilliss. (2010). Vital Signs: Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996-2010. *MMWR*. 60(22): 749-755.
- Dziezak J. (1988). Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technology*. 42: 36-151.
- García B., Cann I., Martín S., Guerrero I., Regalado C. (2008). Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*. 19: 670-680.
- García M., García B., 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*.
- García P., Rodríguez L., Rodríguez A., Martínez B. (2010). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology* 21: 373-382.
- Garde S., Ávila M., Fernández E., Medina M., Nuñez M. (2007). Volatile compounds and aroma of Hispánico cheese manufactured using lacticin 481-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* INIA 639 as an adjunct culture. *International Dairy Journal*. 17: 717-726.



- Gervilla R., Ferragut V., Guamis B. (2000). High pressure inactivation of microorganisms inoculated into Ovine Milk of different fat contents. *Journal of Dairy Science*. 83:674-682
- Grattepanche F., Audet P., Lacroix C., (2007). Milk fermentation by functional mixed culture producing nisin Z and exopolysaccharides in fresh cheese model. *International Dairy Journal*. 17: 123-132.
- Gujarathi S., Bankar S., Ananthanarayan, A., (2008). Fermentative production, purification and characterization of nisin. *International Journal of Food Engineering* 4: 1-21.
- Haiqiang Chen. (2007). Use of linear, Weibull, and log-logistic functions to model pressure inactivation of seven foodborne pathogens in milk. *Food Microbiology*. 24:197–204
- Hickey D., Kilcawley K., Beresford T., Wilkinson M. (2007). Lipolysis in Cheddar cheese made from raw, thermized, and pasteurised milks. *Journal of Dairy Science*, 90: 47–56.
- Horn N., Swindell S., Dodd H., Gasson M. (1991). Nisin biosynthesis genes are encoded by novel conjugative transposon. *Mol. Gen. Genet*. 228: 129-135.
- Huppertz T., Fox P., Kelly A. (2004). High pressure treatment of bovine milk: Effects on casein micelles and whey proteins. *Journal of Dairy Research*. 71: 97–106.
- Huppertz T., Hinz K., Zobrist M., Uniacke T., Kelly A., Fox P. (2006). Effects of high pressure treatment on the rennet coagulation and cheese-making properties.
- Huppertz T., Kelly A., Fox Patrick. (2002). Effects of high pressure on constituents and properties of milk. *International Dairy Journal* 12: 561-572
- Jackson L., Lee K. (1991). Microencapsulation and the food industry. *Food Science and Technology*. 24: 289-297.
- Kailasapathy K. (2002). Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Curr. Issues Intest. Microbiol*. 3: 39-48.
- Kappe C. (2004). Controlled Microwave Heating in Modern Organic Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed*. 43: 6250 –6284

- Leroy F., De Vuyst L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci & Technol.* 15: 67-78.
- Linnan M., Mascola L., Lou X., Goulet V., May S., Salminen C., (1998). Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N Engl J Med.* 319: 823-8.
- Linton M., Mackle A., Upadhyay V., Kelly A., Patterson M. (2008). The fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of Camembert-type cheese: a comparison between raw milk and milk treated with high hydrostatic pressure. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 4: 423-442.
- Lubelski J., Rink R., Khusainov R., Moll G., Kuipers O. (2007). Biosynthesis immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin. *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 445-476.
- Martin O., Zhang Q., Castro A., Barbosa G., Swanson, B. (1994) Review. Pulse electric fields of high voltage to preserve foods: microbiological and engineering aspects of the process. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 34(1): 1-34 [Abstract]
- Mauriello G., Aponte M., Andolfi R., Moschetti G., Villani F. (1999). Spray-drying of bacteriocin producing lactic acid bacteria. *J. Food Prot.* 62: 773-777.
- method. *Food Res. Int.* 37, 861-866.
- Mireau I., Olieman K., Mond J., Smid E. (2005). Optimization of the *Lactococcus lactis* nisin-controlled gene expression system NICE for industrial applications. *Microbial Cell Fact.* 4: 16-24.
- Molina E., Alvarez M., Ramos M., Olano A., Lopez R. (2000). Use of high-pressure-treated milk for the production of reduced-fat cheese. *Int. Dairy J.* 10: 467-475.
- Mújica P., Valdez A., Tonello S., Welti C., Torres A. (2011). High-Pressure Preprocessing Technologies for the pasteurization and sterilization of foods. *Food Bioprocess Technol.* 4: 969-985.
- Muro C., Escobar J., Zavala R., Esparza M., Castellanos J., Gómez R., García M. (2009). Evaluación del proceso de microfiltración en un efluente residual de una industria alimenticia para su reuso. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 25(4): 229-238.

- Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, formula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- O’Riordan K., Andrews D., Buckle K., Conway P. (2001). Evaluation of microencapsulation of a Bifidobacterium strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *J. Appl. Microbiol.* 91: 1059-1066.
- Pagán R., Esplugas S., Góngora N., Barbosa G., Swanson B. (1998). Inactivation of *Bacillus subtilis* spores using high intensity pulsed electric fields in combination with other food conservation technologies. *Food Science and Technology International.* 4(1): 33-44
- Pongtharangkul T., Demirci A., (2006). Evaluation of culture medium for nisin production in a repeated batch biofilm reactor. *Biotech. Prog.* 22: 217-224.
- Rendueles E., Omer M., Alvseike O., Calleja C., Capita R., Prieto M., (2010). Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT - Food Science and Technology.* 44: 1251-1260.
- Rožman T., Jeršek B. (2009). Antimicrobial activity of rosemary extracts (*Rosmarinus officinalis* L.) against different species of *Listeria*. *Acta agriculturae Slovenica.* 93:1
- González, M. F., Rodriguez, J. J., Gurram, S., Clark, S., Swanson, B. G., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2007). Yield, composition and rheological characteristics of cheddar cheese made with high pressure processed milk. *LWT—Food Science and Technology*, 40, 697–705.
- Sandra S., Standford M., Meunier L. (2004). The use of high-pressure processing in the production of Queso Fresco Cheese. *J. Food Sci.* 69: 153–158.
- Sauders B., Wiedmann M. (2007). Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. In E. T. Ryser, & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety.* 21-53.
- Sendra E. Capellas M., Guamis B., Felipe X., Mor-Mur M., Pla R. (1996). Review: Food irradiation-General aspects. *Food Science and Technology International* 2(1):1-11

- Settanni L., Moschetti G., (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol.* 27:691-697.
- Shahin Zomorodi., Asghar Khosrowshahi Asl., Sayad Mahdi Razavi Rohani., Somayieh Miraghaei. (2011). Survival of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium bifidum* in free and microencapsulated forms on Iranian white cheese produced by ultrafiltration. *International Journal of Dairy Technology.* 64 (1)
- Shakeel-Ur-Rehman., McSweeney P., Banks J., Brechany E., Muir D., Fox P. (2000). Ripening of Cheddar cheese made from blends of raw and pasteurized milk. *International Dairy Journal*, 10: 33-44.
- Smelt J., (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science & Technology.* 9: 152-158.
- Sobrino A., Martín O., (2008). Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *Int. Dairy J.* 18: 329-343.
- Stuerga D., Delmotte M. (2002) *Microwaves in Organic Synthesis* (Ed.: A. Loupy), Wiley-VCH, Weinheim. 1-34
- Talwalkar., Kailasapathy. (2004) A Review of Oxygen Toxicity in Probiotic Yogurts: Influence on the Survival of Probiotic Bacteria and Protective Techniques. *Comprehensive reviews in food science and food safety.* 3(2)
- Téllez L., Ramírez C., Pérez L., Vázquez J., Simal G. (2001). Application of high hydrostatic pressure in the food preservation. *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 3 (2).
- Todd E., Notermans S. (2011) Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 22: 1484-1490.
- Toepfl S., Mathys A., Heinz V., Knorr D. (2006) Review: Potential of High Hydrostatic Pressure and Pulsed Electric Fields for Energy Efficient and Environmentally Friendly Food Processing. *Food Reviews International* 22(4) 405-423
- Trujillo A.J., Capellas M., Saldo J., Gervilla R., Guamis B. (2002). Application of high hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 3: 295-307.

- Vasishtha N. (2003). Microencapsulation: Delivering a market advantage. Prepared foods network. Fecha de consulta Mayo de 2012. Recuperado de: <http://www.preparedfoods.com>
- Villena M. (2009) Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. ARS Pharmaceutica. 50 (1); 43-5
- Voigt D., Donaghy J., Patterson M., Stephan S., Kelly A. (2010). Manufacture of Cheddar cheese from high-pressure-treated whole milk. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 11: 574–579
- Yuste J., Capellas M., Fung D., Mor-Mur M., (2004). Inactivation and sublethal injury of foodborne pathogens by high pressure processing: evaluation with conventional media and thin agar layer
- Zhao Xinhuai, Zhang Yu, Li Dan. (2009) Elimination of acidic or oxidative stress for four probiotics with some chemicals *in vitro*. 3(7): 353-357