



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Queso fresco como vehículo para
microorganismos probióticos:
Estudio de su viabilidad**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

CINTHYA PAOLA ROMERO RAMÍREZ



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: María del Carmen Wacher Rodarte

VOCAL: Martha Giles Gómez

SECRETARIO: Maricarmen Quirasco Baruch

1er. SUPLENTE: Norma Angélica Camacho de la Rosa

2do. SUPLENTE: Valentín Gómez García

El proyecto de tesis de licenciatura se realizó bajo la dirección de la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch en el Laboratorio 312, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM, México D.F.

ASESOR DEL TEMA

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

SUPERVISOR TÉCNICO

Dra. Carolina Peña Montes

SUSTENTANTE

Cinthy Paola Romero Ramírez

Contenido

	Página
CONTENIDO	II
LISTADO DE TABLAS	VI
LISTADO DE FIGURAS	VIII
RESUMEN	IX
I. INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO	1
1.1. Introducción	1
1.2. Marco teórico	2
1.2.1. Queso	2
1.2.1.1. Queso fresco	2
1.2.1.2. Queso bajo en grasa	3
1.2.1.3. Quesos botaneros	3
1.2.1.4. Especificaciones sanitarias del queso fresco	4
1.2.2. Queso probiótico	5
1.2.2.1. Consideraciones tecnológicas para el queso probiótico	6
1.2.2.2. Queso simbiótico: Vehículo de microorganismos probióticos y fructo-oligosacáricos	10
1.2.3. Alimentos funcionales	10
1.2.3.1. Prebióticos	11
1.2.3.2. Simbióticos	13
1.2.3.3. Probióticos	14
1.2.3.3.1. Definición	14
1.2.3.3.2. Beneficios a la salud	15
1.2.3.3.3. Criterios de selección para las cepas probióticas	19
1.2.3.3.4. Microorganismos considerados probióticos	21
1.2.3.3.5. Ingesta recomendada	22

	Página
1.2.4. Características generales de los probióticos utilizados en el queso funcional	23
1.2.4.1. <i>Lactobacillus casei</i>	23
1.2.4.2. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	24
1.2.4.3. Medios de cultivo utilizados para el cultivo de probióticos	26
1.2.5. Probióticos microencapsulados	33
1.2.5.1. Materiales utilizados para la microencapsulación	34
1.2.5.2. Características de la microcápsula utilizada para <i>L.acidophilus</i>	35
1.2.6. Microorganismos indicadores	36
1.2.6.1. Indicadores de condiciones de manejo o de eficiencia de proceso	37
1.2.6.1.1. Mesófilicos aerobios	37
1.2.6.1.2. Coliformes	38
1.2.6.1.3. Hongos y levaduras	39
II. JUSTIFICACIÓN	40
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	42
3.1. Hipótesis	42
3.2. Objetivo general	42
3.3. Objetivos particulares	42
IV. METODOLOGÍA	45
4.1. DESARROLLO DE LAS METODOLOGÍAS PARTE I	46
4.1.1. Preliminar	46
4.1.1.1. Adición de probióticos	46
4.1.1.2. Determinación de la cantidad del inóculo	48
4.1.2. Elaboración de quesos	49
4.1.3. Vida de anaquel	50
4.1.3.1. Evaluación de parámetros microbiológicos	50
4.1.3.1.1. Cuantificación de probióticos	50
4.1.3.1.2. Cuantificación de microorganismos indicadores	51
4.1.3.2. Evaluación de parámetros fisicoquímicos	52
4.1.3.2.1. Determinación de pH y acidez	52

	Página
4.2. DESARROLLO DE LAS METODOLOGÍAS PARTE II	52
4.2.1. Preliminar: Modificaciones al cambio de cepas	52
4.2.1.1. Selección de medios y condiciones para la cuantificación selectiva de <i>Lactobacillus casei</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i>	52
4.2.1.2. Confirmación de medios para la cuantificación selectiva de los probióticos	54
4.2.1.3. Selección de la metodología de cuantificación para <i>L.acidophilus</i> microencapsulado	55
Metodología 1	56
Metodología 2	56
Metodología 3	57
4.2.2. Elaboración de quesos	58
4.2.3. Vida de anaquel	59
4.2.3.1. Evaluación de parámetros microbiológicos	60
4.2.3.1.1. Cuantificación de probióticos	60
4.2.3.1.2. Cuantificación de microorganismos indicadores	61
4.2.3.2. Evaluación de parámetros fisicoquímicos	61
4.2.3.2.1. Determinación de pH y acidez	61
V. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
5.1. RESULTADOS PARTE I	62
5.1.1. Adición de probióticos	62
5.1.2. Determinación de la cantidad del inóculo	63
5.1.3. Vida de anaquel	64
5.1.3.1. Evaluación de parámetros microbiológicos	65
5.1.3.1.1. Cuantificación de probióticos	65
5.1.3.1.2. Cuantificación de microorganismos indicadores	68
5.1.3.2. Evaluación de parámetros fisicoquímicos	68
5.1.3.2.1. Determinación de pH y acidez	68

	Página
5.2. RESULTADOS PARTE II	70
5.2.1. Selección de medios y condiciones para la cuantificación selectiva de <i>L.casei</i> y <i>L.acidophilus</i>	70
5.2.2. Selección de la metodología de cuantificación para <i>L.acidophilus</i> microencapsulado	75
5.2.3. Vida de anaquel	77
5.2.3.1. Formulación de queso blanco	78
5.2.3.2. Formulación de queso con chile jalapeño	86
5.2.3.3. Formulación de queso con chile chipotle	90
5.2.3.4. Formulación de queso con epazote	95
5.2.4. Comparación de las formulaciones de quesos elaborados en la parte I con los elaborados en la parte II	100
VI. CONCLUSIONES	102
VII. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES	105
VIII. ANEXOS	107
ANEXO 1: Preparación de la muestra y cuenta por vertido en placa	107
ANEXO 2: Preparación, composición de medios de cultivo y soluciones	109
ANEXO 3: Determinación de pH y acidez en queso	113
ANEXO 4: Fórmula matemática (Fórmula 1) para la determinación de la cantidad del inóculo	114
ANEXO 5: Método 3M™ Petrifilm™ para el recuento rápido de coliformes	116
ANEXO 6: Tinción de Gram	119
ANEXO 7: Resultados completos de la evaluación de la vida de anaquel	120
IX. BIBLIOGRAFÍA	127

Listado de tablas

	Página
Tabla 1.1. <i>Límite máximo de microorganismos permitidos en queso</i>	4
Tabla 1.2. <i>Obstáculos tecnológicos en el proceso de queso probiótico</i>	9
Tabla 1.3. <i>Efectos benéficos de los probióticos</i>	19
Tabla 1.4. <i>Microorganismos considerados como probióticos</i>	22
Tabla 1.5. <i>Resumen de medios utilizados para el cultivo-diferenciación de probióticos</i>	27
Tabla 4.1. <i>Condiciones de incubación para la cuantificación de probióticos</i>	51
Tabla 4.2. <i>Condiciones y medios utilizados para la determinación de microorganismos indicadores</i>	52
Tabla 4.3. <i>Medios y condiciones de incubación seleccionados para la cuantificación selectiva de L.casei y L.acidophilus</i>	53
Tabla 4.4. <i>Condiciones y medios utilizados para la cuantificación selectiva de probióticos en queso</i>	60
Tabla 5.1. <i>Resultados de cuantificación de probióticos (liofilizados) para las variedades de queso simbiótico al inicio y final de la vida de anaquel</i>	65
Tabla 5.2. <i>Resultados de cuantificación de microorganismos indicadores para las variedades de queso simbiótico al inicio y final de la vida de anaquel</i>	68
Tabla 5.3. <i>Resultados de parámetros fisicoquímicos para las distintas variedades de queso simbiótico al inicio y final de la vida de anaquel</i>	68
Tabla 5.4. <i>Resultados de crecimiento de los probióticos en diferentes medios selectivos</i>	72
Tabla 5.5. <i>Resultados de probióticos liofilizados inoculados en su medio selectivo y en su medio selectivo contrario</i>	74
Tabla 5.6. <i>Resultados de las diferentes metodologías aplicadas para la cuantificación de L.acidophilus microencapsulado</i>	75
Tabla 5.7. <i>Resultados de L.casei liofilizado y L.acidophilus microencapsulado inoculados en su medio selectivo y en el medio selectivo contrario</i>	76
Tabla 5.8. <i>Resultados de parámetros microbiológicos y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico blanco al inicio y final de la vida de anaquel</i>	78
Tabla 5.9. <i>Resultados de parámetros microbiológicos y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico con chile jalapeño al inicio y final de la vida de anaquel</i>	86
Tabla 5.10. <i>Resultados de parámetros microbiológicos y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico con chile chipotle al inicio y final de la vida de anaquel</i>	90

	Página
Tabla 5.11. <i>Resultados de parámetros microbiológicos y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico con epazote al inicio y final de la vida de anaquel</i>	95
Tabla A.7.1. <i>Resultados de cuantificación de probióticos y parámetros fisicoquímicos correspondientes a la parte I</i>	120
Tabla A.7.2. <i>Resultados de cuantificación de L.casei liofilizado y L.acidophilus liofilizado, mesofílicos aerobios y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico blanco</i>	123
Tabla A.7.3. <i>Resultados de cuantificación de L.casei liofilizado y L.acidophilus microencapsulado, mesofílicos aerobios y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico blanco</i>	123
Tabla A.7.4. <i>Resultados de cuantificación de L.casei liofilizado y L.acidophilus liofilizado, mesofílicos aerobios y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico con chile jalapeño</i>	124
Tabla A.7.5. <i>Resultados de cuantificación de L.casei liofilizado y L.acidophilus microencapsulado, mesofílicos aerobios y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico con chile jalapeño</i>	124
Tabla A.7.6. <i>Resultados de cuantificación de L.casei liofilizado y L.acidophilus liofilizado, mesofílicos aerobios y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico con chile chipotle</i>	125
Tabla A.7.7. <i>Resultados de cuantificación de L.casei liofilizado y L.acidophilus microencapsulado, mesofílicos aerobios y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico con chile chipotle</i>	125
Tabla A.7.8. <i>Resultados de cuantificación de L.casei liofilizado y L.acidophilus liofilizado, mesofílicos aerobios y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico con epazote</i>	126
Tabla A.7.9. <i>Resultados de cuantificación de L.casei liofilizado y L.acidophilus microencapsulado, mesofílicos aerobios y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico con epazote</i>	126

Listado de figuras

	Página
Figura 4.1. Metodología general Parte I.	44
Figura 4.2. Metodología general Parte II.	45
Figura 4.3. Proceso general de elaboración de queso.	47
Figura 4.4. Proceso general de elaboración de queso con adición de probióticos.	47
Figura 5.1. Vida de anaquel de probióticos, distintas formulaciones de queso simbiótico.	66
Figura 5.2. Vida de anaquel de parámetros fisicoquímicos, distintas formulaciones de queso simbiótico.	69
Figura 5.3. Observación microscópica de los probióticos liofilizados.	74
Figura 5.4. Observación microscópica de <i>L.casei</i> liofilizado y <i>L.acidophilus</i> microencapsulado.	76
Figura 5.5. Parámetros microbiológicos de la vida de anaquel del queso simbiótico blanco con probióticos liofilizados (<i>L.casei</i> y <i>L.acidophilus</i>); y con probióticos: <i>L.casei</i> liofilizado (<i>L.casei</i> (M)) y <i>L.acidophilus</i> microencapsulado. Mesofílicos aerobios en el queso con probióticos liofilizados (MA (L)) y con probióticos liofilizado y microencapsulado ((MA (M))).	79
Figura 5.6. Parámetros fisicoquímicos de la vida de anaquel del queso simbiótico blanco con probióticos liofilizados (<i>L.casei</i> y <i>L.acidophilus</i>); y con probióticos: <i>L.casei</i> liofilizado y <i>L.acidophilus</i> microencapsulado.	80
Figura 5.7. Parámetros microbiológicos de la vida de anaquel del queso simbiótico con chile jalapeño con probióticos liofilizados (<i>L. casei</i> y <i>L.acidophilus</i>); y con probióticos: <i>L.casei</i> liofilizado (<i>L.casei</i> (M)) y <i>L.acidophilus</i> microencapsulado (<i>L.acidophilus</i>). Mesofílicos aerobios en el queso con probióticos liofilizados (MA (L)) y con probióticos liofilizado y microencapsulado ((MA (M))).	87
Figura 5.8. Parámetros fisicoquímicos de la vida de anaquel del queso simbiótico con chile jalapeño con probióticos liofilizados (<i>L.casei</i> y <i>L.acidophilus</i>); y con probióticos: <i>L.casei</i> liofilizado y <i>L.acidophilus</i> microencapsulado.	88
Figura 5.9. Parámetros microbiológicos de la vida de anaquel del queso simbiótico con chile chipotle con probióticos liofilizados (<i>L.casei</i> y <i>L.acidophilus</i>); y con probióticos: <i>L.casei</i> liofilizado (<i>L.casei</i> (M)) y <i>L.acidophilus</i> microencapsulado. Mesofílicos aerobios en el queso con probióticos liofilizados (MA (L)) y con probióticos liofilizado y microencapsulado ((MA (M))).	91
Figura 5.10. Parámetros fisicoquímicos de la vida de anaquel del queso simbiótico con chile chipotle con probióticos liofilizados (<i>L.casei</i> y <i>L.acidophilus</i>); y con probióticos: <i>L.casei</i> liofilizado y <i>L.acidophilus</i> microencapsulado.	92

	Página
Figura 5.11. Parámetros microbiológicos de la vida de anaquel del queso simbiótico con epazote con probióticos liofilizados (<i>L.casei</i> y <i>L.acidophilus</i>); y con probióticos: <i>L.casei</i> liofilizado (<i>L.casei</i> (M)) y <i>L.acidophilus</i> microencapsulado. Mesofílicos aerobios en el queso con probióticos liofilizados (MA (L)) y con probióticos liofilizado y microencapsulado ((MA (M))).	96
Figura 5.12. Parámetros fisicoquímicos de la vida de anaquel del queso simbiótico con epazote con probióticos liofilizados (<i>L.casei</i> y <i>L.acidophilus</i>); y con probióticos: <i>L.casei</i> liofilizado y <i>L.acidophilus</i> microencapsulado.	97
Figura A.5.1. Estructura general de las placas Petrifilm™.	116
Figura A.5.2. Metodología de inoculación Placas Petrifilm™ 3M™ para el recuento de coliformes.	117
Figura A.5.3. Incubación de Placas Petrifilm™ 3M™ para el recuento de coliformes.	117
Figura A.5.4. Ejemplo de crecimiento de coliformes en Placa Petrifilm™ para el recuento de coliformes.	118

Resumen

Patlán (2012), realizó un proyecto experimental donde se desarrollaron formulaciones de quesos frescos funcionales; los cuales son bajos en grasa y están adicionados con fibra soluble; el proyecto abarcó el desarrollo de estos nuevos productos desde su formulación, la determinación de su vida de anaquel y el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la textura de las formulaciones desarrolladas: queso blanco, con chile jalapeño, con chile chipotle y con epazote. En este trabajo, a dichas formulaciones se les adicionaron dos especies de bacterias ácido lácticas probióticas: *Lactobacillus casei* (*L.casei*) y *Lactobacillus acidophilus* (*L.acidophilus*) y a través de cuenta en placa, se evaluó la concentración de dichas cepas a lo largo de la vida de anaquel de las formulaciones de queso.

Así mismo, se determinó la etapa adecuada para la adición de los probióticos durante el proceso de elaboración de queso y se ajustó el tamaño del inóculo con la finalidad de obtener una concentración inicial de 1×10^8 UFC /g_{queso}. La cuantificación de los probióticos se realizó a lo largo de 3 semanas, en condiciones de refrigeración (4°C). Al mismo tiempo se evaluaron parámetros microbiológicos (mesofílicos aerobios, coliformes, hongos y levaduras) y fisicoquímicos (pH y acidez).

En las formulaciones *L.casei* se adicionó en forma liofilizada, mientras que *L.acidophilus* se adicionó en forma liofilizada y microencapsulada, por lo que en

este trabajo también se evaluó el efecto de dicha forma de administración sobre su concentración.

Al final de la vida de anaquel, la formulación de queso blanco con *L.casei* y *L.acidophilus* liofilizados así como microencapsulado se mantuvo en concentraciones de 7.0 log UFC/ g_{queso}. La formulación con chile jalapeño: *L.casei* y *L.acidophilus* liofilizados y microencapsulado, la cuenta fue de 2.0 UFC/ g_{queso} y aproximadamente 6.5 UFC/ g_{queso}. La formulación con chile chipotle: *L.casei* y *L.acidophilus* liofilizados se mantuvo en concentraciones de 2.0 log UFC/ g_{queso} y 6.6 UFC/ g_{queso} respectivamente, mientras que en la formulación con *L.casei* liofilizado la concentración fue de 6.9 log UFC/ g_{queso} y 6.0 UFC/ g_{queso} para *L.acidophilus* microencapsulado. Finalmente, la formulación de queso con epazote con liofilizados: *L.casei* 4.0 log UFC/ g_{queso} y *L.acidophilus* 6.4 UFC/ g_{queso} y la formulación con *L.casei* liofilizado 7.0 UFC/ g_{queso} y *L.acidophilus* microencapsulado 6.4 UFC/ g_{queso}.

A pesar de los efectos adversos que se presentaron sobre la concentración de las cepas liofilizadas o microencapsuladas debidas el efecto del chile jalapeño y chipotle, para las ocho formulaciones de queso simbiótico, se observó al final de vida de anaquel de las cuatro formulaciones de queso, que los probióticos mantienen su concentración en los niveles sugeridos para causar el efecto benéfico al hospedero.

I. Introducción y Marco teórico

1.1. Introducción

En el proyecto que se presenta a continuación, se evalúa la viabilidad de dos bacterias ácido lácticas probióticas: *L.casei* y *L.acidophilus* adicionadas a 4 diferentes formulaciones de queso fresco funcional bajo en grasa desarrolladas anteriormente, las cuales son: queso blanco, con chile jalapeño, con chile chipotle y con epazote. La adición de bacterias probióticas a las diferentes formulaciones de queso fresco funcional bajo en grasa, cambia la de nominación de estos productos a la de *quesos frescos simbióticos*.

La elaboración de este tipo de productos, no sólo consiste en el desarrollo del producto, sino que deben de considerarse los siguientes aspectos:

- a) Ajustar la cantidad inicial de bacterias probióticas en el producto final para que durante su vida de anaquel, se conserven en el nivel recomendado para causar el efecto benéfico sobre la salud del consumidor.
- b) Mantener la viabilidad de los probióticos a través de barreras químicas (microencapsulación) durante la vida de anaquel del producto para que causen el beneficio esperado al ser consumidos.
- c) Observar el efecto sobre la viabilidad de las bacterias probióticas cuando son expuestas a ambientes hostiles como chile y epazote.

Por lo tanto, este proyecto se enfoca en controlar y evaluar los aspectos anteriormente descritos.

1.2. Marco teórico

1.2.1. Queso

La NOM-243-SSA1-2010 define el queso como el producto elaborado de la cuajada de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida de la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior, por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado.

Los productos objeto de esta norma se clasifican de la siguiente manera:

Quesos

1. Frescos
2. Madurados
3. Procesados
4. Otros quesos no considerados en los numerales 1,2,3.

1.2.1.1. Queso fresco

La NOM-243-SSA1-2010 define al queso fresco como aquellos que además de cumplir con la descripción general de queso se caracterizan por su alto contenido de humedad, y por no tener corteza o tener corteza muy fina, pudiendo o no adicionarles aditivos e ingredientes opcionales.

La misma norma clasifica, por su proceso de elaboración, a los quesos frescos como:

1. Frescos

1.1 Frescales: Panela, Canasto, Sierra, Ranchero, Fresco, Blanco, Enchilado, Adobado.

1.2 De pasta cocida: Oaxaca, Asadero, Mozzarella, Del Morral, Adobera.

1.3 Acidificados: Cottage, Crema, Doble crema, Petit Suisse, Nuefchatel.

1.4 Quesos de suero: Broccio, Broccotle, Cerrase, Geitmysost, Gyetost, Mejetle, Mysost, Recuit, Requesón, Ricotta, Picotón, Schottenezinger, Zinder.

Una definición más específica de para el queso fresco, se encuentra en la NMX-713-COFOCALEC-2005 que denomina al queso fresco como producto que además de cumplir con la descripción general de queso, no es sometido a un proceso de maduración, presenta un alto contenido de humedad (hasta 80% m/m), textura blanda, sabor suave, no presenta corteza, requiere refrigeración para su conservación y se consume preferentemente en los primeros 20 días a partir de su fecha de elaboración.

1.2.1.2. Queso bajo en grasa

La NMX-713-COFOCALEC-2005 indica que un queso bajo en grasa se refiere a que el contenido de la misma es superior o igual al 10% e inferior al 25%.

1.2.1.3. Quesos botaneros

Son quesos que se producen para consumirse troceados en forma de botana. Son quesos frescos, cuya cuajada se prepara como queso panela; sin embargo, al obtenerse ésta, además de sal, se agregan chiles, epazote y otros productos

como jamón, salchicha, ajonjolí o duraznos en almíbar. Pero lo más común es que contenga chiles, como chipotle o jalapeño, los cuales se agregan en forma natural o en escabeche (Cervantes *et al.*, 2008).

1.2.1.4. Especificaciones sanitarias del queso fresco

a) Organolépticas

Los quesos frescos son de consistencia desde untable hasta rebanable, de aroma y sabor característico sin olores y sabores ajenos (NOM-121-SSA1-1994).

b) Fisicoquímicas

Para quesos frescos coagulados a través de cuajo enzimático el pH permanece en el rango de 6.5 a 6.7 (Hill, 2007).

c) Microbiológicas

Tabla 1.1. Límite máximo de microorganismos permitidos en queso (NOM-243-SSA1-2010)

Microorganismo	Límite
Coliformes totales (UFC/ g)	100
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/ g)	1000
Hongos y levaduras (UFC/ g)	500
<i>Escherichia coli</i> (UFC/ g)	100
<i>Salmonella</i> spp. en 25 g	Ausente
<i>Vibrio cholerae</i> en 25 g	Ausente
<i>Listeria monocytogenes</i> en 25 g	Ausente
Toxina botulínica	Negativa

1.2.2. Queso probiótico

Los alimentos probióticos son: “Aquellos que contienen microorganismos probióticos viables dentro de una matriz adecuada y en una concentración suficiente, los cuales después de su ingestión, se obtienen los efectos deseados, y están más allá de proporcionar los nutrientes que usualmente proveen” (De Vrese y Schrezenmeir, 2008).

Comercialmente, las leches fermentadas con probióticos, son aquellas que abarcan la mayor parte del mercado mundial. Los quesos se están convirtiendo rápidamente en un vehículo de éxito para las bacterias probióticas, debido a ciertas propiedades de la matriz del queso que ofrece ventajas específicas respecto a las leches fermentadas. La matriz alimenticia tiene un papel decisivo en la viabilidad de las células durante el proceso de manufactura del producto y sobre la protección de los probióticos hasta su consumo. Hay muchos factores que afectan la viabilidad de los probióticos en el yogur como las prácticas de inoculación, acidificación, post-acidificación, fermentación y condiciones de almacenamiento u oxígeno disuelto, entre otros. En este contexto, el queso tiene un gran número de ventajas sobre las leches fermentadas como un sistema portador de probióticos, en relación con las características del producto, los quesos tienen un pH mayor (rango de 4.7 a 5.6), una matriz más sólida lo que permite la exclusión de oxígeno, disponibilidad de un alto contenido de nutrientes y una protección durante el tránsito gastrointestinal. Los quesos, son un mejor vehículo para los probióticos, particularmente en aquellos que no son cocidos a altas temperaturas durante su proceso de elaboración.

Los hábitos alimenticios de los consumidores han situado a los quesos como una nueva diana para la inclusión de cultivos probióticos, esta cuestión, ha impulsado el uso de queso como una matriz de suministro para las bacterias probióticas, ya que el queso es casi universalmente incorporado en las dietas de muchas personas, lo cual hace razonable desearlo como vehículo de probióticos aquellos alimentos que son consumidos regularmente.

Se debe tomar en cuenta que la adición de probióticos a un queso no es suficiente para que el producto sea considerado como un alimento probiótico, estudios en animales y humanos son obligatorios con el fin de demostrar que los quesos sirven como portadores de probióticos (Shah *et al.*, 2011). Si múltiples cepas son clínicamente probadas, debe haber una comprensión completa de las propiedades de las cepas individuales, así como pruebas de antagonismo y sinergismo entre estas cepas, a fin de determinar si un producto cepa múltiple es eficaz (Gomes *et al.*, 2009).

El desarrollo de quesos probióticos implica un conocimiento obligatorio de todos los pasos de su proceso, así como de su nivel de influencia (positiva o negativa) en la supervivencia de estos microorganismos a lo largo de su vida de anaquel (Gomes *et al.*, 2009).

1.2.2.1. Consideraciones tecnológicas para el queso probiótico

El mayor reto asociado con la aplicación de cultivos probióticos en el desarrollo de alimentos funcionales es el mantenimiento de su viabilidad durante su proceso. Los microorganismos probióticos deben ser tecnológicamente adecuados para la incorporación en los alimentos de manera que mantengan su viabilidad y eficacia

dentro del producto (en escala industrial) hasta su consumo. Los probióticos también deben ser capaces de sobrevivir aplicaciones industriales estandarizadas en los protocolos de procesos de manufactura alimenticia o farmacéutica y deben sobrevivir o mantenerse en altos niveles en los productos durante su vida de anaquel. Estas cepas, deben ser tecnológicamente compatibles con el proceso de manufactura del alimento de interés.

Además, las cepas probióticas para la incorporación en alimentos para consumo humano deben ser GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros) y no deben permitir cambios indeseables desde el punto de vista sensorial como el sabor, aroma, textura y otros atributos importantes específicos de cada producto alimenticio. Un queso probiótico debe de tener el mismo rendimiento que un queso convencional: la incorporación de microorganismos probióticos no debe implicar una pérdida en la calidad del producto.

Existen cinco aspectos que tienen una influencia directa en el mantenimiento de la actividad funcional de las bacterias probióticas en queso: adición del inóculo probiótico, salado, envase, madurado y condiciones de almacenamiento (Tabla 1.2.).

- Adición del inóculo probiótico

Existen dos opciones para la adición de los probióticos durante el proceso de manufactura del queso: los probióticos pueden ser adicionados antes de la fermentación junto con los iniciadores o después de esta etapa. La primera opción implica que deben hacerse pruebas preliminares para saber la cantidad de células probióticas que se pierden durante el desuerado. Si la segunda opción es

escogida, debe de llevarse a cabo una refrigeración inmediata para que la actividad metabólica de los iniciadores y de los probióticos sea drásticamente reducida a esa temperatura. La cantidad ideal que debe de adicionarse del inóculo probiótico debe ser controlada de acuerdo al proceso. Con el fin de elegir y tomar la mejor opción para la adición de los probióticos, es importante analizar todos los pasos involucrados en el proceso tradicional de elaboración del queso (Gomes *et al.*, 2009).

- Salado

La sal ejerce un efecto sobre el mejoramiento de los atributos sensoriales de los quesos. Está bien conocido que la sobrevivencia de los microorganismos está restringida por la cantidad de sal presente en el queso. Se ha reportado que la viabilidad de las bacterias probióticas se reduce drásticamente cuando la concentración de sal en el producto está por encima del 4% (p/p). Por lo tanto, quesos que presenten de forma natural un alto contenido de sal deben tener su procesamiento optimizado para mantener en estado funcional las bacterias probióticas.

Otra opción es buscar formas de proteger a los probióticos de ambientes hostiles. Una alternativa es su microencapsulación (Gomes *et al.*, 2009).

- Envase

El sistema en envase debe ser considerado como una parte importante dentro del proceso de alimentos lácteos con probióticos y debe de tomarse en consideración para mejorar la estabilidad de los probióticos en el alimento. En general, los alimentos lácteos con probióticos, se envasan en películas plásticas que tienen

diferentes permeabilidades al oxígeno. Esto resulta ser un problema, porque la mayoría de los miembros de este grupo microbiano son sensibles al oxígeno. Por lo tanto, se deben elegir películas plásticas que presenten una baja permeabilidad al oxígeno como alternativa para este tipo de alimentos (Gomes *et al.*, 2009).

Tabla 1.2. *Obstáculos tecnológicos en el proceso de queso probiótico* (Gomes *et al.*, 2009).

Paso	Problema	Solución posible
Adición del inóculo probiótico	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Interacciones de probióticos e iniciadores pueden causar un efecto negativo. ✓ Pérdida de la viabilidad de probióticos durante el desuerado. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Pruebas preliminares para escoger la mejor mezcla de probióticos e iniciadores. ✓ Uso de cepas del mismo proveedor. ✓ Revisar diferentes momentos en la adición del inóculo (observando el impacto en el costo final de la producción y la sobrevivencia del probiótico).
Salado	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Probióticos sensibles a altas concentraciones de sal. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Microencapsulación. ✓ Adecuada selección de la cepa (información aportada por el proveedor).
Envase	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Probióticos sensibles al oxígeno. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Escoger el sistema de envase adecuado: películas plásticas con baja permeabilidad al oxígeno, envase al vacío o envases activos. ✓ Adecuada selección de la cepa (información aportada por el proveedor).
Madurado	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Sobrevivencia de los probióticos a través del periodo de maduración. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Microencapsulación. ✓ Optimización del proceso de madurado a través de pruebas de maduración.
Condiciones de almacenamiento	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Inadecuadas condiciones de almacenamiento afectan la supervivencia de los probióticos. 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Estricto control de la temperatura de almacenamiento.

1.2.2.2. Queso simbiótico: Vehículo de microorganismos probióticos y fructo-oligosacáridos

El queso con probióticos ha demostrado ser una matriz favorable para su uso como alimento funcional, sin embargo, se ha visto que la viabilidad de los probióticos en una matriz alimenticia debe mantenerse e incluso aumentar con la combinación de ingredientes prebióticos, lo cual puede contribuir a su protección dentro de la matriz alimenticia y a la nutrición de un individuo una vez que entra al tracto gastrointestinal. Sin embargo, el uso de prebióticos sólo ha sido reportado en otros productos lácteos diferentes al queso, como en diversos tipos de leche fermentada (Rodrigues *et al.*, 2011).

1.2.3. Alimentos funcionales

Actualmente existe una estrecha relación entre la dieta y la salud. A pesar de que el rol primario de la dieta es proveer los nutrientes que requiere el metabolismo humano, el uso de alimentos que mejoren el estado de salud de las personas, es una idea que ha ido incrementándose en las últimas 3 décadas en todo el mundo (Figuroa-González *et al.*, 2011).

El término “Alimento funcional” fue definido inicialmente en Japón durante la década de 1980 para alimentos con un uso específico para la salud (FOSHU). Este término se usa para describir aquellos alimentos o nutrimentos cuya ingestión permite cambios fisiológicos benéficos importantes en el cuerpo humano, los cuales están separados y son distintos de aquellos que cumplen su función como proveedores de nutrimentos.

Los alimentos funcionales, más allá de aportar las necesidades nutrimentales del cuerpo humano, proveen beneficios adicionales a la salud como reducir el riesgo de enfermedades o promover una salud óptima (Granato *et al.*, 2010).

La funcionalidad de estos alimentos se basa en componentes bioactivos, que a menudo están de forma natural en el producto, pero por lo general requieren la adición de un ingrediente específico con el fin de optimizar las propiedades benéficas. Estos ingredientes incluyen: prebióticos, probióticos, antioxidantes, vitaminas y minerales que son utilizados en productos lácteos fermentados como yogurt, bebidas energéticas, aderezos para ensaladas, comida para bebés, dulces, chocolates y gomas de mascar (Figuerola-González *et al.*, 2011).

Los alimentos funcionales incluyen: prebióticos, probióticos y simbióticos. (Champagne y Gardner, 2005).

1.2.3.1. Prebióticos

Son ingredientes alimenticios que estimulan selectivamente el crecimiento, y/o la actividad de las bacterias que tienen propiedades promotoras de la salud del hospedero. En la actualidad, la gran mayoría de éstos son oligosacáridos no digeribles, de los cuales los galacto-oligosacáridos (GOS), la lactulosa, las inulinas y sus fructo-oligosacáridos (FOS) han sido los más ampliamente estudiados (Steed *et al.*, 2008).

Los tres aspectos fundamentales para considerarse como prebióticos son:

- i) No digeribles: Resistencia a los ácidos gástricos, digestión enzimática y absorción intestinal (de Vrese y Schrezenmeir, 2008).
- ii) Fermentación por la microbiota del intestino.

iii) Efectos selectivos sobre la microbiota que es tá as ociada c on efectos promotores de la salud (Figueroa-González *et al.*, 2011).

Los carbohidratos prebióticos son fibra dietética, ya que no son digeridos por las enzimas humanas pero pueden ser fermentados por la microbiota del intestino grueso. Lo cual incrementa la biomasa, la consistencia de las heces fecales y la frecuencia de evacuación; generando así, un efecto positivo sobre la constipación y la salud de la mucosa del intestino grueso (De Vrese y Schrezenmeir, 2008).

La fermentación de prebióticos en el colon da lugar a un gran número de efectos fisiológicos incluyendo:

- ✓ Aumento del número de bifidobacterias en el colon.
- ✓ Aumento de la absorción de calcio.
- ✓ Aumento del peso fecal.
- ✓ Acortamiento de la duración del tránsito gastrointestinal.
- ✓ Una posible reducción de los niveles de lípidos en sangre (Guías prácticas de la OMGE, 2008).

Otros efectos indirectos que causan las fibras dietéticas por mediación de la microbiota intestinal, son la prevención de cáncer de colon, causan efectos positivos sobre el metabolismo de lípidos, estimulan la absorción de minerales y tienen propiedades inmunomodulatorias (De Vrese y Schrezenmeir, 2008).

Se han documentado diversos experimentos con prebióticos en humanos y animales que han demostrado el efecto positivo que causan cuando se encuentran en cantidades relativamente bajas (5-20 g/ día) de lactulosa, inulina, FOS y GOS

sobre la composición de la microbiota existente en los hospederos (Steed *et al.*, 2008).

Los efectos funcionales de los prebióticos sobre la microbiota del intestino incluyen: modificación de la microbiota del mismo, mantenimiento de la mucosa con la capacidad de prevenir la activación de patógenos, modificación de proteínas de la dieta por la microbiota intestinal, reducir el riesgo de la inducción de tumores debido a la mejora de la actividad enzimática bacteriana y mejoramiento de la permeabilidad de la mucosa del intestino (Miremadi y Shah, 2012).

La ingestión de altas cantidades de prebióticos puede causar flatulencias, desórdenes abdominales y diarrea, en general, 10 a 20 g de oligofruktosa o inulina independientemente si se adquiere en forma sólida o líquida se considera que no causa efectos secundarios (De Vrese y Schrezenmeir, 2008).

Es importante enfatizar que estos compuestos pueden ser adicionados a los alimentos con el fin de incrementar la ingestión de fibra, para lo cual los niveles se encuentran entre 3 y 6 g por porción o para causar un efecto bifidogénico en cuyo caso 3 a 8 g por porción son la cantidad considerada apropiada. También pueden ser adicionados por sus capacidades tecnológicas intrínsecas como endulzantes de bajo aporte calórico o sustitutos de grasa (Rodrigues *et al.*, 2011).

1.2.3.2 Simbióticos

Los probióticos presentan competencia con la microbiota propia del intestino y que ocupan parte de los nichos ecológicos. Esto ha llevado al desarrollo de los alimentos simbióticos que contienen combinaciones de probióticos y prebióticos,

los cuales cuando se administran en cantidades adecuadas asisten a los probióticos para establecerse en el intestino (Steed *et al.*, 2008). Estos productos pueden elevar la promoción de la salud en una forma sinérgica más allá de la que proveen los probióticos o prebióticos por separado (Rodrigues *et al.*, 2011).

Un alimento formado por probióticos y prebióticos, cuya concentración de prebiótico esté debajo del 10% con respecto al alimento, se conoce como un simbiótico (Figueroa-González *et al.*, 2011).

1.2.3.3. Probióticos

Los cultivos probióticos han sido fuertemente explotados por la industria láctea como aditivo para el desarrollo de nuevos alimentos funcionales. Tradicionalmente, los probióticos han sido incorporados al yogurt, sin embargo, productos como mayonesas, pastas, cárnicos, queso, leche, jugos de frutas, helados, productos hechos a base de cereales; son productos comerciales que se están incrementando en el mercado de alimentos adicionados de probióticos (Vasiljevic y Shah, 2008).

1.2.3.3.1. Definición

La palabra probiótico significa apoyo a la vida (Shah *et al.*, 2011).

Aunque el concepto de probióticos fue introducido a principios del siglo XX, el término no fue acuñado hasta la década de 1960. Parker en 1974, fue el primer autor en usar la palabra probiótico con un contexto de suplementación animal y fue definido como organismos y sustancias que contribuyen al balance de la microbiota intestinal. Fuller en 1989 definió a los probióticos como suplementos alimenticios que contienen microorganismos vivos que afectan al hospedero de

una manera positiva, contribuyendo al balance de la microbiota intestinal. Sin embargo, la definición más aceptada es: *Los probióticos son microorganismos vivos, que administrados en ciertas cantidades confieren beneficios a la salud del hospedero* (Granato *et al.*, 2010).

La Organización de Alimentos y Agricultura de las Naciones Unidas (FAO, por sus siglas en inglés: Food and Agriculture Organization of the United Nations) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definieron a los organismos probióticos en 2001 como: Aquellos microorganismos vivos, que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del hospedero.

La palabra probiótico significa apoyo a la vida (Shah *et al.*, 2011).

1.2.3.3.2. Beneficios a la salud

Un gran número de beneficios a la salud se confieren a los productos que contienen microorganismos probióticos. Algunos de los beneficios para la salud del consumidor están bien establecidos, mientras que otros beneficios han mostrado resultados prometedores en modelos animales. Sin embargo, se requieren estudios adicionales en humanos para corroborar estas afirmaciones. Los beneficios para la salud impartidos por las bacterias probióticas son cepa específicos, y no especie o género específico. Los efectos benéficos a la salud que éstos imparten son dependientes de la cepa presente en la formulación del producto. Es importante señalar que ninguna cepa proporcionará todos los beneficios propuestos, incluso no todas las cepas de la misma especie serán eficaces contra los beneficios que las bacterias probióticas confieren (Shah, 2007).

En general, para los cultivos probióticos más investigados, se han encontrado los siguientes efectos benéficos a la salud:

1. Actividad antimicrobiana e infecciones gastrointestinales.

Las bacterias probióticas producen ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas como sustancias antimicrobianas que suprimen la multiplicación de patógenos y bacterias de putrefacción. Más del 90% de los ácidos orgánicos producidos por estas bacterias, son el ácido láctico y acético, los cuales provocan la reducción del pH en el intestino proporcionando un efecto bactericida o bacteriostático (Shah, 2007).

2. Eficacia contra la diarrea.

La diarrea puede presentarse debido a varias causas, sin embargo, estudios realizados en seres humanos y animales, han demostrado que los probióticos disminuyen y/o previenen la presencia de diarrea. Los mecanismos por los cuales las bacterias probióticas reducen la duración o aparición de la diarrea son desconocidos, pero se atribuyen a diversas causas: los probióticos restauran el balance de la microbiota intestinal, pueden inhibir el crecimiento y la adhesión de un gran número de enteropatógenos y los probióticos aumentan la respuesta del sistema inmune (Vasiljevic y Shah, 2008).

3. Mejora del metabolismo de lactosa.

La enzima β -D-galactosidasa es la encargada de la hidrólisis de la lactosa, la deficiencia de esta enzima es la que causa una mala absorción de la misma. Algunas cepas de probióticos producen cantidades altas de β -D-galactosidasa, lo

cual permite la reducción de los niveles de la lactosa en los productos fermentados (Shah, 2007).

4. Propiedades antimutagénicas.

Se ha reportado que los organismos probióticos ligan agentes mutagénicos a la superficie celular. También se ha reportado que reducen la actividad fecal enzimática incluyendo β -glucuronidasa, azeoreductasa y nitroreductasa que están relacionados en la activación de mutágenos (Shah, 2007).

5. Propiedades anticarcinogénicas.

Se determinó que el efecto anticancerígeno de las bacterias probióticas es debido a la eliminación de las fuentes de procarcinógenos (o las enzimas que permiten su formación), la mejora en el equilibrio de la microbiota intestinal, la permeabilidad intestinal normalizada (que conduce a la prevención o retraso de la absorción de toxinas), el fortalecimiento de mecanismos de barrera intestinal y la activación de factores no específicos celulares (tales como macrófagos y células asesinas naturales) (Shah, 2007).

6. Reducción del colesterol en suero.

Se ha reportado que las bacterias probióticas deconjugan sales biliares; dicha deconjugación de los ácidos biliares permite que no se absorban tan fácilmente como la contraparte conjugada de los lípidos, dando lugar a una reducción en el nivel de colesterol (Shah, 2007).

7. Infección por *Helicobacter pylori*.

H. pylori es una bacteria patógena que causa úlceras pépticas y gastritis crónica, es un habitante normal del estómago pero resulta ser una bacteria patógena

oportunistas sin causar ningún síntoma. Los probióticos no parecen erradicar *H. pylori* pero son capaces de reducir la carga bacteriana en pacientes infectados (Shah, 2007).

8. Enfermedad inflamatoria intestinal.

La enfermedad inflamatoria intestinal está relacionada con la microbiota intestinal, esta enfermedad incluye la alteración del funcionamiento de los intestinos y la inflamación de la mucosa. Los probióticos no curan esta enfermedad pero una vez que los pacientes están en remisión bajo tratamiento de los corticoesteroides, los probióticos reducen la incidencia de una recaída y disminuyen el uso de corticoesteroides, lo cual mejora la calidad de vida de los pacientes (Shah, 2007).

9. Estimulación del sistema inmune.

El intestino es el órgano más grande del sistema inmune y la microbiota intestinal junto con la actividad metabólica del intestino son equivalentes a la del hígado. Los probióticos influyen sobre la función del sistema inmune ya que inducen la producción de células pertenecientes a este sistema. La ingestión de un probiótico ha reportado estimular la producción de citoquinas en células sanguíneas que elevan la actividad de los macrófagos (Shah, 2007).

Tabla 1.3. Efectos benéficos de los probióticos (Shah et al., 2011).

Efecto benéfico	Ejemplo
Regulación de la homeostásis microbiana intestinal	Prevención de la diarrea causada por <i>Clostridium difficile</i>
Supresión de patógenos	Disminución de colonias de enteropatógenos por la generación de ácido láctico
Mantenimiento de la función de barrera intestinal	Estimulación de la producción de mucosa
Mejora de la digestión	Mejoran el metabolismo de la lactosa en individuos intolerantes
Inhibición de la producción de carcinógenos	Prevención de cáncer de colón y vejiga
Metabolismo de lípidos	Control del colesterol sérico
Control de la obesidad	Coadyuvan en el tratamiento de hígado graso

1.2.3.3.3. Criterios de selección para las cepas probióticas

La base para la elección de microorganismos probióticos incluye los siguientes aspectos:

1. Inocuidad.

Los aspectos dentro de este criterio incluyen las siguientes especificaciones:

- i. Las cepas deben de ser preferentemente de origen humano. Esto se debe a que una bacteria puede funcionar mejor si se encuentra en un ambiente similar del que proviene.
- ii. Por lo tanto, deben ser aisladas del tracto gastro intestinal (GI) de humanos sanos.
- iii. Deben tener una historia documentada que demuestre su inocuidad.
- iv. No deben tener historia de alguna asociación con enfermedades como endocarditis infecciosa o desórdenes del tracto gastrointestinal.
- v. No deben llevar genes trasmisibles de resistencia a antibióticos.

2. Funcionalidad.

Los requisitos funcionales de los probióticos deben establecerse mediante el uso de métodos “*in vitro*” y los resultados de estos estudios deben reflejarse en estudios controlados en humanos. Durante la selección de una cepa probiótica deben tomarse en cuenta los siguientes aspectos de funcionalidad:

- i. Ser resistentes al paso por el GI, incluyendo el pH ácido del estómago y sales biliares.
- ii. Capacidad de adhesión a la superficie epitelial del intestino y presentar persistencia en el GI.
- iii. Presentar inmunestimulación del intestino, pero no tener efectos proinflamatorios.
- iv. Tener actividad antagonista contra patógenos como *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* y *Clostridium difficile*.
- v. Poseer propiedades antimutagénicas y anticarcinogénicas (Saarela, 2000).

3. Aspectos tecnológicos.

Estas propiedades además de estar relacionadas con la viabilidad y estabilidad durante la producción y almacenamiento de un alimento y durante su liberación en el sitio de actividad (intestino grueso), también deben referirse a aquellas propiedades que estimularán su supervivencia y persistencia en el GI.

Los aspectos tecnológicos en la selección de un microorganismo probiótico son:

- i. No deben de aportar sabores o texturas a los productos.
- ii. Capacidad verificada de mantener su viabilidad.

- iii. Mantenimiento de las propiedades de colonización durante el proceso y almacenamiento del producto.
- iv. Mantener la viabilidad de manera que no se dañe la célula durante el proceso de elaboración del alimento.
- v. Presentar estabilidad de las características deseadas en la cepa durante el procesamiento, almacenamiento y consumo del producto que los contiene.
- vi. Obtener características deseables o ganolépticas cuando se incluyen en procesos industriales (Shah *et al.*, 2011).

1.2.3.3.4. Microorganismos considerados probióticos

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son las más representativas de los microorganismos considerados como probióticos tanto para alimentos como para su utilización como productos farmacéuticos. Debido a que algunas especies de BAL están asociadas con el cuerpo humano como la cavidad oral, el tracto gastrointestinal y la vagina, hace de estas BAL los candidatos ideales para su aplicación como probióticos. Los lactobacilos típicos asociados con el GI pueden dividirse en 3 grupos:

- a) Grupo de los *Lactobacillus acidophilus*, el cual contiene las especies más cercanamente relacionadas.
- b) Grupo *L.salivarius*
- c) Grupo *L.casei*

Adicionado a estos grupos, *L.reuteri* y *L.fermentum* son los lactobacilos heterofermentativos asociados con el GI.

Otras especies microbianas que tienen aplicaciones como probióticos en productos son los que pertenecen al género *Bifidobacterium* o *Enterococcus* (Shah *et al.*, 2011).

Tabla 1.4. *Microorganismos considerados como probióticos* (Shah *et al.*, 2011)

<i>Lactobacillus</i> spp.	Enterococci	<i>Bifidobacterium</i> spp.	Otros microorganismos
<i>L.acidophilus</i>	<i>E.faecium</i>		<i>Bacillus cereus</i> var. Toyo
<i>L.amylovorus</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>B.adolescentis</i> <i>B.animalis</i> <i>B.bifidum</i> <i>B.breve</i> <i>B.'infantis'</i> * <i>B.longum</i>	<i>Escherichia coli</i> cepa Nissle <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> (<i>boulardii</i>) <i>Bacillus subtilis</i>
<i>L.crispatus</i>			
<i>L.delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>			
<i>L.fermentum</i>			
<i>L.gallinarum</i>			
<i>L.gasseri</i>			
<i>L.helveticus</i>			
<i>L.johnsonii</i>			
<i>L.paracasei</i>			
<i>L.casei</i>			
<i>L.platarum</i>			
<i>L.reuteri</i>			
<i>L.rhamnosus</i>			
<i>L.salivarius</i>			

* Recientemente unificado bajo *B.longum*

1.2.3.3.5. Ingesta recomendada

Si bien en muchos productos de venta libre proporcionan entre 1×10^{10} y 1×10^9 UFC/ g ó mL por ingesta, algunos productos han demostrado ser eficaces a niveles más bajos, mientras que otros requieren cantidades mucho mayores. Sin embargo, la cantidad tiene que estar basada a partir de estudios en humanos que demuestren un beneficio a la salud (Guías prácticas de la OMGE, 2008).

A pesar de que no existe una definición legal regulatoria que indique los valores requeridos de probióticos en alimentos, se sabe que las cantidades requeridas

para que causen su eficacia dependen de la cepa y el tipo de matriz alimentaria. Un consumo diario de 100 g ó 100 mL de alimento que contenga poblaciones de culturas probióticas en un nivel de 10^6 a 10^8 UFC/ g_{alimento} puede proporcionar una cantidad de 10^8 a 10^{10} UFC/ día, cantidad que ha demostrado ser suficiente para causar un efecto terapéutico (Escobar *et al.*, 2012).

Las características particulares de cada alimento usado como vehículo de bacterias probióticas como: composición química, proceso de manufactura y condiciones de almacenamiento, deben de tomarse en cuenta antes de determinar la cantidad mínima de bacterias probióticas que debe llevar el alimento probiótico para considerarse como tal (Vinderola *et al.*, 2009).

1.2.4. Características generales de los probióticos utilizados en el queso funcional

Las BAL son una clase funcional de bacterias fermentadoras, no patógenas, no toxigénicas, Gram-positivas, catalasa-negativas; caracterizadas por producir ácido láctico a partir de carbohidratos lo que las hace útiles para la fermentación de alimentos. En este grupo se incluyen las especies de *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Streptococcus*. Muchos probióticos también son BAL, pero algunos probióticos tales como ciertas cepas de *E.coli* y levaduras usadas como probióticos no lo son (Guías prácticas de la OMGE, 2008).

1.2.4.1. Lactobacillus casei

Lactobacillus casei es un bacilo Gram-positivo ordenado en cadenas. No forma esporas y es inmóvil. La célula mide alrededor de $0.7 - 1.1 \times 2.0 - 4.0 \mu\text{m}$. Es una bacteria anaerobia facultativa lo que significa que es capaz de crecer en ausencia

y presencia de oxígeno (Martínez, 2005). Es un microorganismo organótrofo con metabolismo homofermentativo y se clasifica dentro de las BAL. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30°C y su pH óptimo es de 5.5, sin embargo se ha observado que es un microorganismo que puede crecer en un rango amplio de temperatura y pH (Isolauri, 1991).

Lactobacillus casei habita en la boca e intestino de algunos animales ya que resiste el ácido gástrico y sales biliares presentes en el GI.

Los estudios han demostrado que es una bacteria que produce beneficios a la salud y no presenta patogenicidad, es por eso que es considerada como una bacteria probiótica.

L.casei produce D-ácido láctico y amilasa, compuestos que complementan el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* cuando *L.casei* se encuentra en mezcla con este microorganismo (Martínez, 2005).

Lactobacillus casei es un probiótico frecuentemente utilizado dentro de alimentos, ya sea individualmente o en mezcla con otros probióticos, sin embargo se ha demostrado que este microorganismo es más apto para mantener su viabilidad y sus características benéficas en ambientes como queso fresco, debido a las características fisicoquímicas que éste posee (Vinderola *et al.*, 2000).

1.2.4.2. *Lactobacillus acidophilus*

Lactobacillus acidophilus es un bacilo Gram-positivo, no esporulado y con una longitud entre 2-10 µm. Es una bacteria anaerobia facultativa y crece a un pH menor a 5 (Martínez, 2005).

El crecimiento de *L.acidophilus* ocurre a temperaturas altas como 45°C, si embargo, su temperatura óptima de crecimiento está entre 35 – 40°C (Shah, 2007).

Es homofermentativo, lo que significa que produce únicamente ácido láctico a partir de la fermentación de carbohidratos. Debido a que requiere carbohidratos para su fermentación, habita en ambientes como el intestino animal aunque también se encuentra en la boca y en la vagina. Esta bacteria crece de forma natural en una gran variedad de alimentos como carne, pescado y cereales.

El ácido producido por esta bacteria puede ayudar a controlar el crecimiento de *Candida albicans*, que causa una candidiasis oral e infecciones vaginales.

L.acidophilus no es una bacteria patógena y al igual que *L.casei* tiene efectos benéficos a la salud, por lo cual se considera un microorganismo probiótico (Martínez, 2005).

L.acidophilus es el organismo más comúnmente sugerido para su uso como probiótico en alimentos. Tiende a crecer lentamente en leche. Contrariamente a lo deseado, muchas cepas de *L.acidophilus* no sobreviven bien en leches fermentadas debido al pH bajo y es difícil mantener altos números del microorganismo en estos productos. El bajo crecimiento está relacionado con la baja concentración de péptidos cortos y aminoácidos libres en la leche, los cuales son insuficientes para soportar el crecimiento bacteriano.

L.acidophilus tiene efectos antagonistas contra *Escherichia coli* enteropatogénica, *Salmonella thyphimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium perfringens*.

Produce bacteriocinas y sustancias antibacterianas como lactocidina, acidolina, acidofilina, lactacium-B y proteínas inhibitorias (Shah, 2007).

1.2.4.3. Medios de cultivo utilizados para el cultivo de probióticos

La presencia de varias especies cercanas en productos que contienen mezclas de microorganismos probióticos, hace la enumeración diferencial de estos microorganismos difícil debido a la similitud de los requerimientos de crecimiento y la superposición de los perfiles bioquímicos de las especies (Tabasco *et al.*, 2007).

En el pasado no era posible cuantificar de manera adecuada las bacterias probióticas debido a la falta de medios de cultivo adecuados. Sin embargo, actualmente se han desarrollado medios de cultivo que consideran el tipo de alimento, las características de las especies o cepas, así como la naturaleza de la competencia entre géneros (Villaruel, 2011).

Tradicionalmente las BAL se cuentan en agar para lactobacilos de Man, Rogosa y Sharpe (agar MRS), pero este medio no es selectivo para la enumeración de microorganismos probióticos cuando se encuentran microorganismos iniciadores no probióticos. La efectividad del aislamiento depende de la formulación de l medio, las condiciones de incubación: tiempo, temperatura y atmósfera; así como del tipo de nutrimento en cuestión (Gianni, 2009). Se han propuesto un gran número de medios de cultivo para la enumeración selectiva y diferencial de los lactobacilos en poblaciones bacterianas mixtas, a continuación se muestra un resumen con los medios de cultivo que han demostrado tener un buen resultado sobre la cuantificación y recuperación de microorganismos probióticos.

Tabla 1.5. Resumen de medios utilizados para el cultivo-diferenciación de probióticos

Medio	Población mixta existente	Componentes	Condiciones	Microorganismo que identifica	Aspectos a tomar en cuenta	Referencia
CLBS (Agar celobiosa selectivo para <i>Lactobacillus</i>)	<i>S.thermophilus</i> <i>L.delb. bulgaricus</i> <i>L.acidophilus</i> <i>L.casei</i>	LBS modificado (Baltimore Biological Laboratories), la glucosa se reemplaza por celobiosa	37°C 48 h Anaerobiosis	<i>L.acidophilus</i> <i>L.casei</i>	Preparación por ingredientes individuales. La celobiosa debe esterilizarse por filtración.	(Coeuret <i>et al.</i> , 2003) (Nighswonger <i>et al.</i> , 1996)
MRS-Salicina	<i>S.thermophilus</i> <i>L.delb. bulgaricus</i> <i>L.acidophilus</i> <i>L.casei</i>	MRS adicionado con salicina al 0.5%	37°C 48 h Anaerobiosis	<i>L.acidophilus</i> <i>L.casei</i>	La salicina debe esterilizarse por filtración. Selectivo para cuantificar <i>L.acidophilus</i> y <i>L.casei</i> cuando están en presencia de otras BAL. No diferencia uno de los dos por separado.	(Shah, 2000)

Tabla 1.5. (Continuación). Resumen de medios utilizados para el cultivo-diferenciación de probióticos

Medio	Población mixta existente	Componentes	Condiciones	Microorganismo que identifica	Aspectos a tomar en cuenta	Referencia
MRS-Sorbitol	<i>S.thermophilus</i> <i>L.delb. bulgaricus</i> <i>L.acidophilus</i> <i>L.casei</i>	MRS + sorbitol al 10%	37°C 48 h Anaerobiosis	<i>L.acidophilus</i> <i>L.casei</i>	El sorbitol debe esterilizarse por filtración. Selectivo para cuantificar <i>L.acidophilus</i> y <i>L.casei</i> cuando están en presencia de otras BAL. No diferencia uno de los dos por separado.	(Coeuret et al., 2003) (Ravula y Shah, 1998)
Agar LP-MRS	<i>Bifidobacterium</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L.casei</i>	MRS adicionado con Cloruro de litio al 0.2% y Propionato de sodio al 0.3%	37°C 72 h Anaerobiosis	<i>L. acidophilus</i> <i>L.casei</i>	Enumeración selectiva y diferencial de ambos probióticos por el tamaño y color de las colonias: <i>L.casei</i> : Colonias redondas blanco cremoso con diámetro entre 1.1 a 2.4 mm	(Vinderola y Reinheimer, 2000)

Tabla 1.5. (Continuación). Resumen de medios utilizados para el cultivo-diferenciación de probióticos

Medio	Población mixta existente	Componentes	Condiciones	Microorganismo que identifica	Aspectos a tomar en cuenta	Referencia
LC (Agar <i>L.casei</i>)	<i>S.thermophilus</i> <i>L.delb. bulgaricus</i> <i>L.acidophilus</i> <i>L.casei</i>	10.0g bactopeptona 1.0g extracto levadura 4.0g Lab Lemco 2.0g KH ₂ PO ₄ 3.0g acetato de sodio 1.0g citrato de triamonio 0.2g MgSO ₄ 0.05g MnSO ₄ 1.0g hidrolizado ácido de caseína 1.0g tween 80 6mL de verde de bromocresol 12g agar bacteriológico	27°C 48 h Anaerobiosis	<i>L.casei</i>	Medio por componentes. Gran diversidad de componentes. Esterilización por filtración. Sólo distingue a <i>L.casei</i> .	(Ravula y Shah, 1998)

Tabla 1.5. (Continuación). Resumen de medios utilizados para el cultivo-diferenciación de probióticos

Medio	Población mixta existente	Componentes	Condiciones	Microorganismo que identifica	Aspectos a tomar en cuenta	Referencia
Agar Bilis-MRS	<i>Bifidobacterium</i> <i>L.acidophilus</i> <i>L.casei</i>	MRS adicionado con 0.15 % de sales biliares	37°C 72 h Anaerobiosis	<i>L.acidophilus</i> <i>L.casei</i>	Enumeración selectiva y diferencial de ambos probióticos por el tamaño y color de las colonias: <i>L.casei</i> : Colonias redondas blanco cremoso con diámetro entre 0.9 a 1.3mm. <i>L.acidophilus</i> : Colonias irregulares café translúcido con diámetro de 0.9 a 1.5mm	(Vinderola y Reinheimer, 2000) (Rabia y Shah, 2011).
MRS-V (vancomicina)	Iniciadores de queso* <i>L.acidophilus</i> <i>L.casei</i> <i>L.rhamnosus</i>	MRS adicionado de vancomicina 1 ppm	37°C 72 h Anaerobiosis	<i>L.casei</i>	Vancomicina esterilización por filtración. Buena recuperación de <i>L.casei</i>	(Tharmaraj y Shah, 2003).

Tabla 1.5. (Continuación). Resumen de medios utilizados para el cultivo-diferenciación de probióticos

Medio	Población mixta existente	Componentes	Condiciones	Microorganismo que identifica	Aspectos a tomar en cuenta	Referencia
MRS-S (sorbitol)	Iniciadores de queso* <i>L.acidophilus</i> <i>L.casei</i>	MRS adicionado con 10 g/ L de sorbitol	43°C 48 h Anaerobiosis	<i>L.acidophilus</i>	El sorbitol se esteriliza por filtración. Buena recuperación de <i>L.acidophilus</i> pero cuando son adicionadas diferentes cepas de la misma especie el recuento en placa provoca una resolución baja para diferenciar las colonias presentes	(Oberg et al., 2011) (Dave y Shah, 1996)
MRS-NaCl	<i>S.thermophilus</i> <i>L.delb. bulgaricus</i> <i>L.acidophilus</i> <i>L.casei</i> Bifidobacteria <i>L.rhamnosus</i> Propionibacteria	MRS adicionado con 4% de NaCl	37°C 72 h Anaerobiosis	<i>L.casei</i>	Medio de fácil preparación. Buena recuperación de <i>L.casei</i>	(Tharmaraj y Shah, 2003).

Tabla 1.5. (Continuación). Resumen de medios utilizados para el cultivo-diferenciación de probióticos

Medio	Población mixta existente	Componentes	Condiciones	Microorganismo que identifica	Aspectos a tomar en cuenta	Referencia
MRS-LiCl	<i>S.thermophilus</i> <i>L.delb. bulgaricus</i> <i>L.acidophilus</i> <i>L.casei</i> Bifidobacteria <i>L.rhamnosus</i> Propionibacteria	MRS adicionado con 0.5% de LiCl	37°C 72 h Anaerobiosis	<i>L.casei</i>	Medio de fácil preparación. Buena recuperación de <i>L.casei</i>	(Tharmaraj y Shah, 2003).
MRS	<i>S.thermophilus</i> <i>L.delb. bulgaricus</i> <i>L.acidophilus</i> <i>L.casei</i> Bifidobacteria <i>L.rhamnosus</i> Propionibacteria	MRS Oxoid	43°C 72h Anaerobiosis	<i>L.acidophilus</i>	Medio de fácil preparación. Buena recuperación de <i>L.acidophilus</i>	(Tharmaraj y Shah, 2003).

*De los más comúnmente presentes, solos o acompañados y no precisamente todos deben de estar presentes son: *L. helveticus*, *L. delbrueckii ssp.*, *L. lactis*, *L. delbrueckii ssp.*, *L. bulgaricus* (Coeuret et al., 2003).

1.2.5. Probióticos microencapsulados

La viabilidad de las bacterias probióticas en un producto en el momento de consumo es una consideración importante, debido a que tienen que sobrevivir durante el proceso del alimento y la vida de anaquel del mismo. La viabilidad de los probióticos en los productos fermentados se ve afectada por una serie de factores como el pH, la post-acidificación durante el almacenamiento, producción de peróxido de hidrógeno, susceptibilidad al oxígeno (permeabilidad del oxígeno a través del envase), temperaturas de almacenamiento, estabilidad en alimentos secos o congelados, pobre crecimiento del microorganismo en leche, falta de proteasas que rompan las proteínas de la leche en sustancias simples de nitrógeno y compatibilidad con los cultivos iniciadores de la fermentación. Debido a todos estos factores, proveer a los probióticos de una barrera físicoquímica contra las condiciones externas a las que se enfrentan es un punto de especial interés y su microencapsulación es una alternativa.

La microencapsulación se define como un proceso de recubrir ciertos componentes de los alimentos con materiales sólidos, líquidos y/o gaseosos; como resultado estos componentes quedan envueltos en cápsulas que los protegen de las condiciones ambientales liberándolos a las tasas deseadas cuando se cumplen determinadas condiciones (Qurat y Tariq, 2013).

La microencapsulación ayuda a separar el material de interés del ambiente adverso hasta que éste es liberado en el sitio específico de acción. La protección del material de interés aumenta su estabilidad, extiende su vida de anaquel y provee de una liberación sostenida y controlada.

La estructura formada por el agente de microencapsulación a lrededor de la sustancia de interés se conoce como pared, las propiedades de la pared se diseñan para proteger al material de interés y para liberarlo de una manera controlada bajo condiciones específicas mientras que permite que pequeñas moléculas entren y salgan a través de la membrana de protección. La microcápsula está compuesta por una membrana semipermeable, esférica, delgada y fuerte. Los nutrientes y los metabolitos pueden difundir a través de la membrana semipermeable. Esta membrana sirve como una pared celular que permite el intercambio y la liberación del material de interés mientras que reduce la contaminación.

El material de interés encapsulado se libera por varios mecanismos tal como ruptura mecánica, disolución de la pared y difusión de metabolitos a través de la misma (Kailasapathy, 2002).

1.2.5.1. Materiales utilizados para la microencapsulacion

Las microcápsulas están formadas por materiales específicos que permiten la ruptura de la cápsula sólo en una determinada parte del cuerpo humano, por lo tanto, materiales especializados son utilizados para la encapsulación de los probióticos, lo cual permite que estos materiales sólo liberen el contenido protegido en el estómago o el intestino según sea el caso requerido (Qurat y Tariq, 2013).

El recubrimiento celular debe evaluarse a nivel sensorial para el consumidor y a que debe de tomarse en cuenta la influencia del microencapsulado sobre el sabor y la textura en el producto (Shah *et al.*, 2011).

Las microcápsulas están compuestas principalmente por materiales poliméricos sintéticos o naturales (Shah *et al.*, 2011). La goma más comúnmente utilizada para la microencapsulación de las bacterias es el alginato. Otros agentes gelificantes incluyen pectinas, κ-carragenanos, goma xantana, agar, almidón, gelatina, quitosán y recubrimientos a base de proteínas (Kailasapathy, 2002) (Qurat y Tariq, 2013).

1.2.5.2. Características de la microcápsula utilizada para *L.acidophilus*

Para el microorganismo microencapsulado utilizado en este proyecto de tesis: *Lactobacillus acidophilus* cepa Probiocap™ Rosell-52 ME, 50 INSTITUT ROSELL LALLEMAND; la capa protectora está compuesta principalmente por una sustancia formada de lípidos, particularmente ácidos grasos o ceras, que se encuentran puros o mezclados. La característica principal de la microcápsula es que su punto de fusión está entre 20 °C a 100 °C. Los ácidos grasos principalmente utilizados son el ácido esteárico. El ácido palmítico también puede ser utilizado para darle cualidades tecnológicas para su uso en la industria. Para este tipo de recubrimiento utilizado, es posible adicionarle otras moléculas tales como antioxidantes, carbohidratos o proteínas, que funcionan para aumentar la estabilidad del microorganismo durante su procesamiento y su preservación.

El método de revestimiento utilizado para la microcápsula de *L.acidophilus* está constituido por una sustancia hidrófoba fundida que tiene un punto de fusión superior a 60 °C. Durante el proceso de revestimiento, el recubrimiento se inyecta a una temperatura de por lo menos 5 °C mayor que la temperatura de fusión de dicha sustancia hidrófoba, siendo ésta entre 65 °C y 120 °C, en una cámara que contiene dichos microorganismos liofilizados los cuales se agitan por rotación a

500 rpm en la base de dicha cámara y son barridos por un flujo de aire a una temperatura entre 10 °C y 50 °C, dicho flujo de aire tiene una temperatura en la cámara que no supera en más de 5 °C la temperatura de viabilidad de dicho microorganismo, obteniendo así, partículas hechas de un grupo de microorganismos vivos deshidratados y una capa de recubrimiento hidrófoba homogénea (Durand *et al.*, 2007).

1.2.6. Microorganismos indicadores

Existen protocolos experimentales que han conducido al uso generalizado de grupos de microorganismos que son fácilmente detectados y enumerados, y cuya presencia en los alimentos indica la exposición a condiciones que podrían introducir organismos peligrosos y permitir la proliferación de especies infecciosas o tóxicas (ICMSF, 1978). La detección en el laboratorio de estos microorganismos es más sencilla, rápida y/o económica (Camacho *et al.*, 2011). Estos grupos se denominan “microorganismos indicadores” y tienen valor en la evaluación de la seguridad microbiológica y la calidad de los alimentos. El análisis microbiológico de los alimentos permite comprobar la calidad de las prácticas de elaboración del alimento y la seguridad de liberar el producto al mercado (ICMSF, 1978).

Los principales microorganismos indicadores en alimentos son:

- Indicadores de condiciones de manejo o de eficiencia de proceso:

Mesófilos aerobios

Hongos y levaduras

Coliformes totales

- Indicadores de contaminación fecal:

E. coli

Enterococos

Clostridium perfringens (Camacho *et al.*, 2011)

La selección de indicadores en un alimento depende fundamentalmente de los riesgos implicados y de lo que se requiera saber para liberar, controlar o mejorar el alimento, manteniendo el enfoque preventivo (Camacho *et al.*, 2011). Sin embargo, es imperativo realizar los análisis microbiológicos de rutina correspondientes siempre que la información epidemiológica o de otro tipo de la que se disponga, sugiera o haga pensar en la presencia de un agente patógeno específico en un determinado alimento (ICMSF, 1978).

1.2.6.1. Indicadores de condiciones de manejo o de eficiencia de proceso

1.2.6.1.1. Mesofílicos aerobios

Son microorganismos que se desarrollan en presencia de aire a temperaturas de 25-40°C, siendo 37°C la óptima para su crecimiento (Madigan *et al.*, 2008).

Las razones por las cuales se identifican este tipo de microorganismos son las siguientes:

- a) Rastrear el uso de materias primas contaminadas, proceso sanitario insatisfactorio o condiciones de temperatura, tiempo y envase inadecuadas durante su almacenamiento.
- b) La mayoría de las bacterias conocidas que causan enfermedades transmitidas por los alimentos son mesófilas por lo que, en algunas instancias la cuenta en placa contribuye a detectarlas. La presencia de altos

números de mesófilos aerobios puede ir relacionada con la presencia de microorganismos patógenos.

- c) Identificar el deterioro de los alimentos debido a la presencia de altos números de microorganismos.
- d) Se puede hacer uso de estos microorganismos como un apoyo en la predicción de la vida de anaquel del alimento.

Son muchas las razones que sostienen el uso de las bacterias mesófilas como microorganismos indicadores, sin embargo, debe tomarse en cuenta que ayudan a detectar la calidad microbiológica del alimento pero no son un parámetro único y total que determinen dicha calidad (ICMSF, 1978).

1.2.6.1.2. Coliformes

Son enterobacterias oxidasa-negativo. Bacilos cortos, Gram-negativo, anaerobio facultativo, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas cuando se incuban a 35°C en menos de 48 h. Los géneros que integran este grupo son: *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Escherichia coli* (Camacho et al., 2011).

La presencia de coliformes indica:

1. Procesamiento inadecuado debido a malas prácticas de manufactura. Frecuentemente proveniente de materias primas contaminadas, equipo sucio o manipulación no higiénica.
2. Contaminación post-proceso y/o contaminación cruzada.
3. Contaminación microbiana que puede indicar la proliferación de un amplio rango de organismos tóxicos o patógenos (ICMSF, 1978).

1.2.6.1.3. Hongos y levaduras

Los hongos son microorganismos eucarióticos no fotosintéticos, aerobios estrictos, utilizan materia orgánica para alimentarse, inmóviles, pueden ser unicelulares o pluricelulares. La mayor parte de ellos crecen como filamentos en el sustrato formando colonias grandes y céntricas (Madigan *et al.*, 2008).

Las levaduras son microorganismos unicelulares, no filamentosos, con morfología esférica u ovalada, crecen en ambientes aeróbicos o anaeróbicos (Tortora *et al.*, 2007).

Estos microorganismos crecen más lentamente que las bacterias en los alimentos que conservan humedad. Su presencia indica contaminación de la materia prima, contaminación cruzada y/o contaminación post-proceso, mala calidad del envase y mal control de la temperatura durante su transporte y almacenamiento (ICMSF, 1978).

II. Justificación

En la actualidad, el consumidor no sólo busca obtener de los alimentos un beneficio nutricional, sino que también exige un beneficio extra para su salud, sin perder con esto la sensación agradable a los sentidos que provoca consumir un alimento, así como conservar la riqueza gastronómica de su lugar de origen. La necesidad de proveer alimentos que aporten estos beneficios ha impulsado el desarrollo de los alimentos funcionales.

El queso con sus infinitas variedades, ha llegado a ser un alimento universal, imprescindible para una alimentación sana y exigente a la vez; es un alimento atractivo para muchos paladares y adecuado para todas las edades, su versatilidad ofrece oportunidades para muchas estrategias mercadotécnicas.

El queso fresco cuenta con ciertas ventajas para ser utilizado como portador de probióticos, comparado con otros productos lácteos, se almacena en condiciones de refrigeración, tiene una vida de anaquel corta (3 semanas), su matriz sólida permite la protección de los probióticos y cuenta con un pH entre 6.5 y 6.7 cercano a la neutralidad, factores que en conjunto crean un ambiente que propicia su estabilidad durante el almacenamiento del producto.

Además, el queso fresco, es de los más recomendados por los nutriólogos debido a que representa un aporte alto de proteínas mientras que su contenido de grasa es bajo.

El queso fresco es uno de los alimentos más consumidos en el territorio mexicano, por lo que aprovechando sus ventajas de consumo, nutrimentales, tecnológicas y mercadotécnicas, se ha desarrollado un proyecto experimental de nominado: “Queso fresco como vehículo para microorganismos probióticos: Estudio de su viabilidad”, que pretende aportar al mercado un alimento que además de adaptarse a los requerimientos de la cultura mexicana a través del uso de especias autóctonas como chile jalapeño, chile chipotle y epazote, sea un alimento que aporte efectos benéficos a la salud del consumidor a través de la adición de probióticos y fibra soluble. Como consecuencia, es necesario estudiar la viabilidad de los microorganismos probióticos en las diferentes formulaciones de queso para que éstos permanezcan dentro de los niveles recomendados para que al momento de su consumo causen el efecto benéfico esperado en el consumidor. A su vez, resulta particularmente interesante, estudiar el efecto de los ingredientes como el chile y el epazote sobre la viabilidad de los probióticos, considerando que podrían tener un efecto adverso sobre éstos.

III. Hipótesis y Objetivos

3.1. Hipótesis

Si el queso es una adecuada matriz alimenticia portadora de probióticos, entonces, la cantidad de éstos con y sin microcápsula adicionada a cuatro formulaciones de queso fresco con fibra soluble y bajo en grasa (queso blanco, con chile jalapeño, con chile chipotle y con epazote) debe mantenerse en la concentración inoculada inclusive al final de la vida de para causar el efecto benéfico al consumidor.

3.2. Objetivo general

Evaluar la concentración de microorganismos probióticos presentes en diferentes formulaciones de queso fresco funcional en condiciones de refrigeración (4°C) por 3 semanas.

3.3. Objetivos particulares

- Adicionar a un queso fresco bajo en grasa con fibra soluble una mezcla de dos cepas de bacterias ácido lácticas probióticas: *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*.
- Seleccionar la etapa de adición de los probióticos, así como la cantidad de inóculo adecuado para cubrir la recomendación de ingesta diaria.
- Evaluar la concentración de los probióticos a lo largo de la vida de anaquel del queso almacenado a 4°C, mediante cuenta en placa utilizando medios selectivos para su diferenciación.

- Apoyar el análisis de la vida de anaquel mediante la determinación de parámetros microbiológicos: cuantificación de microorganismos indicadores; y parámetros fisicoquímicos: pH y acidez.
- Evaluar el comportamiento de los probióticos liofilizados y microencapsulado cuando se encuentran en presencia de ingredientes antimicrobianos: chile jalapeño, chile chipotle y epazote.

IV. Metodología

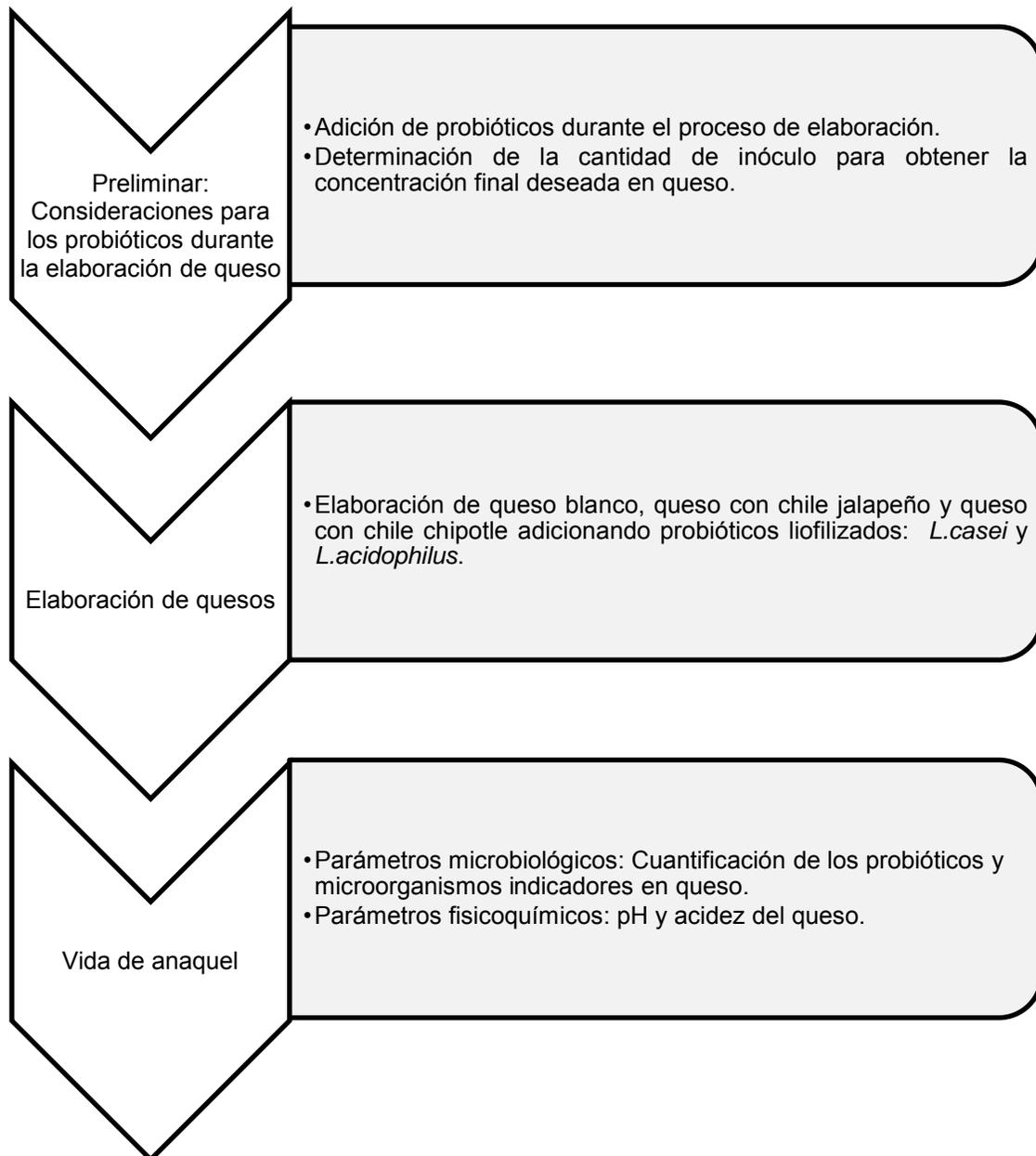


Figura 4.1. Metodología general Parte I.

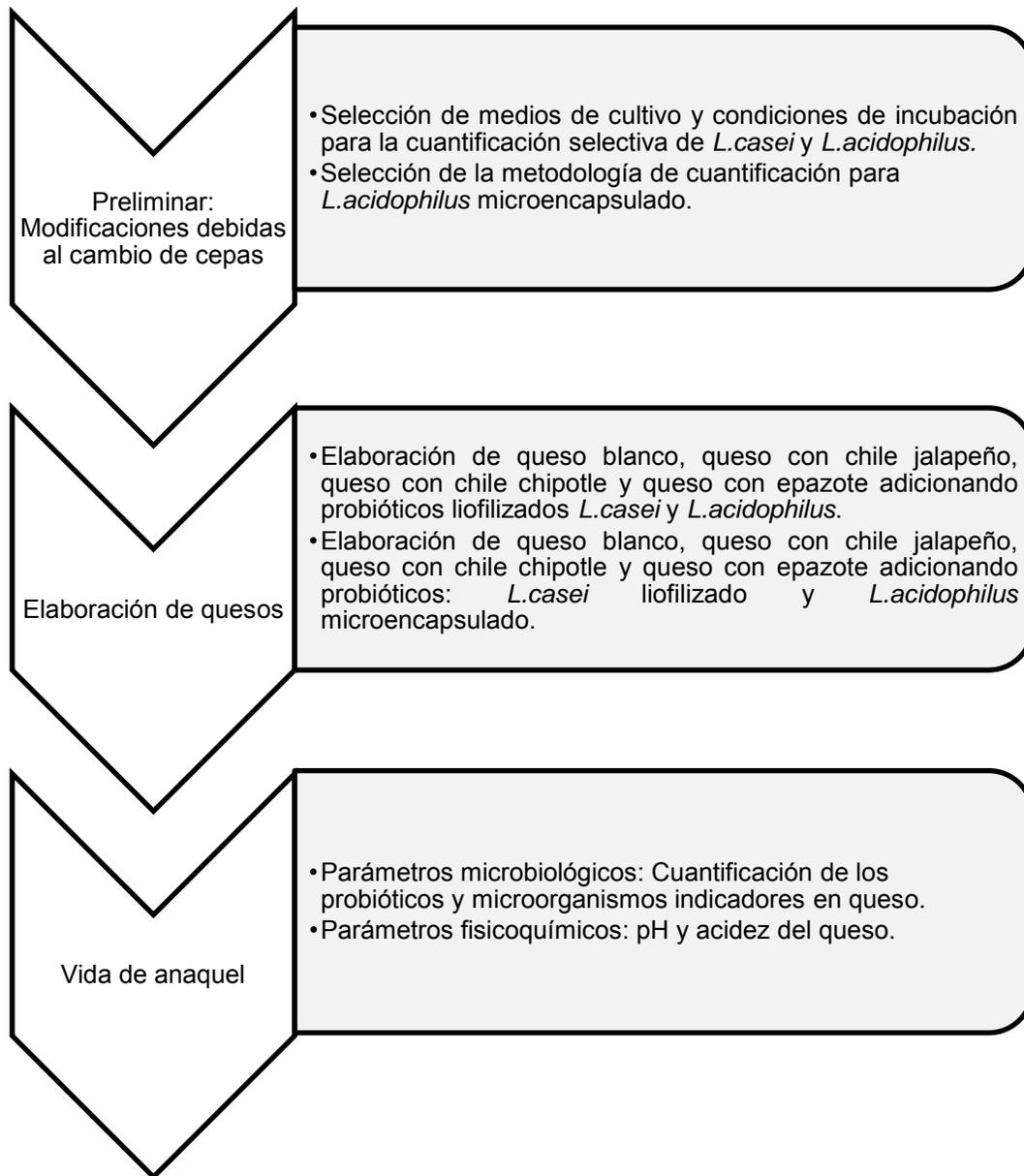


Figura 4.2. Metodología general Parte II.

La primera parte del proyecto (Figura 4.1.) se llevó a cabo con los probióticos: *Lactobacillus casei* liofilizado cepa *FD-DVS 413*[®] Probio-Tec[®] CHR HANSEN y *Lactobacillus acidophilus* liofilizado cepa *FD-DVS LA-5*[®]-Probio-Tec^T CHR HANSEN, por lo que estas cepas tenían sus medios y condiciones de incubación definidas en trabajos anteriores (Villaruel, 2011). Sin embargo, por razones ajenas al grupo de trabajo, para la segunda parte del proyecto (Figura 4.2.) se utilizaron los probióticos: *Lactobacillus casei* liofilizado cepa Rosell-215 ND-100B, *Lactobacillus acidophilus* liofilizado cepa R0052-150 y finalmente *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado cepa ProbiocapTM Rosell-52 ME, 50. Debido a este cambio, los medios de cultivo y las condiciones de incubación de los microorganismos se modificaron.

4.1. DESARROLLO DE LAS METODOLOGÍAS PARTE I

4.1.1. Preliminar

4.1.1.1. Adición de probióticos

En la Figura 4.3., se muestra el proceso general diseñado por Patlán (2012) para la elaboración de queso fresco, mientras que en la Figura 4.4., se muestra la modificación al protocolo la cual incluye la etapa de adición de los probióticos.

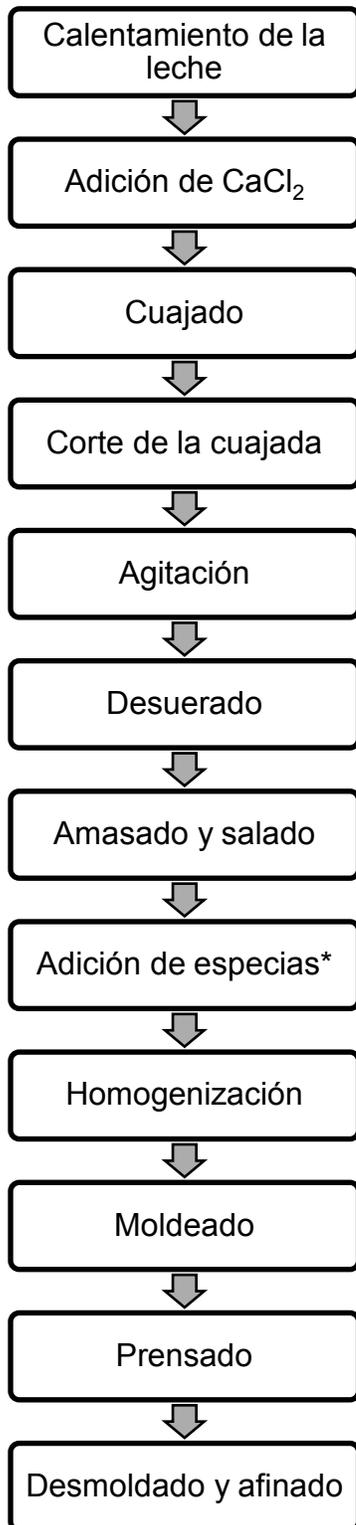


Figura 4.3. Proceso general de elaboración de queso (Patlán, 2012).
*Chile jalapeño, o chipotle, o epazote.



Figura 4.4. Proceso general de elaboración de queso con adición de probióticos. *Chile jalapeño, o chipotle, o epazote.

4.1.1.2. Determinación de la cantidad del inóculo

Los quesos elaborados deben de tener una cuenta inicial de 1×10^8 UFC/ g_{queso} de ambos probióticos, por lo que de cada probiótico debe de inocularse una cantidad de 1×10^7 UFC / g_{queso}. Para inocular esta cantidad se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{Fórmula 1} = \left(\frac{5 \times 10^7 \text{ UFC}}{\text{g queso}} \right) (\text{Rendimiento del queso})(\text{Concentración de UFC del liofilizado})$$

$$\text{Fórmula 2} = ((\text{Resultado de la Fórmula 1})(\text{Peso de la cuajada})) \times 2$$

Nota: Durante el proceso de prensado, en promedio se pierde la mitad de los probióticos inoculados en el suero liberado, por lo que, en la fórmula, esta pérdida se ajusta multiplicando por dos.

Ejemplo de Cálculo para *Lactobacillus casei* cepa *FD-DVS L.casei* 413[®] Probio-Tec[®] CHR HANSEN concentración = 5.8×10^{10} UFC/ g_{liofilizado}, con un peso de la cuajada de 419.3 g

$$\text{Fórmula 1} = \left(\frac{5 \times 10^7 \text{ UFC}}{\text{g queso}} \right) \left(\frac{80 \text{ g queso}}{100 \text{ g cuajada}} \right) \left(\frac{\text{g liofilizado}}{5.8 \times 10^{10} \text{ UFC}} \right) = \frac{6.90 \times 10^{-4} \text{ g liofilizado}}{\text{g cuajada}}$$

$$\text{Fórmula 2} = \left(\left(\frac{6.90 \times 10^{-4} \text{ g liofilizado}}{\text{g cuajada}} \right) (419.3 \text{ g}) \right) \times 2 = 0.58 \text{ g de } L.\textit{casei} \text{ liofilizado}$$

Cada vez que se elabora queso, se pesa la cuajada y el peso resultante se sustituye en la Fórmula 2, de esta manera se determina la cantidad del inóculo que debe de llevar la cuajada por cada microorganismo probiótico adicionado.

La Fórmula 1 para cada cepa utilizada se encuentra en el Anexo 4.

4.1.2. Elaboración de quesos

Las materias primas utilizadas en la elaboración del queso funcional son: leche semidescremada (1% grasa), pasteurizada y homogenizada; fibra soluble, cloruro de calcio, cuajo enzimático natural, sal de mesa, probióticos, ingredientes variables: chile jalapeño en escabeche, chile chipotle adobado y hojas de epazote. Todos los utensilios utilizados como chucharas, cuchillos, manta de cielo, viales, frascos, platos, pipetas, vasos de precipitados fueron esterilizados por calor húmedo a 121°C/15 min/ 15 lb (*Autoclave Yamato SM300*). Las ollas y otros utensilios de mayor tamaño se sanitizaron en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 0.1% durante 10 min de contacto.

El proceso de elaboración de queso se realizó siguiendo la metodología de la Figura 4.4., variando el tipo de especia utilizada, obteniendo así las variedades: queso simbiótico blanco, queso simbiótico con chile jalapeño y queso simbiótico con chile chipotle.

La cantidad de probióticos requerida para obtener una concentración final de 1×10^8 UFC/ g_{queso} entre los dos probióticos utilizados (1×10^7 UFC / g_{queso} por cada microorganismo probiótico) se realizó utilizando el procedimiento de la sección 4.1.1.2. *Determinación de la cantidad del inóculo*. Las cepas utilizadas fueron:

- a) *L.casei* en forma liofilizada, cepa *FD-DVS 413*[®] Probio-Tec[®] CHR HANSEN.
- b) *L.acidophilus* en forma liofilizada, cepa *FD-DVS LA-5*[®]- Probio-Tec^T CHR HANSEN.

4.1.3. Vida de anaquel

Se elaboraron dos lotes de cada variedad de queso, cada lote era una pieza de queso entre 270 g y 280 g, los cuales se envolvieron en papel encerado, se empacaron en bolsa de plástico con cierre hermético (*Zipper Seal Member's Marck_{MR}*) y se mantuvieron en condiciones de refrigeración (4 °C).

La vida de anaquel se siguió por 18 días (3 semanas), realizando la evaluación de parámetros microbiológicos: cuantificación de probióticos y microorganismos indicadores; y de parámetros físicoquímicos: pH y acidez. Todas las determinaciones mencionadas se realizaron por duplicado y para cada uno de los dos lotes elaborados. La frecuencia de la evaluación de los parámetros se realizó dos veces por semana, obteniendo así, 6 evaluaciones de cada lote a lo largo del tiempo de la vida de anaquel.

4.1.3.1. Evaluación de parámetros microbiológicos

4.1.3.1.1. Cuantificación de probióticos

Se determinó la cuenta en placa de los dos probióticos utilizados con las condiciones utilizadas por Villaruel (2011); mostrados en la Tabla 4.1., la cuantificación se realizó según el Anexo 1 con las siguientes condiciones:

- a) Digestión mecánica: Máxima por 2 min.
- b) Diluciones de inoculación: 10^{-5} , 10^{-6} .
- c) Medio: Agar MRS *BD DifcoTM Lactobacilli MRS agar*.
- d) Rango de sensibilidad estadísticamente confiable: 30 a 300 colonias.

Las condiciones de anaerobiosis se llevaron a cabo en jarra de anaerobiosis Anaero Jar™ AG0025A Oxoid, sistema de anaerobiosis: Anaero GEN™ 2.5 L Oxoid.

Tabla 4.1. Condiciones de incubación para la cuantificación de probióticos (Villaruel, 2011)

Microorganismo	Condiciones de incubación		
	Temperatura	Atmósfera	Tiempo
<i>L.casei</i>	30 °C	Aerobiosis	48 h
Mezcla de probióticos (<i>L.acidophilus</i> + <i>L.casei</i>)	37 °C	Anaerobiosis	72 h

L.acidophilus = Cuenta de *L.casei* – Cuenta de mezcla de probióticos

4.1.3.1.2. Cuantificación de microorganismos indicadores

La determinación de mesofílicos aerobios, hongos y levaduras se llevaron a cabo mediante métodos estándar. La cuantificación de coliformes se realizó a través de métodos rápidos: 3M™ Petrifilm™. Estas metodologías se llevaron a cabo según el Anexo 1 y el Anexo 5 respectivamente. Los medios y las condiciones de incubación para cada grupo de microorganismos indicadores se resumen en la Tabla 4.2.

Para la cuantificación de mesofílicos aerobios sólo se contabilizaron las colonias grandes para evitar cuantificar a los probióticos en caso de que crecieran en el agar cuenta estándar el cual no tiene los nutrientes suficientes que las BAL requieren sin embargo, pueden llegar a desarrollarse, pero lo hacen en forma de colonias puntiformes y en un tamaño tal que no se observan con facilidad en el medio.

Tabla 4.2. Condiciones y medios utilizados para la determinación de microorganismos indicadores

Grupo indicador	Medio	Condiciones de incubación			Diluciones inoculadas	Rango de cuantificación
		Temperatura	Atmósfera	Tiempo		
Mesofílicos aerobios	Agar cuenta estándar	37 ± 2 °C	Aerobia	48 h	10 ⁻¹ 10 ⁻²	25 a 250 UFC
Hongos y levaduras	Agar papa y dextrosa	27 ± 2 °C	Aerobia	5 días	10 ⁻¹	Hongos 10 a 150 UFC
						Levaduras 15 a 150 UFC
Coliformes	3M™ Petrifilm™ recuento de coliformes	37 ± 2 °C	Aerobia	48 h	10 ⁻¹	15 a 150 UFC

4.1.3.2. Evaluación de parámetros fisicoquímicos

4.1.3.2.1. Determinación de pH y acidez

La determinación de los parámetros fisicoquímicos se determinó siguiendo la metodología de la Norma Mexicana NMX-F-099-1970 y la Norma Mexicana NMX-F-206-1986. Ver Anexo 3.

4.2. DESARROLLO DE LAS METODOLOGÍAS PARTE II

4.2.1. Preliminar: Modificaciones debidas al cambio de cepas

4.2.1.1. Selección de medios y condiciones para la cuantificación selectiva de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus acidophilus*

Se probaron tres condiciones obtenidas de la bibliografía (Tabla 1.5) para la cuantificación selectiva de los probióticos *L.casei* cepa Rosell-215 N D-100B INSTITUT ROSELL LALLEMAND y *L.acidophilus* R0052-150 INSTITUT ROSELL LALLEMAND. Las condiciones se muestran en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Medios y condiciones de incubación seleccionados para la cuantificación selectiva de *L.casei* y *L.acidophilus*

Medio	Condiciones	Microorganismo que identifica	Utilizados por
MRS-V (Vancomicina 1 ppm)	37°C 72 h Anaerobiosis	<i>L.casei</i>	Tharmaraj y Shah, 2003
MRS-NaCl (Cloruro de sodio al 4 %)	37°C 72 h Anaerobiosis	<i>L.casei</i>	
MRS-LiCl (Cloruro de litio al 0.5 %)	37°C 72 h Anaerobiosis	<i>L.casei</i>	
MRS	43°C 72h Anaerobiosis	<i>L.acidophilus</i>	

El procedimiento de selección de medios se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se inició con una dilución (1:10) del probiótico liofilizado correspondiente (*L.casei* o *L.acidophilus*): se pesaron 10 g y se colocaron en bolsa para Stomacher®, se agregaron 90 mL de solución salina isotónica con peptona al 0.1% (SSI + peptona 0.1%). Se realizó digestión mecánica en *Stomacher*® 400 SEWARD por 2 min a velocidad media. Se tomó 1 mL de la dilución primaria y se agregó a 9 mL de SSI + peptona 0.1% (Anexo 2), se homogenizó manualmente en un arco de 30 cm con 25 movimientos de arriba abajo, efectuados en un tiempo de 7 segundos. De la misma forma, se realizaron diluciones decimales seriadas hasta 10^{-9} utilizando el mismo diluyente.

Para realizar una mezcla de ambos probióticos, se tomaron 5 mL de la dilución primaria de cada probiótico y se mezclaron en un tubo Falcon® de 15 mL. La muestra se homogenizó y se hicieron diluciones decimales seriadas hasta 10^{-10} .

La inoculación de ambos probióticos y de la mezcla de los mismos se llevó a cabo tomando por duplicado 1 mL de las diluciones: 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} ; y 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} respectivamente. Se inoculó en caja Petri estéril, se adicionaron los medios de prueba (Tabla 4.3.) mantenidos a 45°C y se homogenizó mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio. Se incubó según las condiciones indicadas en la Tabla 4.3. para cada medio utilizado. El rango de sensibilidad para la cuantificación de colonias estadísticamente fue de 30 a 300 UFC.

4.2.1.2. Confirmación de medios para la cuantificación selectiva de los probióticos

Una vez que se obtuvieron las condiciones para la cuantificación selectiva de ambos probióticos, se realizó el mismo procedimiento de la Sección 4.2.1.1., pero se cultivó *L.acidophilus* en las condiciones elegidas para *L.casei* y viceversa para confirmar que *L.acidophilus* no crece en las condiciones elegidas para *L.casei* y a su vez verificar que *L.casei* no crece en las condiciones seleccionadas para la cuantificación de *L.acidophilus*.

De cada medio utilizado donde se presentó crecimiento, se tomaron tres colonias de la superficie, tres colonias de la parte media y tres colonias del fondo de la caja Petri; se les realizó una tinción de Gram (Anexo 6) para verificar la morfología característica de los probióticos utilizados y observar la pureza de los cultivos

obtenidos. La observación microscópica se realizó tomando en cuenta la siguiente descripción morfológica:

✚ *L.acidophilus*: Bacilos Gram-positivo con extremos redondeados, no formadores de spora. Con dimensiones: 0.6 – 0.9 µm por 1.5 – 6 µm. Se encuentran aislados, en pares o en cadenas cortas. Catalasa-negativo (Wood y Holzapfel, 1995).

✚ *L.casei*: Bacilos Gram-positivo, a menudo extremos cuadrados, no formadores de spora. Con dimensiones 0.7 – 1.1 µm por 2.0 – 4.0 µm. Con tendencia a formar cadenas. Catalasa-negativo (Wood y Holzapfel, 1995).

Para verificar el carácter catalasa-negativo típico de este grupo microbiano, se realizó prueba de la catalasa tomando el mismo número de colonias y de las mismas secciones donde se tomaron para la tinción de Gram. Se utilizó una solución comercial de agua oxigenada (peróxido de hidrógeno H₂O₂ al 3%), la aparición de burbujas cuando la colonia entra en contacto con el agua oxigenada, se toma como reacción positiva, ya que la enzima catalasa producida por el microorganismo descompone el H₂O₂ liberando oxígeno (O₂↑) (Ramírez *et al.*, 2008).

4.2.1.3. Selección de la metodología de cuantificación para *L.acidophilus* microencapsulado

La cepa utilizada de *L.acidophilus* microencapsulado fue Probiocap™ Rosell-52 ME, 50 INSTITUT ROSELL LALLEMAND. Los detalles de la composición de la

microcápsula no fueron especificadas por el proveedor de bido a derechos de autor.

Se realizaron 3 metodologías para ver cuál de éstas deshacía mejor la microcápsula y, por lo tanto, ver cuál es la que permite una mayor cuantificación del microorganismo en cuestión.

Metodología 1

El fundamento de esta metodología fue romper la microcápsula a través de la digestión mecánica a máxima velocidad por 5 min utilizando como diluyente SSI + peptona 0.1%. La ventaja de esta metodología es la facilidad de la misma.

El procedimiento se realizó haciendo una dilución de 10 g de microencapsulado en 90 mL de SSI + peptona 0.1%, se realizó la digestión mecánica en *Stomacher*[®] 400 SEWARD por 5 min a velocidad máxima. Las diluciones secundarias se realizaron con el mismo diluyente.

Metodología 2

El fundamento de esta metodología fue el uso de citrato de sodio y digestión mecánica, ya que éste es un emulsificante de los componentes del queso el cual permite la dispersión de las micelas de caseína (Villaruel, 2011) lo que facilita la liberación y consiguiente cuantificación de los probióticos. El procedimiento se realizó haciendo una dilución de 10 g de microencapsulado en 90 mL de citrato de sodio estéril al 2%, se realizó la digestión mecánica en *Stomacher*[®] 400 SEWARD por 5 min a velocidad máxima. Las diluciones secundarias se realizaron con SSI + peptona 0.1%.

Metodología 3

Esta fue una metodología proporcionada por el proveedor, por lo que de esta metodología se espera el mayor rendimiento en la cuantificación de los microorganismos. La desventaja es que la metodología es más laboriosa e incluye el uso de amortiguadores especiales para la disolución de la microcápsula. El procedimiento se realizó haciendo una dilución de 10 g de microencapsulado en 90 mL de buffer especial de fosfatos (Anexo 2) mantenido a 37 °C. Se licuó por 1 min a máxima velocidad. Se incubó a 37 °C por 15 min con agitación moderada (190 rpm). Y se realizaron diluciones decimales seriadas en buffer regular de fosfatos (Anexo 2).

Después de la elaboración de la dilución primaria con sus respectivos diluyentes y modificaciones para las 3 metodologías, el proceso de dilución e inoculación se realizaron siguiendo el Anexo 1, secciones: Diluciones secundarias e inoculación de diluciones.

Las diluciones de prueba fueron: 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} . El medio utilizado fue Agar MRS BD Difco™ Lactobacilli MRS agar, se incubó a 37 °C por 48 h en anaerobiosis (Jarra de anaerobiosis *Anaero Jar™ AG0025A Oxoid*, sistema de anaerobiosis: *Anaero GEN™ 2.5L Oxoid*). El rango de sensibilidad para la cuantificación de colonias estadísticamente confiable fue de 30 a 300 UFC.

Una vez elegido el tratamiento más adecuado para la cuantificación del microencapsulado, se realizó el mismo procedimiento que la Sección 4.2.1.2., para la cepa de *L.acidophilus* microencapsulado con el fin de verificar que los medios y

condiciones para su cuantificación sean selectivos cuando se encuentra en mezcla con *L.casei* liofilizado.

4.2.2. Elaboración de quesos

La metodología de elaboración de quesos se realizó siguiendo el protocolo de la Sección 4.1.2., sin hacer modificaciones al mismo, sin embargo, en esta parte del proyecto se incorporó otro ingrediente obteniendo una formulación más: Queso simbiótico con epazote. Otra modificación realizada, fue el uso de *L.acidophilus* en forma liofilizada y microencapsulada, por lo que, por cada formulación de queso elaborada, se obtuvieron las siguientes combinaciones:

1. Queso simbiótico blanco:

- Con *L.casei* y *L.acidophilus* liofilizados.
- Con *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* microencapsulado.

2. Queso simbiótico con chile jalapeño:

- Con *L.casei* y *L.acidophilus* liofilizados.
- Con *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* microencapsulado.

3. Queso simbiótico con chile chipotle:

- Con *L.casei* y *L.acidophilus* liofilizados.
- Con *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* microencapsulado.

4. Queso simbiótico con epazote:

- Con *L.casei* y *L.acidophilus* liofilizados.
- Con *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* microencapsulado.

Las cepas utilizadas fueron:

- a) *Lactobacillus casei* cepa Rosell-215 N D- 100B INSTITUT ROSELL LALLEMAND. (Liofilizado).
- b) *Lactobacillus acidophilus* R0052-150, INSTITUT ROSELL LALLEMAND. (Liofilizado).
- c) *Lactobacillus acidophilus* cepa ProbiocapTM Rosell-52 M E, 50 INSTITUT ROSELL LALLEMAND. (Microencapsulado).

4.2.3. Vida de anaquel

Se elaboraron dos lotes de cada formulación de queso y con su respectiva variación en la presentación de probióticos: Liofilizados (*L.casei* + *L.acidophilus*); y liofilizado (*L.casei*) y microencapsulado (*L.acidophilus*); cada lote era una pieza de queso entre 270 g y 280 g, los cuales se envolvieron en papel encerado, se empacaron en bolsa de plástico con cierre hermético (*Zipper Seal Member's Marck_{MR}*) y se mantuvieron en condiciones de refrigeración (4 °C).

La vida de anaquel se siguió por 18 días (3 semanas), realizando la evaluación de parámetros microbiológicos: cuantificación de probióticos y microorganismos indicadores; y de parámetros fisicoquímicos: pH y acidez. Todas las determinaciones mencionadas se realizaron por duplicado y para cada uno de los dos lotes. La frecuencia de la evaluación de los parámetros se realizó dos veces por semana, obteniendo así, 6 evaluaciones de cada lote a lo largo de la vida de anaquel.

4.2.3.1. Evaluación de parámetros microbiológicos

4.2.3.1.1. Cuantificación de probióticos

Para la obtención de la dilución primaria, se llevaron a cabo dos metodologías tomando en cuenta la presentación de los probióticos utilizados en los quesos:

- *Quesos con probióticos liofilizados:*

Se siguió la metodología del Anexo 1, sin modificaciones en éste.

- *Quesos con *L. casei* liofilizado y *L. acidophilus* microencapsulado:*

Para la obtención de la dilución primaria, se realizó una dilución de 10 g de queso en 90 mL de SSI + peptona 0.1%, se realizó la digestión mecánica en *Stomacher*[®] 400 SEWARD por 5 min a velocidad máxima. Las diluciones secundarias e inoculación de diluciones, se realizaron siguiendo la metodología del Anexo 1.

Independientemente de la variedad de queso analizado, los medios y las condiciones de incubación fueron las mismas para todos y cada uno de ellos. La Tabla 4.4., indica las condiciones de incubación utilizadas. Las condiciones de anaerobiosis se generaron mediante la Jarra de anaerobiosis *Anaero Jar*TM AG0025A Oxoid, sistema de anaerobiosis: *Anaero GEN*TM 2.5 L Oxoid. El rango de sensibilidad para la cuantificación de colonias es estadísticamente confiable para todos los casos fue de 30 a 300 UFC.

Tabla 4.4. Condiciones y medios utilizados para la cuantificación selectiva de probióticos en queso

Probiótico cuantificado	Medio	Condiciones de incubación		
		Temperatura	Atmósfera	Tiempo
<i>L.casei</i>	MRS-NaCl (Anexo 2)	37 ± 2 °C	Anaerobia	72 h
<i>L.acidophilus</i>	MRS (Anexo 2)	43 ± 2 °C	Anaerobia	72 h

4.2.3.1.2. Cuantificación de microorganismos indicadores

Se llevó a cabo siguiendo la metodología de la Sección 4.1.3.1.2., sin modificaciones.

4.2.3.2. Evaluación de parámetros fisicoquímicos

4.2.3.2.1. Determinación de pH y acidez

La determinación de los parámetros fisicoquímicos se determinó siguiendo la metodología de la Sección 4.1.3.2.1. , sin ninguna modificación en la misma.

V. Análisis de resultados y discusión

5.1 RESULTADOS PARTE I

5.1.1. Adición de probióticos

La presentación de los probióticos proporcionada por el proveedor es en polvo y se adicionaron de esta forma, no se realizó suspensión previa de los mismos y se agregaron directamente sobre la cuajada obtenida. Los probióticos se adicionaron al mismo tiempo que las especias (chile jalapeño, chile chipotle o epazote), ya que lo que se quería evitar era una mayor manipulación de la cuajada debido a que entre más se manipula, el tamaño del gránulo de la cuajada disminuye, lo cual provoca la liberación de suero y por ende la pérdida de humedad en el queso, así como cambios en su textura. La razón de esto es, que cuanto mayor es el gránulo de queso, mayor es su contenido en agua (Teubner *et al.*, 2005).

La humedad de los quesos elaborados está entre 66% y 63%, esto se logra mediante una manipulación controlada de la cuajada. Durante el proceso de elaboración del queso, los pasos donde hay manipulación de la cuajada son: corte de la cuajada, amasado y salado; y adición de especias (Figura 4.3), durante estos pasos es importante controlar tanto la fuerza, el tiempo y la forma de manipulación, evitando así, una mayor pérdida de suero. Por ende, los probióticos se añaden junto con las especias para no introducir otro paso de manipulación de la cuajada durante el proceso de elaboración del queso (Figura 4.4) y así evitar la sobremanipulación de la misma.

5.1.2. Determinación de la cantidad del inóculo

A pesar de que no existen especificaciones concretas que indiquen la dosis de probióticos que debe tener un producto funcional, generalmente en la bibliografía se reporta que un consumo diario de 100 g ó 100 mL de alimento que contenga poblaciones de probióticos en un nivel de 10^6 a 10^8 UFC/ g ó mL_{alimento} puede proporcionar una cantidad de 10^8 a 10^{10} UFC/ día, cantidad que ha demostrado ser suficiente para causar efecto terapéutico (Escobar *et al.*, 2012). El nivel seleccionado para el queso probiótico en sus diferentes variedades fue de 1×10^8 UFC/ g_{queso} de la suma de los probióticos seleccionados. Esto se estableció pensando en que si existiera una pérdida en la viabilidad de los probióticos a lo largo de la vida de anaquel de bido a las condiciones de almacenamiento y al efecto del uso de aditivos como el chile y el epazote, aun así, se mantuviera la cantidad de probióticos en los valores mínimos para causar su efecto terapéutico en el momento del consumo del queso simbiótico.

Para determinar la cantidad de probióticos que se debía inocular a la cuajada para obtener una concentración inicial de 1×10^8 UFC/ g_{queso} suma total entre *L.casei* + *L.acidophilus*, se desarrolló una fórmula tomando en cuenta los siguientes puntos:

1. Cantidad de probióticos requerida en el queso: Por cada probiótico se requiere un total de 5×10^7 UFC/ g_{queso}.
2. El rendimiento del queso es del 80% con relación a la cuajada. Es decir, por cada 100 g de cuajada se obtienen 80 g de queso (Patlán, 2012).
3. Se consideró la concentración de UFC contenidas por gramo de liofilizado o microencapsulado (UFC/g_{liofilizado ó microencapsulado}) de cada probiótico utilizado.
4. Peso de la cuajada (determinada cada vez que se producía un queso).

5. Durante el prensado se aplicó una presión de 3 Kg por 12 h. Durante este paso, se libera suero, por lo que se realizó una cuenta en placa (Anexo 4) para ajustar la fórmula considerando la pérdida de los probióticos. Los resultados obtenidos fueron:

✚ Concentración de probióticos en cuajada: 2.9×10^8 UFC/ g_{queso}

✚ Concentración de probióticos en suero: 1.5×10^8 UFC/ mL_{suero}

✚ Concentración de probióticos en queso: 1.3×10^8 UFC/ g_{queso}

Estos resultados demostraron que hubo una pérdida de la mitad de UFC agregadas inicialmente a la cuajada, por lo que la cantidad de probióticos que se agregan se duplicó.

La fórmula general resultante es:

$$\text{Fórmula 1} = \left(\frac{5 \times 10^7 \text{ UFC}}{\text{g queso}} \right) (\text{Rendimiento del queso})(\text{Concentración de UFC del liofilizado})$$

$$\text{Fórmula 2} = ((\text{Resultado de la Fórmula 1})(\text{Peso de la cuajada})) \times 2$$

En el Anexo 4 se muestran los cálculos utilizados para determinar qué cantidad se adiciona por cada probiótico inoculado (*L.casei* y *L.acidophilus*).

5.1.3. Vida de anaquel

Patlán (2012), determinó mediante el estudio de análisis microbiológicos de rutina (mesofílicos aerobios, coliformes totales, hongos y levaduras; *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*); junto con análisis fisicoquímicos (pH y acidez), que la vida de anaquel para quesos funcionales adicionados con fibra soluble era de 3 semanas. Además, la norma NMX-713-COFOCALEC-2005, sugiere que para este tipo de productos su consumo debe ser preferentemente durante los 20 días a partir de su fecha de elaboración. Debido a esto, la vida de anaquel de los quesos

simbióticos en sus diferentes formulaciones se siguió a lo largo de 3 semanas, en condiciones de refrigeración (4 °C), realizando dos determinaciones por semana en parámetros microbiológicos y físicoquímicos. Se realizaron dos lotes independientes de queso por cada formulación y a cada uno de ellos, se le realizaron las determinaciones microbiológicas y físicoquímicas por duplicado.

5.1.3.1. Evaluación de parámetros microbiológicos

5.1.3.1.1. Cuantificación de probióticos

Tabla 5.1. Resultados de cuantificación de probióticos (liofilizados) para las variedades de queso simbiótico al inicio y final de la vida de anaquel***

Parámetro		Queso blanco	Queso jalapeño	Queso chipotle
<i>L.casei</i> (log UFC / g _{queso})	Inicio	7.2	8.6	8.0
	Fin	6.6	8.6	9.2
<i>L.acidophilus</i> (log UFC / g _{queso})	Inicio	8.5	9.7	9.7
	Fin	6.9	9.1	9.4

*****Nota:** Los resultados completos de la cuenta de los probióticos desde el día cero al día final de la vida de anaquel (Día 21), se encuentran en la Tabla A.7.1. del Anexo 7.

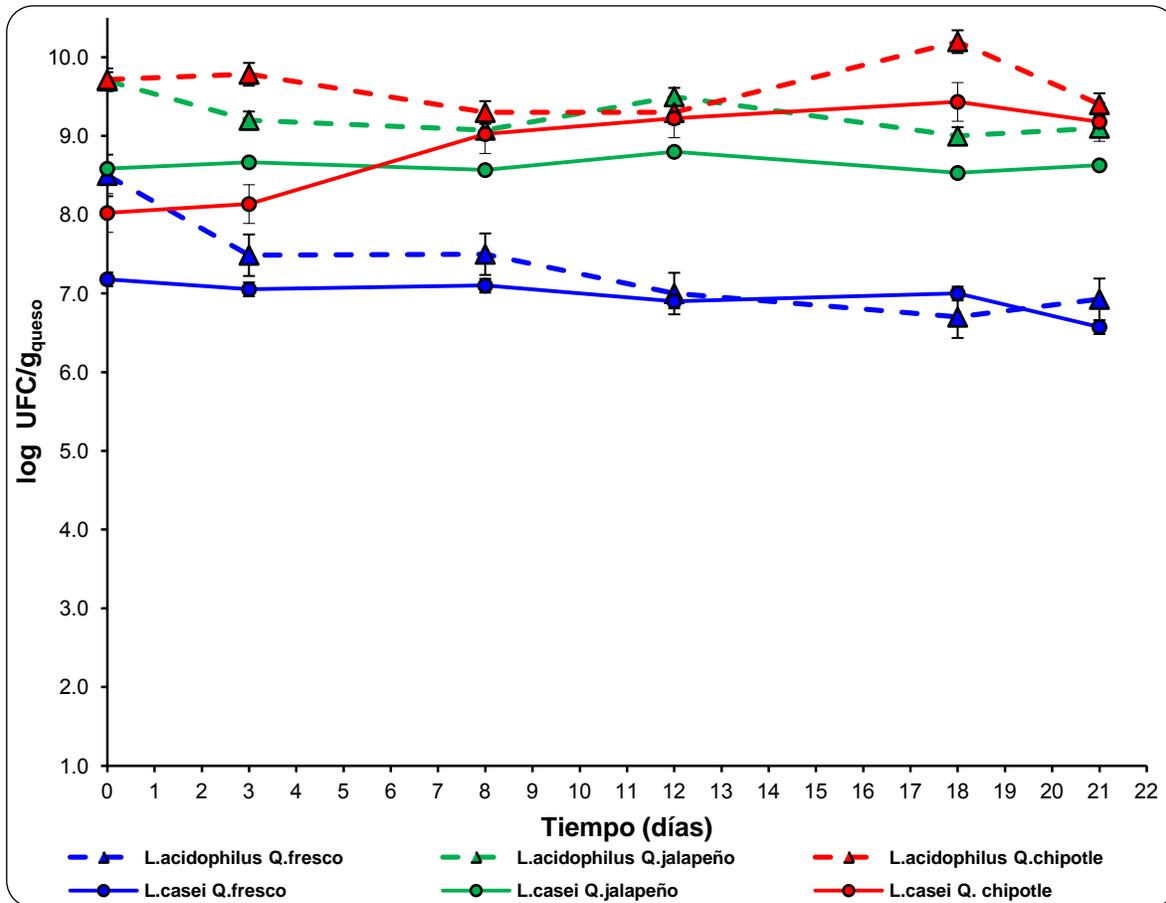


Figura 5.1. Vida de anaquel de probióticos, distintas formulaciones de queso simbiótico

Para evaluar la viabilidad y la supervivencia de las bacterias probióticas es importante tener un método de trabajo para la enumeración selectiva de estos microorganismos. Un parámetro importante en el monitoreo de microorganismos probióticos viables en la evaluación de la calidad de un producto, es la habilidad de cuantificar por separado los microorganismos presentes en éste (Shah, 2000). En esta parte I del proyecto se inocularon los quesos simbióticos con las cepas *Lactobacillus casei* cepa FD-DVS *L.casei* 413[®] Probio-Tec[®] CHR HANSEN y *Lactobacillus acidophilus* cepa FD-DVS LA-5[®]- Probio-Tec[®] CHR HANSEN.

Para el queso blanco, se observa que, *L.acidophilus* en el día cero inicia con una cuenta mayor que la de *L.casei* y conforme pasan los días se va reduciendo la cantidad de *L.acidophilus*, mientras que *L.casei* que empieza con una cuenta más baja, permanece más estable a lo largo de la vida de anaquel.

El mismo efecto se observa para los quesos con chile chipotle y jalapeño, ya que *L.acidophilus* está presente inicialmente en mayor cantidad y conforme pasa el tiempo, su estabilidad es menor a la de *L.casei* ya que va disminuyendo el número de UFC/ g_{queso} cuantificadas, sin embargo, se mantiene en el mismo orden. A pesar de que no hay referencias bibliográficas del efecto antimicrobiano de los chiles sobre los probióticos, se sabe que el chile en general presenta un efecto antimicrobiano frente a diferentes microorganismos patógenos (Bourgues, 2011); por lo que, puede suponerse que éste también puede tener efectos nocivos sobre los probióticos; sin embargo, se observa que la cantidad de chiles empleados, no tienen ningún efecto inhibitorio o negativo sobre los probióticos utilizados en este estudio, debido a que su viabilidad no se ve reducida en una cantidad considerable con respecto al queso blanco que sirve como control.

Para las tres formulaciones de queso, pese a la pérdida principalmente de *L.acidophilus*, se observa que la suma de los probióticos al final de la vida de anaquel está dentro de los límites esperados (1×10^8 UFC/ g_{queso}).

5.1.3.1.2. Cuantificación de microorganismos indicadores

Tabla 5.2. Resultados de cuantificación de microorganismos indicadores para las variedades de queso simbiótico al inicio y final de la vida de anaquel

Parámetro		Queso blanco	Queso jalapeño	Queso chipotle
MA (UFC / g _{queso})	Inicio	Negativo*	Negativo*	Negativo*
	Fin	Negativo*	Negativo*	Negativo*
Coliformes (UFC / g _{queso})	Inicio	Negativo*	Negativo*	Negativo*
	Fin	Negativo*	Negativo*	Negativo*
HL (UFC / g _{queso})	Inicio	Negativo*	Negativo*	Negativo*
	Fin	Negativo*	Negativo*	Negativo*

*Sensibilidad del método: 10 UFC/ g_{queso}

Los microorganismos indicadores: mesófilos aerobios, hongos y levaduras y coliformes, en todas las variedades de queso analizadas, no presentaron desarrollo a lo largo de las 3 semanas de estudio, lo cual indica que la materia prima utilizada estaba en condiciones adecuadas y que durante la elaboración del producto y el almacenamiento a lo largo de la vida de anaquel se realizaron buenas prácticas de manufactura.

5.1.3.2. Evaluación de parámetros fisicoquímicos

5.1.3.2.1. Determinación de pH y acidez

Tabla 5.3. Resultados de parámetros fisicoquímicos para las distintas variedades de queso simbiótico al inicio y final de la vida de anaquel***

Parámetro		Queso blanco	Queso jalapeño	Queso chipotle
pH	Inicio	6.60	5.39	4.90
	Fin	6.88	5.00	4.46
Acidez (% Ácido láctico)	Inicio	0.03	0.12	0.23
	Fin	0.03	0.34	0.31

*****Nota:** Los resultados completos de los parámetros fisicoquímicos, desde el día cero al día final de la vida de anaquel (día 21), se encuentran en la Tabla A.7.1. del Anexo 7.

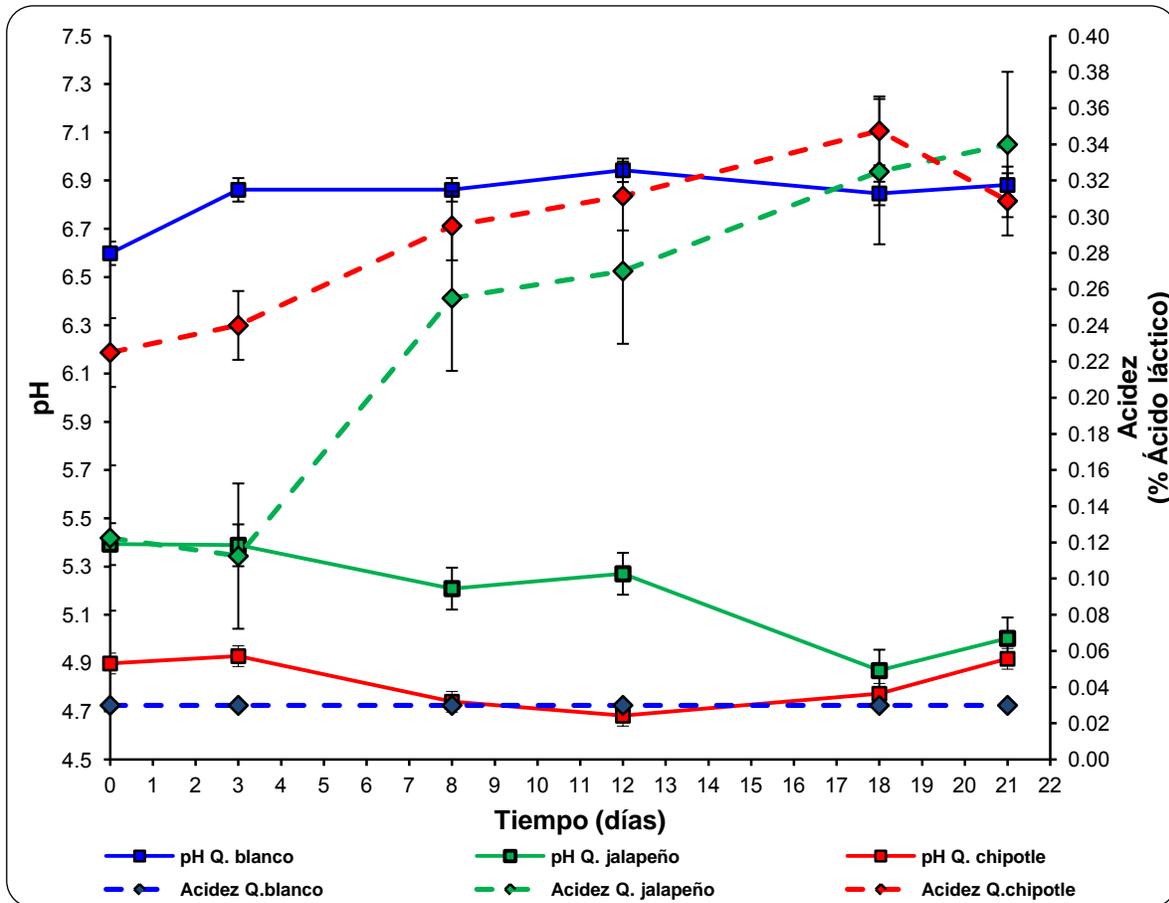


Figura 5.2. Vida de anaquel de parámetros fisicoquímicos, distintas formulaciones de queso simbiótico

Para quesos frescos el pH debe permanecer entre 6.5 a 6.7 (Hill, 2007). El queso blanco simbiótico está dentro de los parámetros establecidos de pH para quesos frescos y permanece estable a lo largo de las 3 semanas de estudio, lo que indica que no hay descomposición química principalmente por lipólisis o proteólisis de los componentes del queso. Por ende, tampoco se puede atribuir una descomposición microbiológica. El queso blanco simbiótico además de ser una formulación incluida en el proyecto, también es un queso que sirve de control y referencia para compararlo con las otras dos formulaciones de queso simbiótico. Se observa que el pH tanto del queso con chile jalapeño como el del queso con chile chipotle está por debajo de la referencia para quesos frescos (6.5 a 6.7), esto se debe a que las

especies agregadas reducen el valor del pH, sin embargo como se puede ver en la Figura 5. 1., este parámetro no afecta la viabilidad de los microorganismos probióticos ya que ésta permanece relativamente estable.

RESULTADOS PARTE II

5.2.1. Selección de medios y condiciones para la cuantificación selectiva de *L.casei* y *L.acidophilus*

Para la segunda parte del proyecto, por razones ajenas al grupo de investigación, se tuvo que cambiar de proveedor de probióticos. El nuevo proveedor comercializa a *L.acidophilus* microencapsulado por lo que se estudió si el comportamiento de la cepa liofilizada era el mismo que el de la presentación microencapsulada. La consideración que se adoptó, fue desarrollar una metodología que permitiera la ruptura de la microcápsula para cuantificar al probiótico en cuestión. Sin embargo, también hubo cambio de cepas en los probióticos liofilizados: *Lactobacillus casei* cepa Rosell-215 N D- 100B INSTITUT ROSELL L ALLEMAND y *Lactobacillus acidophilus* R0052-150, INSTITUT ROSELL L ALLEMAND. Por lo que también se tuvo que analizar el comportamiento de las nuevas cepas cuando se encontraban en las diferentes formulaciones de queso tanto en forma liofilizada y microencapsulada. En un principio, se realizó un queso blanco simbiótico con *L.casei* y *L.acidophilus* liofilizados y otro queso simbiótico blanco con *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* microencapsulado para observar el comportamiento de las nuevas cepas; las condiciones de incubación para la cuantificación de los probióticos fueron las mismas utilizadas en la primera parte de este proyecto (Sección 4.1.3.1.1.), sin embargo, los resultados de la cuenta en placa obtenidos en los primeros días de la vida de anaquel dieron a conocer que las condiciones

utilizadas no eran selectivas para la cuantificación de las nuevas cepas. Debido a esto, fue necesario buscar medios de cultivo y las condiciones de incubación selectivas para la cuantificación de las nuevas cepas utilizadas.

Se probaron cuatro medios en el experimento: Agar MRS con Vancomicina con una concentración de 1 ppm (MRS-V), Agar MRS con Cloruro de sodio al 4% (MRS-NaCl) y Agar MRS con Cloruro de litio al 0.5% (MRS-LiCl), se incubaron en anaerobiosis a 37° C y 72 h. Adicionalmente se probó Agar MRS con una incubación por 72 h a 43° C en anaerobiosis. Estos medios y condiciones se eligieron de la bibliografía consultada tomando como criterio la disponibilidad de los reactivos en el laboratorio y la facilidad de preparación de los medios (Tabla 1.5.).

Los medios elegidos se prepararon siguiendo la metodología del Anexo 2 y el experimento consistió en probar estos 4 medios cultivando por separado y en mezcla cada uno de los 3 probióticos utilizados para ver cuál de estos medios es selectivo para la cuantificación por separado de los probióticos. Ver Secciones 4.2.1.1. y 4.2.1.2.

En la Tabla 5.4., se muestran los resultados obtenidos para las condiciones y medios selectivos seleccionados para la cuantificación de *L.casei* y *L.acidophilus* liofilizados, cepas: Rosell-215 N D- 100B INSTITUT ROSELL L ALLEMAND y R0052-150, INSTITUT ROSELL LALLEMAND respectivamente.

Tabla 5.4. Resultados de crecimiento de los probióticos en diferentes medios selectivos

Probiótico	Medio selectivo			
	MRS-LiCl	MRS-NaCl	MRS-V	MRS (43 °C)
<i>L.casei</i> (UFC/ g)	$1.1 \times 10^{11} \pm 3.5$	$2.6 \times 10^{11} \pm 2.8$	$1.7 \times 10^{11} \pm 3.5$	Sin crecimiento
<i>L.acidophilus</i> (UFC/ g)	$4.2 \times 10^{10} \pm 4.0$	Sin crecimiento	$4.0 \times 10^{10} \pm 3.5$	$5.4 \times 10^{10} \pm 2.8$
Mezcla (UFC/ mL)	$3.0 \times 10^{12} \pm 3.0$	$1.4 \times 10^{11} \pm 2.1$	$2.8 \times 10^{13} \pm 3.2$	$3.1 \times 10^{10} \pm 2.5$

En los resultados obtenidos se observa que los medios MRS-LiCl y MRS-V no sirven para cuantificar por separado a los probióticos y a que ambos microorganismos crecen en estos medios. El medio MRS-NaCl condiciones de incubación: 37 °C, 72 h, anaerobiosis; parece ser selectivo para la cepa de *L.casei* ya que *L.acidophilus* no presenta desarrollo en este medio; mientras que el medio MRS condiciones de incubación: 43 °C, 72 h, anaerobiosis; parece ser selectivo para la cepa de *L.acidophilus* liofilizado.

Para confirmar la selectividad de los medios, es necesario que el resultado de la cuenta obtenida de un probiótico por separado sea igual al obtenido en la mezcla de probióticos en el mismo medio.

En la Tabla 5.4., el valor obtenido para la cuenta de *L.casei* en el medio MRS-NaCl es de 2.6×10^{11} UFC/ g_{liofilizado}, este valor debe coincidir con el obtenido para la mezcla de probióticos en el mismo medio. El resultado para la cuantificación de la mezcla en el medio MRS-NaCl es de 1.4×10^{11} UFC/ mL, este valor no coincide con el obtenido para la cuenta donde se encuentra solo *L.casei* (2.6×10^{11} UFC/ g_{liofilizado}), para poder comparar estos resultados deben realizarse los siguientes cálculos que toman en cuenta la metodología de la Sección 4.2.1.1., donde la

mezcla de probióticos se realizó juntando 5 mL de la dilución 1:10 de *L.casei* y 5 mL de *L.acidophilus*:

$$\frac{2.6 \times 10^{11} \text{ UFC}}{\text{g}_{\text{liofilizado}}} \times \frac{10 \text{ g liofilizado}}{90 \text{ mL}} \times 5 \text{ mL} = 1.4 \times 10^{11} \text{ UFC}$$

Con el cálculo realizado, el valor obtenido de 1.4×10^{11} UFC el cual coincide con el obtenido en la cuantificación de la mezcla: 1.4×10^{11} UFC/ mL. Por ende, el medio MRS-NaCl, condiciones de incubación a 37°C , anaerobiosis, 72 h; es selectivo para la cuantificación de *L.casei* liofilizado.

Los mismos cálculos se realizan para *L.acidophilus*, en el medio MRS condiciones de incubación a 43°C , anaerobiosis, 72 h, la cuenta es de 5.4×10^{10} UFC/ g_{liofilizado} y para la mezcla en el mismo medio y condiciones de incubación el valor es de 3.1×10^{10} UFC/ mL:

$$\frac{5.4 \times 10^{10} \text{ UFC}}{\text{g}_{\text{liofilizado}}} \times \frac{10 \text{ g liofilizado}}{90 \text{ mL}} \times 5 \text{ mL} = 3 \times 10^{10} \text{ UFC}$$

Una vez más, con el cálculo realizado tomando en cuenta la metodología de la Sección 4.2.1.1., el valor obtenido es de 3×10^{10} UFC, el cual coincide con el obtenido en la cuantificación de *L.acidophilus* dentro la mezcla: 3.1×10^{10} UFC/ mL. Por ende, el medio MRS condiciones de incubación a 43°C , anaerobiosis, 72h, es selectivo para la cuantificación de *L.acidophilus* liofilizado.

Siguiendo con la metodología de la Sección 4.2.1.2., se realizó una confirmación de los resultados obtenidos, cultivando a ambos microorganismos tanto en su medio selectivo como en el medio selectivo contrario. Y se realizó tinción de Gram a las colonias obtenidas.

Tabla 5.5. Resultados de probióticos liofilizados inoculados en su medio selectivo y en su medio selectivo contrario

	MRS-NaCl	MRS (43 °C)	Observación microscópica
<i>L.acidophilus</i> liofilizado (UFC/ g)	Negativo*	22×10^{10}	Bacilo largo, delgado Gram - positivo Catalasa - negativo
<i>L.casei</i> liofilizado (UFC/ g)	24×10^{10}	Negativo*	Bacilo corto, redondo Gram - positivo Catalasa - negativo

* Sensibilidad del método: 10 UFC/ g_{queso}

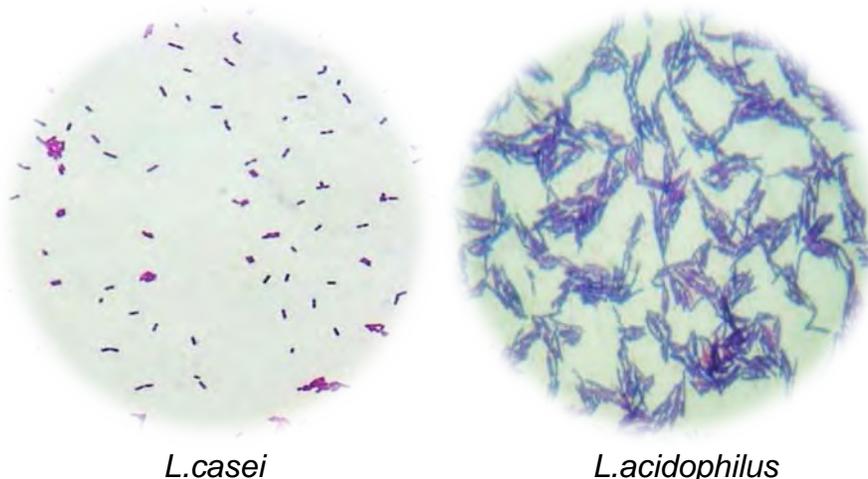


Figura 5.3. Observación microscópica de los probióticos liofilizados

Los resultados muestran que los medios y condiciones utilizadas sí son selectivas para las cepas de los probióticos utilizadas ya que cada probiótico crece en su medio y no presenta desarrollo en el medio selectivo contrario. Así mismo, en las tinciones realizadas, se observa que los campos presentan la misma morfología para cada probiótico y no se observa una mezcla de morfologías diferentes. Por lo tanto, será posible cuantificar los probióticos liofilizados por separado cuando están presentes en queso a las diluciones que se requiera.

5.2.2. Selección de la metodología de cuantificación para *L.acidophilus* microencapsulado

La importancia de proteger al microorganismo a través de una microcápsula es de relevancia y a que en la primera parte del proyecto se observó que este microorganismo reduce su población a lo largo de la vida de anaquel del producto. Sin embargo, los materiales de los cuales está compuesta la microcápsula dificultan su cuantificación, es por esto que previo a su cuantificación, se buscó una metodología para romper la microcápsula.

Tabla 5.6. Resultados de las diferentes metodologías aplicadas para la cuantificación de *L.acidophilus* microencapsulado

	Metodología 1 (SSI + peptona 0.1%)	Metodología 2 (Citrato de sodio 2%)	Metodología 3 (Buffer de fosfatos)
Resultado (UFC/ g)	5.0×10^{10}	4.7×10^{10}	5.2×10^{10}

Los resultados obtenidos reflejan que la metodología recomendada por el proveedor (metodología 3) de cual se esperaba obtener una mayor recuperación del probiótico, no se obtiene una cantidad considerablemente más elevada que los otros tratamientos que se probaron. Debido a que no hay gran diferencia entre los resultados obtenidos de los tres tratamientos para la cuantificación de *L.acidophilus* microencapsulado, se eligió la Metodología 1 (SSI + peptona 0.1% como solución diluyente, digestión mecánica máxima por 5 min). La metodología 2, utilizando citrato de sodio al 2% como solución diluyente en la dilución primaria, no se utilizó debido a que durante la vida de anaquel de los quesos es necesario cuantificar coliformes vía método rápido Petrifilm™ y dentro de las precauciones del fabricante no se recomienda utilizar diluyentes con citratos para no interferir en la cuantificación entre los microorganismos y los componentes de la placa.

Siguiendo la metodología de la Sección 4.2.1.2., se realizó una confirmación de la selectividad de los medios cuando *L.acidophilus* microencapsulado (cepa Probiocap™ Rosell-52 ME, 50 INSTITUT ROSELL LALLEMAND) se encuentra con *L.casei* liofilizado (cepa Rosell-215 N D-100B INSTITUT ROSELL LALLEMAND). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7. Resultados de *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* microencapsulado inoculados en su medio selectivo y en el medio selectivo contrario

	MRS-NaCl	MRS (43 °C)	Observación microscópica
<i>L.acidophilus</i> microencapsulado (UFC/ g)	V.E. < 10 UFC	52 x 10 ⁹	Bacilo largo, delgado Gram-positivo Catalasa-negativo
<i>L.casei</i> liofilizado (UFC/ g)	24 x 10 ¹⁰	V.E. < 10 UFC	Bacilo corto, redondo Gram-positivo Catalasa-negativo

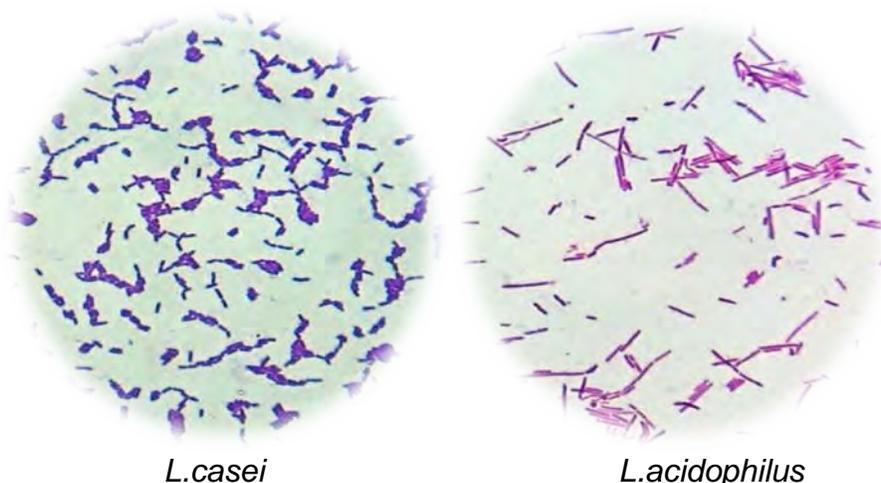


Figura 5.4. Observación microscópica de *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* microencapsulado

Para la cepa de *L.acidophilus* microencapsulado, se observa que las condiciones utilizadas anteriormente (MRS a 43° C, 72h, anaerobiosis), también son selectivas para cuantificarlo cuando se encuentra junto con la cepa de *L.casei* liofilizado.

En la tinción de Gram se observan morfologías constantes y similares, lo que demuestra que el cultivo está puro.

5.2.3. Vida de anaquel

Los factores involucrados en la estabilidad de los probióticos cuando se encuentran en queso son:

1. Factores de formulación: Cepas de probióticos utilizadas, interacciones microbiológicas, pH y acidez, aditivos promotores e inhibidores de crecimiento como sal, especias y microencapsulación.
2. Factores de proceso: Temperaturas de incubación, tratamiento térmico, tipo de inoculación y temperatura de almacenamiento.
3. Factores de materiales de empaque (Karimi *et al.*, 2012).

Los llamados “factores de formulación” por Karimi *et al.* (2012); son los puntos que se tomaron como los objetivos para el estudio de la vida de anaquel de los probióticos contenidos en quesos simbióticos, debido a que se busca evaluar su concentración y ver el comportamiento de la misma cuando los probióticos se encuentran en forma libre y microencapsulada; a su vez se está estudiando el comportamiento de otros microorganismos presentes, siendo los indicadores los de mayor relevancia como criterio de calidad y los parámetros fisicoquímicos como el pH y acidez, los cuales permiten ver la influencia metabólica tanto de los probióticos como de los microorganismos indicadores sobre los quesos. Así mismo, el uso de aditivos con sustancias antimicrobianas como chile jalapeño, chile chipotle y epazote, son de relevancia para observar el comportamiento de los probióticos cuando están en contacto con éstos.

La vida de anaquel de los quesos simbióticos en sus diferentes formulaciones se siguió a lo largo de 3 semanas, en condiciones de refrigeración (4 °C), realizando dos determinaciones por semana para los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos. Se realizaron dos lotes independientes de queso por cada formulación y a cada uno de ellos, se les realizaron las determinaciones microbiológicas y fisicoquímicas por duplicado.

A continuación se muestran los resultados de viabilidad obtenidos para las diferentes formulaciones propuestas del queso simbiótico a lo largo de la vida de anaquel. Asimismo, se presentan los resultados de los microorganismos indicadores y los parámetros fisicoquímicos (pH y acidez) evaluados.

5.2.3.1. Formulación de queso blanco

Tabla 5.8. Resultados de parámetros microbiológicos y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico blanco al inicio y final de la vida de anaquel***

Parámetro		Queso blanco con <i>L.casei</i> y <i>L.acidophilus</i> liofilizado	Queso blanco con <i>L.casei</i> liofilizado y <i>L.acidophilus</i> microencapsulado
L.casei (log UFC/ g _{queso})	Inicio	7.1	7.0
	Fin	7.2	6.6
L.acidophilus (log UFC/ g _{queso})	Inicio	7.1	7.7
	Fin	7.0	7.3
MA (log UFC/ g _{queso})	Inicio	Negativo	1.99
	Fin	3.26	2.40
Coliformes (UFC/ g _{queso})	Inicio	Negativo*	Negativo*
	Fin	Negativo*	Negativo*
HL (UFC/ g _{queso})	Inicio	Negativo*	Negativo*
	Fin	Negativo*	Negativo*
pH	Inicio	6.94	6.85
	Fin	6.42	6.80
Acidez (% Ácido láctico)	Inicio	0.02	0.02
	Fin	0.03	0.02

* Sensibilidad del método 10 UFC/ g_{queso}

*****Nota:** Los resultados completos de la cuenta de los probióticos desde el día cero al día final de la vida de anaquel (día 21), se encuentran en las tablas del Anexo 7: Tabla A.7.2. (Queso blanco con *L.casei* y *L.acidophilus* liofilizados) y Tabla A .7.3. (Queso blanco con *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* microencapsulado).

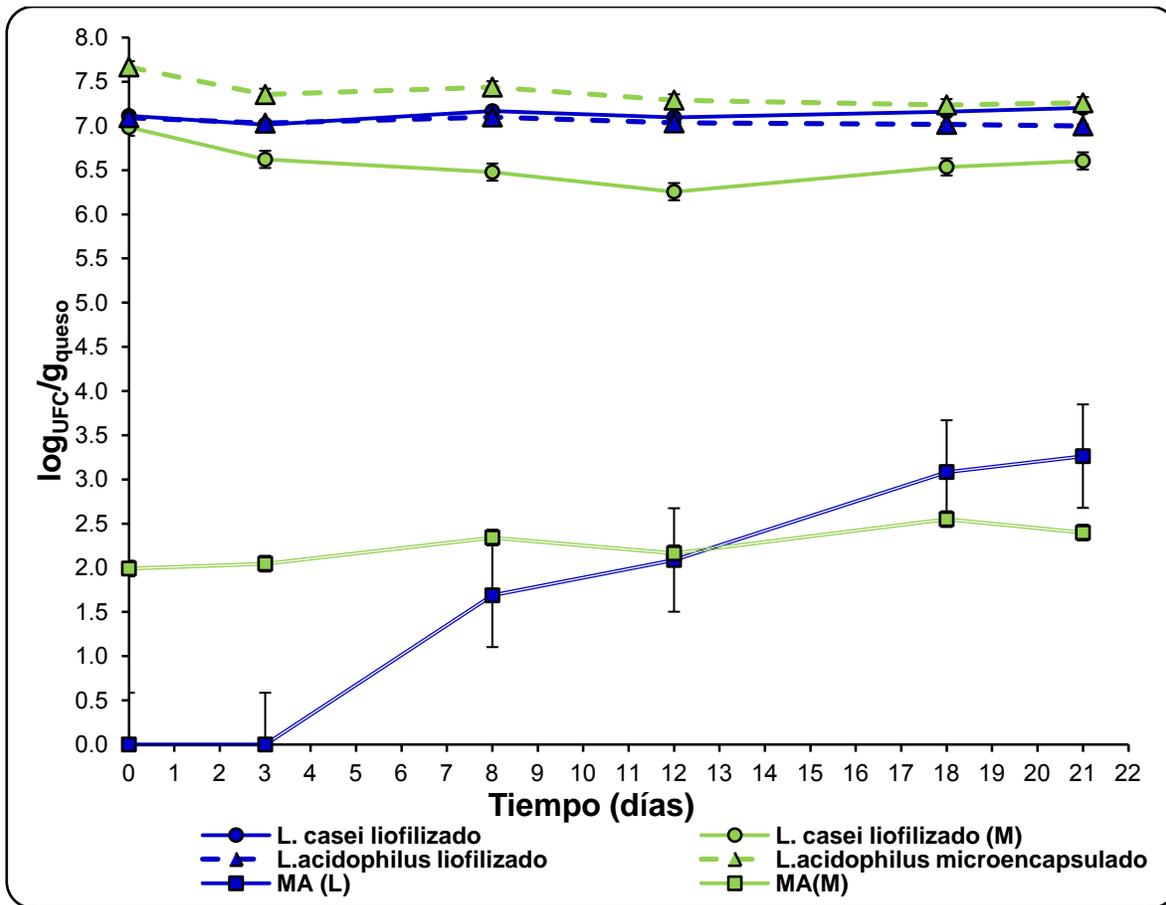


Figura 5.5. Parámetros microbiológicos de la vida de anaquel del queso simbiótico blanco con probióticos liofilizados (*L.casei* y *L.acidophilus*); y con probióticos: *L.casei* liofilizado (*L.casei* (M)) y *L.acidophilus* microencapsulado. Mesófilicos aerobios en el queso con probióticos liofilizados (MA (L)) y con probióticos liofilizado y microencapsulado ((MA (M))).

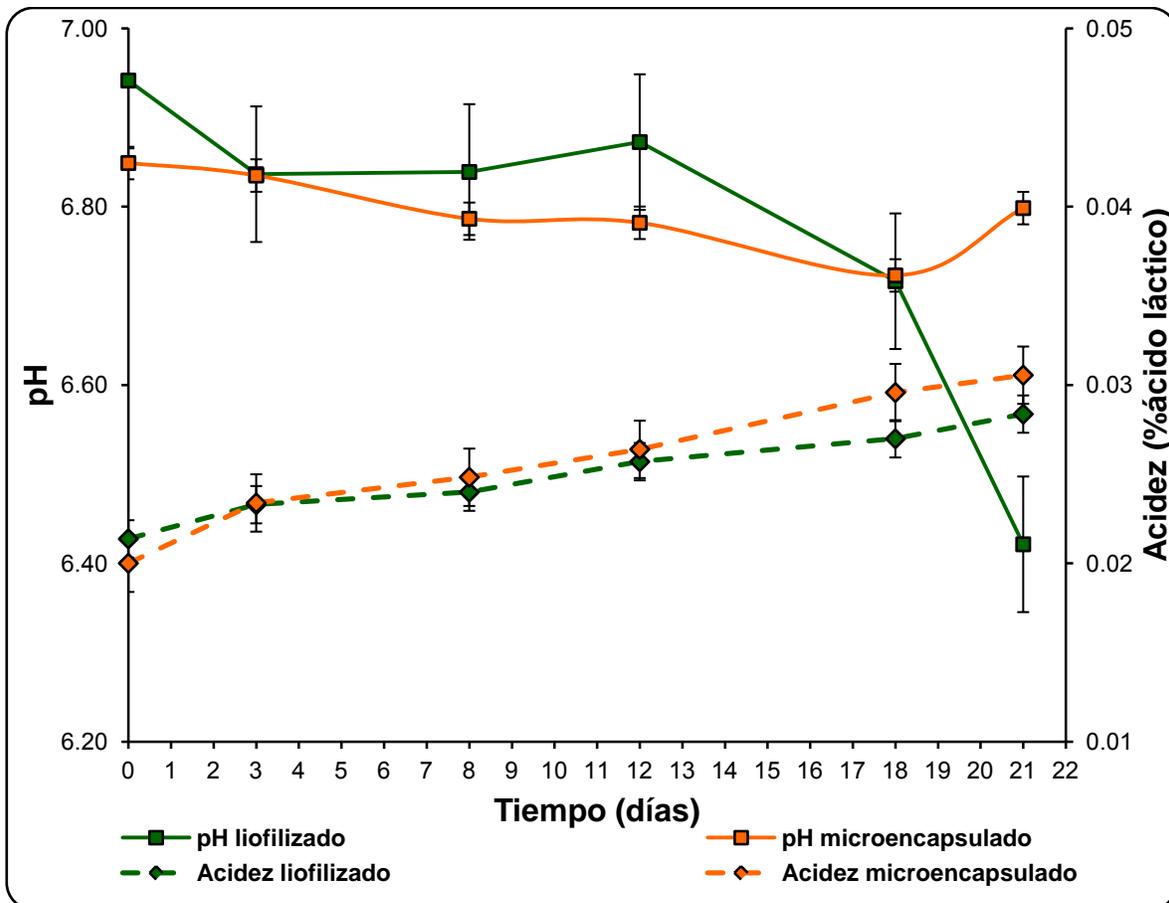


Figura 5.6. Parámetros fisicoquímicos de la vida de anaquel del queso simbiótico blanco con probióticos liofilizados (*L.casei* y *L.acidophilus*); y con probióticos: *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* microencapsulado.

Para el queso blanco con probióticos liofilizados se observa que ambos probióticos mantienen una estabilidad similar durante la vida de anaquel, ya que la concentración de ambos probióticos permanece constante y no se observa un crecimiento de los mismos en este queso, prácticamente terminan en el mismo nivel en el que empiezan ($7.1 \log \text{UFC/g}_{\text{queso}}$).

Lo contrario se observa para el queso con *L.acidophilus* microencapsulado, ya que *L.acidophilus* mantiene su concentración, pero la de *L.casei* disminuye por media unidad logarítmica.

Con esto se observa, que la finalidad de proteger al microorganismo del ambiente en el que se encuentra a través de una microcápsula sí se cumple, y a que mantiene estable su viabilidad, mientras que el que se encuentra liofilizado es más propenso a ser afectado por el ambiente en el que se encuentra.

Miremedi y Shah (2012), afirman que la tendencia en la adición de probióticos en los alimentos es incorporar *L.casei* en combinación con *L.acidophilus* puesto que se ha observado que cuando se encuentran juntos en alguna matriz alimenticia su viabilidad se mantiene estable e inclusive aumenta, mientras que cuando se encuentran solos, su viabilidad generalmente se ve afectada. Este fenómeno de mantener o aumentar su viabilidad, la denominan *sinergismo*, sin embargo mencionan que aún no hay una explicación de dicho comportamiento, su justificación la basan mencionando que *L.casei* y/o *L.acidophilus* producen ciertos metabolitos que favorecen el mantenimiento de estos probióticos cuando se encuentran juntos.

Por otro lado, Martínez (2005) menciona que *L.casei* produce D-ácido láctico, compuesto que complementa el crecimiento de *L.acidophilus* cuando *L.casei* se encuentra en mezcla con este microorganismo.

En la Figura 5.5., se observa que para el queso blanco adicionado con los dos probióticos liofilizados éstos presentan una concentración más estable que cuando se encuentran en forma separada por la microcápsula que recubre a *L.acidophilus*. Esto se explica con lo anteriormente mencionado, y a que cuando *L.casei* y *L.acidophilus* están libres se favorece su interacción por lo que su viabilidad se mantiene. Lo contrario se observa en el queso con *L.acidophilus* microencapsulado, donde éste mantiene su concentración gracias a la

microcápsula que lo protege del ambiente exterior, sin embargo *L.casei* pierde su viabilidad ya que no está en contacto con dicho microorganismo.

En la Figura 5.5., se observa que *L.acidophilus* microencapsulado es el probiótico que inicia con una cantidad más elevada ($7.7 \log \text{ UFC/ g}_{\text{queso}}$) respecto a los otros probióticos inoculados en ambos tipos de queso. En la Sección 4. 1.1.2., se realizaron los ajustes necesarios para que todos los probióticos inoculados en las diferentes formulaciones de queso inicien con la misma cantidad considerando la pérdida de los mismos durante el desuerado y prensado en el proceso de elaboración de queso; sin embargo, la cantidad elevada con la que inicia *L.acidophilus* microencapsulado respecto a los otros probióticos, se debe a que los componentes de los cuales está hecha la microcápsula (ácidos grasos) se adhieren mejor durante la formación de los enlaces proteínicos que se forman durante el prensado del queso.

Otro parámetro que se debe considerar, es el desarrollo que se presentó de mesofílicos aerobios en ambas formulaciones para el queso blanco. Al adquirir el cultivo iniciador (LALLEMAND) ya existía la presencia de estos microorganismos. Esto se demostró experimentalmente al determinar la cuenta de mesofílicos aerobios en cada una de las presentaciones de los probióticos siguiendo la metodología de la Sección 4. 1.3.1.2. Cuantificación de microorganismos indicadores. Los resultados obtenidos para la cuenta de mesofílicos aerobios en los probióticos utilizados fueron:

✚ Mesófilos aerobios *L.casei* liofilizado: 380 ± 2.1 UFC/ g_{liofilizado}
(2.8 log UFC/ g_{liofilizado})

✚ Mesófilos aerobios *L.acidophilus* liofilizado: 270 ± 1.8 UFC/ g_{liofilizado}
(2.4 log UFC/ g_{liofilizado})

✚ Mesofílicos aerobios *L.acidophilus* microencapsulado: 260 ± 1.9 UFC/ g_{microencapsulado}
(2.4 log UFC/ g_{microencapsulado})

En la Figura 5.5., se observa que la cantidad de mesofílicos aerobios en el queso blanco con probióticos liofilizados aumenta al transcurrir el tiempo de la vida de anaquel, mientras que los mesófilos aerobios del queso con *L.acidophilus* microencapsulado permanece constante. Como ya se mencionó, cuando los probióticos están en forma libre permanecen en una concentración constante. Se observó que los mesófilos aerobios desarrollaron en 3 órdenes de magnitud, es probable que los metabolitos generados de la interacción con los probióticos cuando se encuentran en forma libre, contribuye al crecimiento del grupo de mesofílicos aerobios; mientras que cuando los probióticos están separados, al no existir esta interacción, no favorece el crecimiento de los mesofílicos aerobios. La presencia de mesofílicos aerobios en los cultivos probióticos empleados en esta parte del proyecto es una contaminación para los quesos elaborados, ya que en aquellos elaborados en la parte I no se existía este grupo (Sección 5.1.3.1.2.); este grupo no sólo fue resistente sino además desarrolló en presencia de los probióticos (formulación de queso blanco con probióticos liofilizados) lo cual podrían afectar la calidad microbiológica y sensorial de los quesos. Y también pone en duda el posible efecto probiótico de las BAL empleadas.

Es recomendable sugerir al proveedor verificar la calidad microbiológica de los cultivos iniciadores.

La norma NOM-243-SSA1-2010 considera al microorganismo *Staphylococcus aureus* como un parámetro de calidad, por lo que, es necesario verificar si este microorganismo no se encuentra dentro de los mesofílicos presentes en las formulaciones. Patlán (2012), realizó la cuantificación de *Staphylococcus aureus* como parámetro de calidad para determinar la vida de anaquel de cuatro formulaciones de queso. El reporte para la cuantificación de *S.aureus* para todas las formulaciones de queso con las que trabajó fue ausencia/ 10 g_{queso}, por lo que, la presencia de *S.aureus* dentro de las ocho formulaciones de queso simbiótico elaboradas para este proyecto también se considera ausente ya que son las mismas formulaciones que elaboró Patlán (2012).

Por otra parte, la ausencia de coliformes totales, hongos y levaduras, muestra que se llevaron a cabo buenas prácticas de manufactura y las condiciones de almacenamiento de los quesos fueron adecuadas. Al igual que en la primera parte del proyecto, estos microorganismos continúan ausentes, por lo que también indica que los probióticos empleados no vienen contaminados con estos grupos de microorganismos.

Los parámetros fisicoquímicos, se encuentran dentro de los límites normales para queso blanco (6.5 a 6.7; Hill, 2007), sin embargo, se puede observar que el queso con probióticos liofilizados presenta un mayor descenso en el pH que el queso con *L.acidophilus* microencapsulado, esto concuerda con que dicho queso presenta mayor desarrollo de mesofílicos aerobios respecto al microencapsulado, los cuales provocan la disminución del parámetro. Este descenso, también se puede deber

a la actividad metabólica debido a que los probióticos liofilizados están interactuando de una forma más directa que cuando está uno microencapsulado. La actividad aumenta, lo cual también nos habla de que existe un proceso metabólico debido al desarrollo de mesofílicos aerobios o de los probióticos.

A pesar de que no se realizó un queso blanco con probióticos sin fibra soluble para ver el efecto que ésta causa sobre los probióticos, no se le puede atribuir algún efecto inhibitorio o negativo sobre los probióticos, puesto que la viabilidad de los mismos permanece prácticamente estable para ambas presentaciones de los probióticos. Escobar *et al.* (2012), indican que la adición de fibra de haba en queso panela, no tiene un efecto significativo sobre la viabilidad de las bacterias probióticas durante 30 días de almacenamiento a 4°C; por otro lado, Rodrigues *et al.* (2011), mencionan que la adición de inulina en una matriz cuajada contribuye favorablemente a un incremento continuo de las células viables del microorganismo *L.acidophilus* La-5 a lo largo de 30 días de madurado.

A pesar de los inconvenientes que se presentan sobre la viabilidad de *L.casei* debido al uso de *L.acidophilus* microencapsulado, la suma de ambos probióticos al término de la vida de anaquel en el queso blanco se encuentra dentro de los límites esperados para que éste cause su efecto benéfico sobre el consumidor (1×10^8 UFC/ g_{queso}). Así mismo, al término de la vida de anaquel del queso blanco con probióticos liofilizados, éste también tiene la cantidad de probióticos suficiente para que cause su efecto benéfico sobre el consumidor.

5.2.3.2. Formulación de queso con chile jalapeño

Tabla 5.9. Resultados de parámetros microbiológicos y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico con chile jalapeño al inicio y final de la vida de anaquel***

Parámetro		Queso jalapeño con <i>L.casei</i> y <i>L.acidophilus</i> liofilizado	Queso jalapeño con <i>L. casei</i> liofilizado y <i>L.acidophilus</i> microencapsulado
L. casei (log UFC/ g _{queso})	Inicio	7.0	7.1
	Fin	2.0	2.0
<i>L.acidophilus</i> (log UFC/ g _{queso})	Inicio	6.8	7.0
	Fin	6.5	6.6
MA (log UFC/ g _{queso})	Inicio	1.47	1.81
	Fin	3.24	3.44
Coliformes (UFC/ g _{queso})	Inicio	Negativo*	Negativo*
	Fin	Negativo*	Negativo*
HL (UFC/ g _{queso})	Inicio	Negativo*	Negativo*
	Fin	Negativo*	Negativo*
pH	Inicio	6.75	6.58
	Fin	6.24	6.50
Acidez (% Ácido láctico)	Inicio	0.03	0.03
	Fin	0.03	0.04

* Sensibilidad del método 10 UFC/ g_{queso}

*****Nota:** Los resultados completos de la cuenta de los probióticos desde el día cero al día final de la vida de anaquel (día 21), se encuentran en las tablas del Anexo 7: Tabla A.7.4. (Queso con chile jalapeño con *L.casei* y *L.acidophilus* liofilizados) y Tabla A.7.5. (Queso con chile jalapeño con *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* microencapsulado).

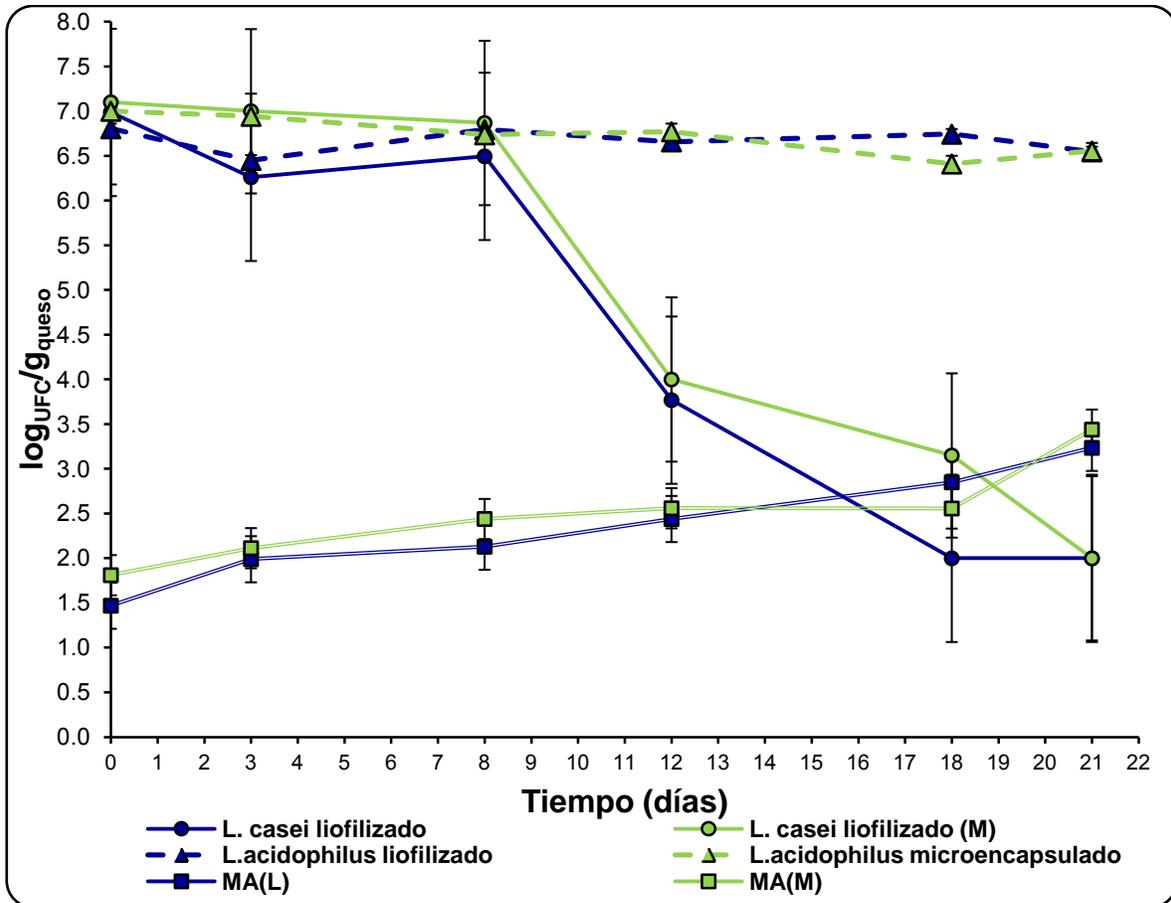


Figura 5.7. Parámetros microbiológicos de la vida de anaquel del queso simbiótico con c hile j alapeño c on probióticos lio filizados (*L.casei* y *L.acidophilus*); y c on probióticos: *L.casei* liofilizado (*L.casei* (M)) y *L.acidophilus* microencapsulado (*L.acidophilus*). Mesófilicos aerobios en el queso con probióticos liofilizados (MA (L)) y con probióticos liofilizado y microencapsulado ((MA (M))).

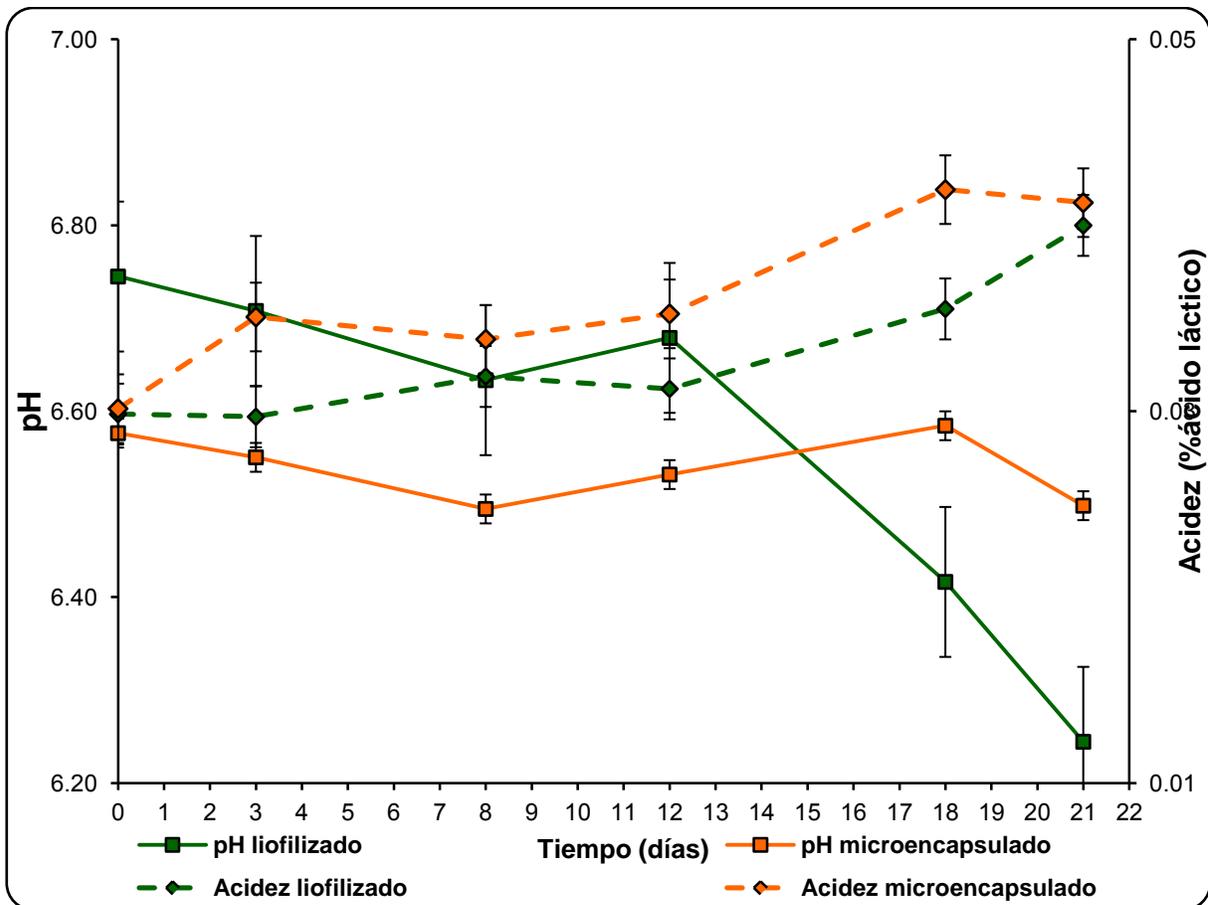


Figura 5.8. Parámetros fisicoquímicos de la vida de anaquel del queso simbiótico con Chile jalapeño con probióticos liofilizados (*L.casei* y *L.acidophilus*); y con probióticos: *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* microencapsulado.

En la Figura 5.7., se observa que en ambos tipos de queso *L.casei* es sumamente sensible al Chile jalapeño, ya sea que se encuentre con *L.acidophilus* microencapsulado o liofilizado, por lo que la inestabilidad del probiótico frente al Chile jalapeño se debe al tipo de cepa utilizada, ya que para ambas formulaciones este microorganismo presenta una tendencia similar a disminuir su viabilidad conforme se desarrolla la vida de anaquel, este comportamiento no se observa en el queso blanco que funcionó como queso control, así mismo, en la parte I, se observa que *L.casei* en el queso con Chile jalapeño mantiene estable su viabilidad a lo largo de la vida de anaquel. Sin embargo, *L.casei* muestra una mayor

estabilidad en el queso jalapeño con *L.acidophilus* microencapsulado, y a que a pesar de que en ambas formulaciones *L.casei* disminuye su concentración, cuando está con *L.acidophilus* microencapsulado mantiene una concentración más elevada que cuando está con *L.acidophilus* liofilizado a lo largo de la vida de anaquel.

En cuanto a *L.acidophilus*, en la Figura 5.7., se observa que ya sea liofilizado o microencapsulado, presenta estabilidad a lo largo de la vida de anaquel. A pesar de que *L.acidophilus* en sus dos presentaciones tiene una mayor estabilidad que *L.casei*, se observa que sí existe reducción en su viabilidad para ambas presentaciones, por lo que sí le afecta la presencia de chile jalapeño, pero es mínima comparándola con el efecto inhibitorio que éste causa sobre *L.casei*.

A pesar del efecto adverso que tiene el chile jalapeño sobre los probióticos, al final de la vida de anaquel se mantiene la concentración recomendada en el queso con chile jalapeño para generar su efecto benéfico al consumidor.

La presencia de mesófilos aerobios en este queso, también se atribuye a una aportación por parte de los probióticos inoculados. Se observa que para este grupo, el queso jalapeño no tiene un efecto inhibitorio, ya que éstos crecen de una manera similar en ambos tipos de queso a lo largo de la vida de anaquel; esto se confirma con el descenso del pH y el aumento de acidez en los quesos (Figura 5.8.), estos cambios en los parámetros fisicoquímicos, demuestran que existe una actividad metabólica por parte de estos microorganismos. Este descenso, no se puede atribuir a la acción metabólica de los probióticos puesto que éstos no crecen a lo largo de la vida de anaquel. El pH en este tipo de quesos, es menor

con respecto al queso blanco, debido a que el chile disminuye el pH por la naturaleza de los mismos.

A pesar de la presencia de mesofílicos aerobios no hubo desarrollo de coliformes, hongos y levaduras en este queso, por lo que los parámetros de calidad del queso están dentro de los límites esperados.

5.2.3.3. Formulación de queso con chile chipotle

Tabla 5.10. Resultados de parámetros microbiológicos y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico con chile chipotle al inicio y final de la vida de anaquel***

Parámetro		Queso chipotle con <i>L.casei</i> y <i>L.acidophilus</i> liofilizado	Queso chipotle con <i>L.casei</i> liofilizado y <i>L.acidophilus</i> microencapsulado
L.casei (log UFC/ g _{queso})	Inicio	7.1	6.6
	Fin	2.0	6.9
L.acidophilus (log UFC/ g _{queso})	Inicio	6.8	6.3
	Fin	6.6	6.0
MA (log UFC/ g _{queso})	Inicio	1.8	2.0
	Fin	2.5	3.3
Coliformes (UFC/ g _{queso})	Inicio	Negativo*	Negativo*
	Fin	Negativo*	Negativo*
HL (UFC/ g _{queso})	Inicio	Negativo*	Negativo*
	Fin	Negativo*	Negativo*
pH	Inicio	6.76	6.61
	Fin	6.43	6.58
Acidez (% Ácido láctico)	Inicio	0.03	0.03
	Fin	0.03	0.04

* Sensibilidad del método 10 UFC/ g_{queso}

***Nota: Los resultados completos de la cuenta de los probióticos desde el día cero al día final de la vida de anaquel (día 21), se encuentran en las tablas del Anexo 7 : Tabla A.7.6. (Queso con chile chipotle con *L.casei* y *L.acidophilus* liofilizados) y Tabla A.7.7. (Queso con chile chipotle con *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* microencapsulado).

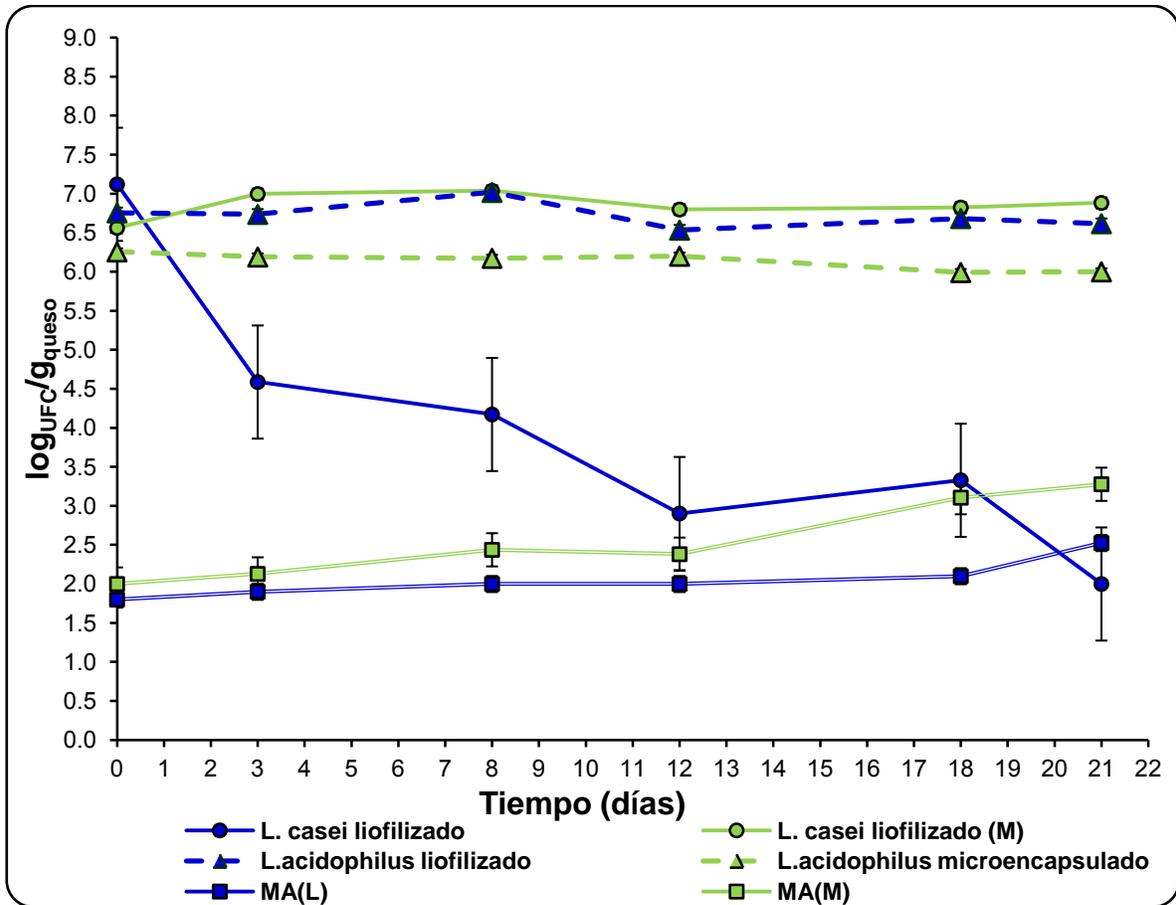


Figura 5.9. Parámetros microbiológicos de la vida de anaquel del queso simbiótico con c hile c hipotle c on probióticos l iofilizados (*L.casei* y *L.acidophilus*); y c on probióticos: *L.casei* liofilizado (*L.casei* (M)) y *L.acidophilus* microencapsulado. Mesofílicos aer obios en el q uesto c on pr obiéticos l iofilizados (MA (L)) y c on probióticos liofilizado y microencapsulado ((MA (M)).

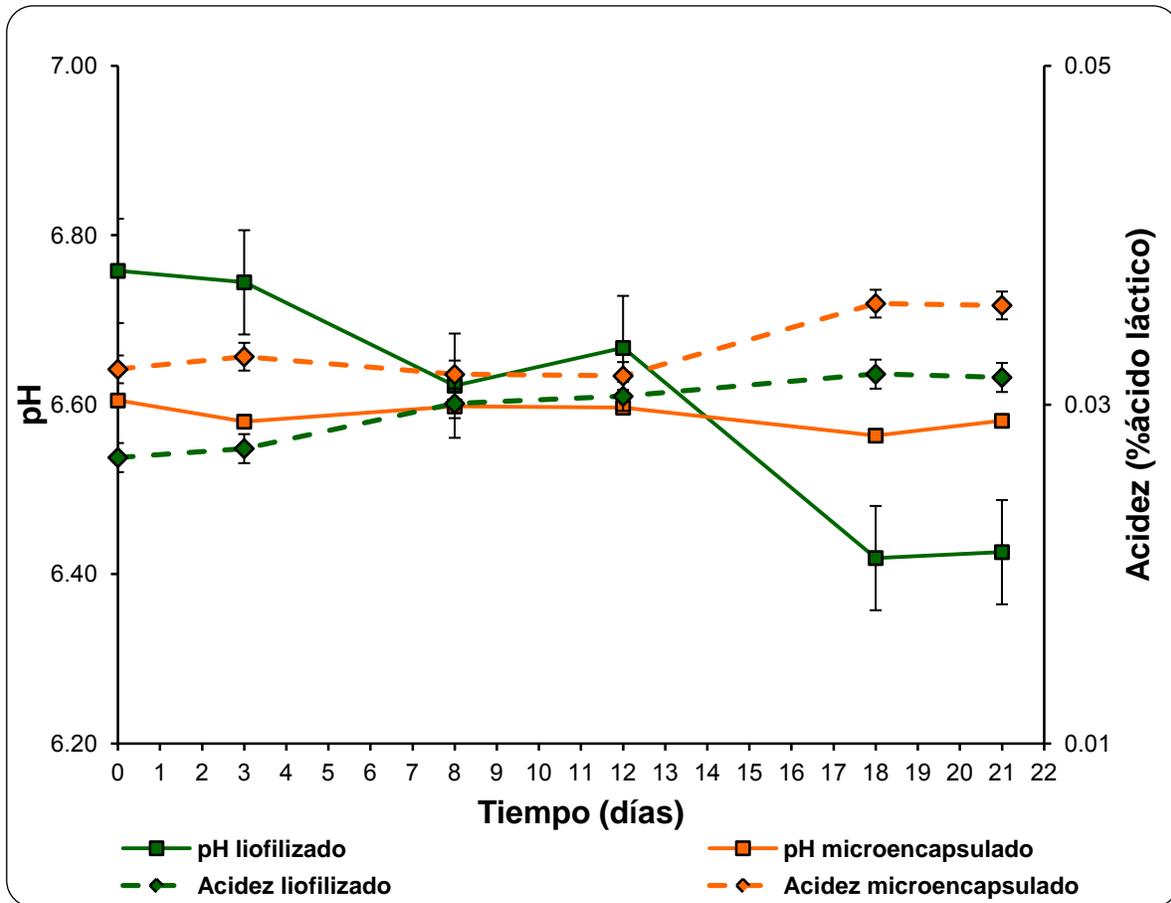


Figura 5.10. Parámetros fisicoquímicos de la vida de anaquel del queso simbiótico con Chile chipotle con probióticos liofilizados (*L.casei* y *L.acidophilus*); y con probióticos: *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* microencapsulado.

En la Figura 5.9., se observa que la concentración de *L.casei* se ve reducida considerablemente cuando se encuentra con *L.acidophilus* liofilizado; mientras que cuando *L.casei* se encuentra en mezcla con *L.acidophilus* microencapsulado además de mantener su viabilidad, aumenta su población a lo largo de la vida de anaquel (inicia en 6.6 log UFC/ g_{queso} y termina en 6.9 log UFC/ g_{queso}). En la parte I del proyecto, se observó que *L.casei* aumenta su población únicamente cuando se encuentra en el queso con Chile chipotle debido al alto contenido en sacarosa con la que se elabora el preparado de Chile chipotle, este comportamiento también

se observa para la formulación con el queso con chile chipotle de la parte II aún con la nueva cepa de *L.casei*.

Respecto a *L.acidophilus*, se observa que la estabilidad durante la vida de anaquel se debe a las características de las cepas utilizadas y no a la protección que aporta la microcápsula, ya que cuando éste se encuentra en forma liofilizada su estabilidad es similar a cuando se encuentra en forma microencapsulada.

Pese a la pérdida de viabilidad en los probióticos en ambas formulaciones de queso con chile chipotle, al final de la vida de anaquel, la suma de los probióticos cumple con la cantidad mínima requerida para ejercer su efecto benéfico al hospedero.

En cuanto a la presencia de mesofílicos aerobios en las formulaciones con chile chipotle, se atribuye una vez más, a una adaptación inicial de estos microorganismos por parte de los probióticos. En ambos tipos de queso con chile chipotle, se observa que este ingrediente tampoco ejerce un efecto inhibitorio sobre los mesofílicos aerobios, ya que éstos sí aumentan su población a lo largo de la vida de anaquel; sin embargo, el aumento en la viabilidad de este grupo, es menor que el aumento en la viabilidad de los mesofílicos aerobios que es tan presentes en el queso con chile jalapeño. Al inicio de la vida de anaquel, el promedio de mesofílicos aerobios en las formulaciones de queso con chile jalapeño y chile chipotle es de $2 \log \text{ UFC/ g}_{\text{queso}}$, al final de la vida de anaquel, en promedio los quesos con chile jalapeño tienen una cuenta de $3.34 \log \text{ UFC/ g}_{\text{queso}}$ mientras que los mesofílicos aerobios de los quesos con chile chipotle es de $2.9 \log \text{ UFC/ g}_{\text{queso}}$. El hecho de que los mesofílicos aerobios crezcan más en los quesos con chile jalapeño que en los quesos con chile chipotle, se atribuye a que

el chile chipotle tiene un mayor efecto inhibitorio sobre los mesófilos aerobios que el chile jalapeño. Esto concuerda con el pH de los quesos con chile chipotle, ya que la reducción de este parámetro durante la vida de anaquel es menor comparándolos con el pH de los quesos con chile jalapeño, el poco descenso del pH que se observa en los quesos con chile chipotle, explica que hay una acción metabólica microbiológica menor debido a que los mesófilos aerobios se desarrollan en menor cantidad en estas formulaciones que en las de chile jalapeño.

5.2.3.4. Formulación de queso con epazote

Tabla 5.11. Resultados de parámetros microbiológicos y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico con epazote al inicio y final de la vida de anaquel***

Parámetro		Queso epazote con <i>L.casei</i> y <i>L.acidophilus</i> liofilizado	Queso epazote con <i>L.casei</i> liofilizado y <i>L.acidophilus</i> microencapsulado
<i>L.casei</i> (log UFC/ g _{queso})	Inicio	7.4	7.1
	Fin	4.0	7.0
<i>L.acidophilus</i> (log UFC/ g _{queso})	Inicio	7.4	6.8
	Fin	6.4	6.4
MA (log UFC/ g _{queso})	Inicio	1.5	2.1
	Fin	2.9	3.5
Coliformes (UFC/ g _{queso})	Inicio	Negativo*	Negativo*
	Fin	Negativo*	Negativo*
HL (UFC/ g _{queso})	Inicio	Negativo*	Negativo*
	Fin	Negativo*	Negativo*
pH	Inicio	6.79	6.65
	Fin	6.56	6.65
Acidez (% Ácido láctico)	Inicio	0.03	0.03
	Fin	0.03	0.03

***Nota: Los resultados completos de la cuenta de los probióticos desde el día cero al día final de la vida de anaquel (día 21), se encuentran en las tablas del Anexo 7: Tabla A.7.8. (Queso con epazote con *L.casei* y *L.acidophilus* liofilizados) y Tabla A.7.9. (Queso con epazote con *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* microencapsulado).

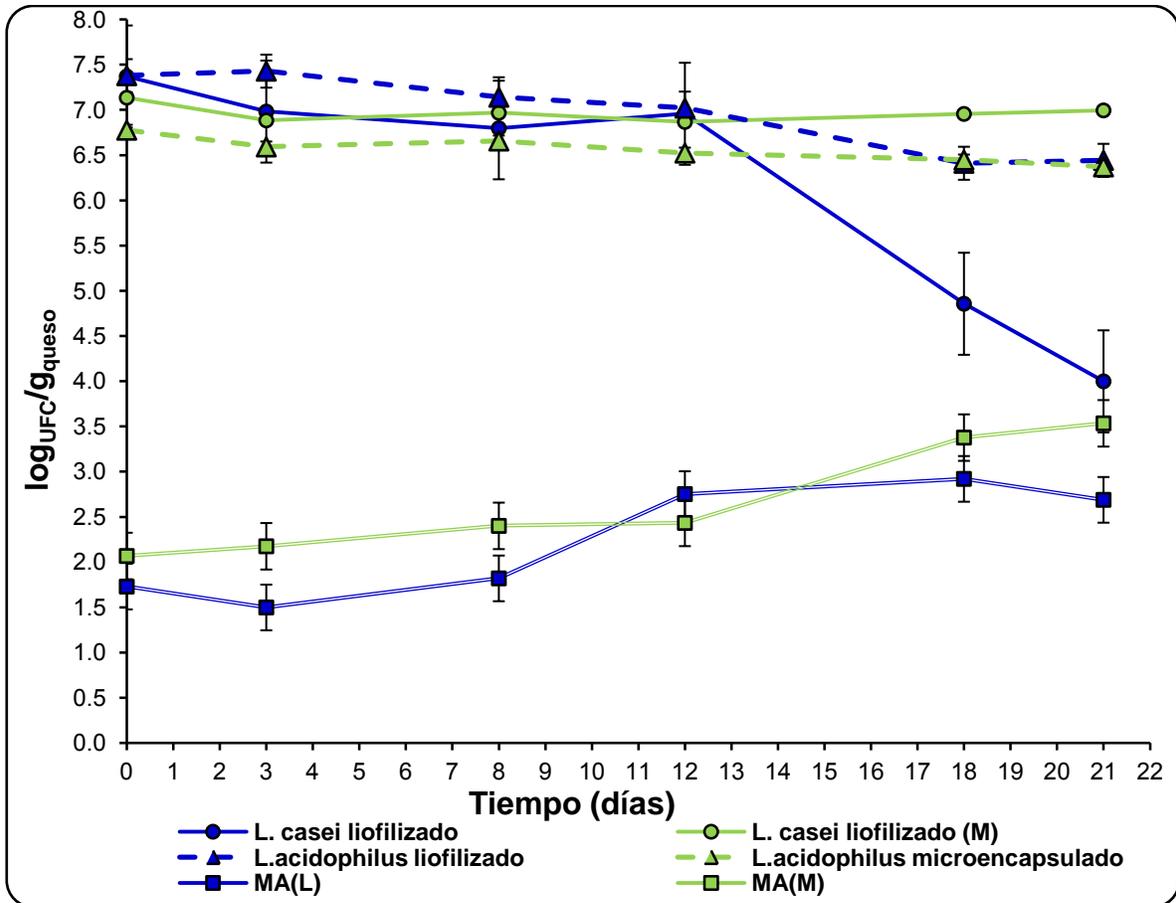


Figura 5.11. Parámetros microbiológicos de la vida de anaquel del queso simbiótico con epazote con probióticos liofilizados (*L.casei* y *L. acidophilus*); y con probióticos: *L.casei* liofilizado (*L.casei* (M)) y *L. acidophilus* microencapsulado. Mesófilos aerobios en el queso con probióticos liofilizados (MA (L)) y con probióticos liofilizado y microencapsulado ((MA (M))).

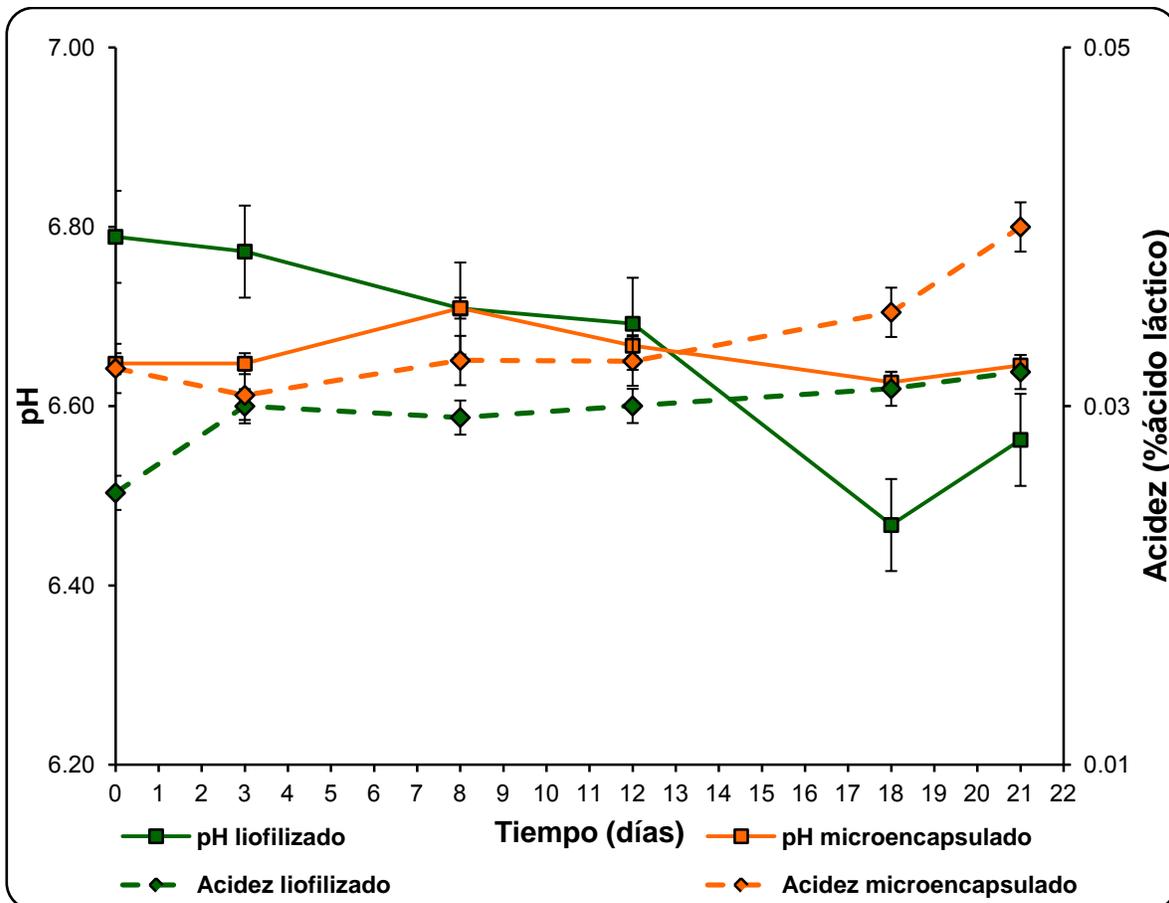


Figura 5.12. Parámetros fisicoquímicos de la vida de anaquel del queso simbiótico con epazote con probióticos liofilizados (*L.casei* y *L.acidophilus*); y con probióticos: *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* microencapsulado.

Dentro de la bibliografía consultada, no se encontraron datos que muestren que el epazote (*Chenopodium ambrosioides*) es un vegetal que tenga algún efecto inhibitorio sobre los probióticos. Sin embargo, en la medicina popular de muchos países de América Latina y el Caribe utilizan las hojas en infusión como un remedio analgésico contra un gran número de enfermedades. Además, también se utiliza ampliamente como ingrediente culinario. El epazote, cuenta con muchos compuestos activos, uno de ellos: el ascaridol, del cual se ha demostrado que tiene actividad antiprotozoaria y fungitóxica. Sin embargo, las concentraciones en que éste se encuentra en las hojas, son mínimas por lo que los efectos

mencionados sólo se han observado con el uso de su aceite esencial (Gómez, 2008).

Las partes aéreas de la planta contienen un aceite esencial rico en *caridol*, peróxido monoterpénico que puede encontrarse en proporción del 45% y hasta del 75% en el aceite esencial. Otros terpenoides como el *para-cimeno*, *limoneno*, *mirceno*, *beta-pineno*, *alcanfor*, *alfa-terpineno*, *terpineol* y *safrol*, *alcanos* y *ácido butírico* en pequeñas cantidades, también están presentes en el aceite. Los flavonoides *ambroside* y *ramnósido de kamferol* se han detectado en las hojas y dos glicósidos de *kamferol* en el fruto. Además del aceite esencial, la flor contiene componentes *fenílicos*, los *ácidos ferúlico* y *vanílico*; y en la semilla, *saponinas* y *esteroles*. En la raíz se indica la presencia de las *saponinas*, *quenopodiósidos A* y *B*, y *heterósidos triterpénicos* (Epazote, Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Se podría pensar que los compuestos presentes en las hojas pudieran tener algún efecto antimicrobiano y afectar la viabilidad de los probióticos. En la Figura 5.11. se observa que para el queso con probióticos liofilizados, la presencia del epazote les afecta a ambos, ya que *L.casei* reduce su viabilidad en 3 unidades logarítmicas mientras que *L.acidophilus* reduce su viabilidad 1 unidad logarítmica al término de la vida de aquel; mientras que para el queso con epazote con *L.acidophilus* microencapsulado, éste se mantiene en el mismo orden logarítmico al igual que *L.casei* ya que para ambos probióticos sólo se reduce su cuenta en unidades dentro del mismo orden logarítmico.

El epazote, como se menciona en el Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana (2009), está formado por distintos compuestos químicos, por

lo tanto, es posible que alguno de estos compuestos interfiera con la actividad metabólica de *L.casei* o *L.acidophilus*.

Aun cuando se presentó la reducción en la viabilidad de los probióticos en ambas formulaciones de queso con epazote, principalmente en la que lleva a los probióticos liofilizados, la cuenta total entre ambos probióticos al término de la vida de anaquel, sería suficiente para causar los efectos benéficos esperados sobre la salud de las personas que lo consuman.

Los mesofílicos aerobios en este queso se encuentran en mayor cantidad respecto a las otras formulaciones de queso, ya que el epazote es una planta que se cultiva en el suelo, por lo cual, a pesar del pretratamiento que se hace para agregarlo a la cuajada, el epazote incorporó parte de su microbiota al queso.

El pre-tratamiento es un proceso de sanitización que fue estandarizado por Patlán (2012), el cual consiste en lavar el epazote con agua corriente y detergente, reducir la carga microbiana a través del uso de un desinfectante a base de una mezcla de ácidos orgánicos, finalizando con un tratamiento térmico para reducir en mayor cantidad la microbiota así como para aumentar el sabor del epazote. La cuenta de mesofílicos aerobios después de este tratamiento fue de:

$$37 \times 10^1 \text{ UFC/ g}_{\text{epazote}}$$

Los mesofílicos aerobios al ser parte de la microbiota del epazote, no se ven afectados por el efecto inhibitorio del mismo ya que estos microorganismos son acompañantes naturales del epazote, por lo que probablemente generan resistencia a los componentes inhibitorios del mismo y esto les permite desarrollarse a lo largo de la vida de anaquel. Sin embargo, estos microorganismos no ejercen acción metabólica en el queso, ya que tanto el pH

como la acidez de los quesos permanecen constantes durante la vida de anaquel. El comportamiento de estos parámetros fisicoquímicos se asemeja más a l comportamiento de los parámetros fisicoquímicos de l queso blanco que a l os quesos con chile chipotle o jalapeño, lo cual es de esperarse, ya que el epazote no es un aditivo que modifique considerable el pH de los alimentos que lo contienen a diferencia de los chiles que sí modifican el pH del alimento que los contiene debido a la naturaleza de los mismos.

A pesar de la cuenta microbiana que aporta el epazote al queso, la concentración de mesofílicos se encuentra considerablemente baja comparada con los otros quesos desarrollados, ya que no exceden por más de un orden logarítmico las cuentas de los mesofílicos aerobios de las otras formulaciones. Asimismo, el epazote no aporta coliformes totales, hongos y levaduras al queso, ya que éstos permanecen ausentes a lo largo de la vida de anaquel, lo cual nos habla de que el pretratamiento de l epazote es eficiente. La ausencia de estos dos grupos de indicadores en el queso, indican que durante el proceso de elaboración las buenas prácticas de manufactura se llevaron a cabo de una manera eficiente al igual que las condiciones de almacenamiento.

5.2.4. Comparación de las formulaciones de quesos elaborados en la parte I con los elaborados en la parte II

En la parte I del proyecto se observó que *L.casei* es un probiótico que tiene una viabilidad constante dentro de las concentraciones recomendadas para causar su efecto benéfico cuando está presente en las tres formulaciones de queso (blanco, jalapeño y chipotle).

Sin embargo, *L.acidophilus* sí se ve afectado en las formulaciones de queso blanco, ya que, ésta se reduce en mayor cantidad con respecto a lo que sucede con *L.casei*. Este aspecto se consideró al incluir en la parte II del proyecto, una barrera química que proteja a *L.acidophilus*: la microcápsula. Sin embargo en esta segunda parte, las cepas con las cuales se trabajó fueron diferentes a las de la primera parte y se observó que para la formulación de queso blanco existe se favorece la interacción entre *L.casei* y *L.acidophilus* cuando es tan en contacto directo, lo cual mantiene su viabilidad, mientras que cuando *L.acidophilus* está microencapsulado, la viabilidad de *L.casei* se ve afectada mientras que *L.acidophilus* la conserva por acción de la microcápsula. Por otra parte, para las formulaciones con chile jalapeño, chile chipotle y con epazote, se observa que la viabilidad se ve afectada por el uso de estas especias cuando los probióticos se encuentran liofilizados, mientras que cuando *L.acidophilus* está microencapsulado, la viabilidad de ambos probióticos se mantiene.

Este comportamiento nos habla de que trabajar con los mismos microorganismos, en este caso *L.casei* y *L.acidophilus*, no garantiza que éstos presentarán el mismo comportamiento frente a las diferentes formulaciones de queso. Ya que el comportamiento de las cepas, aun cuando se trate del mismo género y especie, será diferente, pues la reacción de éstas a las diferentes condiciones a las que son expuestas es única para cada una de ellas. Por lo que, es importante caracterizar el comportamiento de las cepas de diferentes proveedores en las formulaciones que se estén trabajando.

VI. Conclusiones

La cantidad del inóculo se estableció para que los quesos tuvieran una cuenta inicial de 1×10^8 UFC/ g_{queso} entre ambos probióticos (*L.casei* + *L.acidophilus*), cantidad que permite mantenerlos al final de la vida de anaquel dentro de los límites para considerar al queso como alimento probiótico.

El éxito en el mantenimiento de las bacterias probióticas en el queso depende de las cepas utilizadas, de su protección mediante el uso de microorganismos microencapsulados y de la matriz en que se encuentran.

La sobrevivencia de los probióticos expuestos a ambientes no favorables como Chile o Papáote dependerá del tipo de cepa utilizada, y a que, aun siendo probióticos del mismo género y especie, cada cepa se comporta de manera diferente.

Para el estudio de la vida de anaquel de los probióticos deben utilizarse medios y condiciones de cultivo que permitan diferenciarlos entre ellos; los cuales también dependerán del tipo de cepa utilizada, ya que cada cepa probiótica se comporta de manera diferente.

***Lactobacillus casei* cepa Rosell-215 ND- 100B (INSTITUT ROSELL LALLEMAND)**, se puede cuantificar selectivamente en el medio MRS-NaCl, a 37°C, 72 h, a anaerobiosis, cuando se encuentra en mezcla con *L.acidophilus* R0052-150 o con *L.acidophilus* Probiocap™ Rosell-52 ME, 50.

***Lactobacillus acidophilus* R0052-150, (INSTITUT ROSELL LALLEMAND) y *Lactobacillus acidophilus* Probiocap™ Rosell-52 ME, 50 (INSTITUT ROSELL LALLEMAND)**, se pueden cuantificar selectivamente en el medio MRS a 43 °C, 72 h, a anaerobiosis; cuando se encuentran en mezcla con *L.casei* Rosell-215 ND-100B.

El queso fresco con fibra soluble, en sus diferentes presentaciones: blanco, con chile chipotle, chile jalapeño y epazote, es un buen vehículo para la inclusión de probióticos como *L.casei* y *L.acidophilus*.

El uso de un probiótico microencapsulado presenta ventajas y desventajas dentro de una matriz alimentaria como lo es el queso, ya que protege la viabilidad del microorganismo, pero puede impedir la interacción con otros microorganismos presentes, en este caso con *L.casei*. Sin embargo, esta interacción dependiendo del tipo de queso puede ser benéfica o desfavorable, por lo que las mejores combinaciones para la inclusión de estos probióticos en las diferentes formulaciones de queso son:

- a) Queso fresco simbiótico blanco: *L.casei* y *L.acidophilus* en forma liofilizada.
- b) Queso fresco simbiótico con chile jalapeño: *L.casei* liofilizado con *L.acidophilus* microencapsulado.
- c) Queso fresco simbiótico con chile chipotle: *L.casei* liofilizado con *L.acidophilus* microencapsulado.
- d) Queso fresco simbiótico con epazote: *L.casei* liofilizado con *L.acidophilus* microencapsulado.

Los microorganismos indicadores y los parámetros fisicoquímicos realizados a lo largo de la vida de anaquel, permanecen dentro de los límites establecidos, lo que, refleja las buenas prácticas higiénicas que se llevaron a cabo durante la elaboración de los productos.

El queso es un alimento versátil que permite la utilización de aditivos para modificar su sabor; sin embargo, el uso de ingredientes como chile jalapeño, chile chipotle o epazote, sí afecta la viabilidad de los probióticos. Sin embargo, el ajuste del inóculo permite que la cantidad de probióticos al final de la vida de anaquel sea tal que cumpla con la recomendación para considerar al queso fresco con fibra soluble en sus diferentes presentaciones como un alimento funcional y simbiótico.

VII. Perspectivas y recomendaciones

1. Análisis sensorial de los quesos simbióticos.

La adición de altos números de células viables y activas metabólicamente pueden afectar la calidad del producto, especialmente las características sensoriales (Gomes *et al.*, 2009). Por lo que es necesario realizar análisis de perfil sensorial para ver cómo se afectan las características sensoriales de los quesos elaborados con los probióticos utilizados.

2. Análisis de la influencia del envase de los quesos simbióticos sobre los probióticos.

El sistema de envase tiene que ser considerado como un paso importante dentro del proceso de alimentos funcionales lácteos y deben tomarse en consideración para mejorar la estabilidad de las bacterias probióticas en los alimentos (Vermeiren *et al.*, 1999), debido a esto se deberá utilizar un envase de atmósfera modificada para los quesos y ver la influencia que tiene el envase sobre la concentración de los probióticos y sobre el tiempo de vida de anaquel de los quesos simbióticos.

3. Adquisición de probióticos comerciales

La pureza de un inóculo debe considerarse antes de elegir un proveedor, ya que de lo contrario, el inóculo puede aportar una carga microbiana que modifique los parámetros microbiológicos de calidad del producto donde se adicione.

4. Métodos específicos para la diferenciación de la cuantificación de probióticos

Los probióticos utilizados son bacterias que tienen una alta cercanía en cuanto a sus condiciones óptimas de crecimiento y en sus requerimientos nutrimentales para desarrollarse en un medio, por lo que se sugiere buscar un método más específico de cuantificación para diferenciar a *L.casei* de *L.acidophilus* cuando se encuentran mezclados, ya sea mediante el uso de medios con nutrientes más específicos requeridos por cada probiótico o mediante el uso de técnicas moleculares que aseguren la cuantificación específica de cada probiótico presente en el alimento.

VIII. Anexos

ANEXO 1: Preparación de la muestra y cuenta por vertido en placa

Las actividades se realizan en condiciones estériles. Los medios y soluciones diluyentes se utilizan estériles, la composición y preparación de los mismos se encuentran en el ANEXO 2. Todo el material utilizado se esterilizó por calor húmedo a 121 °C/ 15 min /15 lb (*Autoclave Yamato SM300*).

Preparación de la dilución primaria

Pesar 10 g de queso y colocar en una bolsa para *Stomacher*[®]. Adicionar 90 mL de agua peptonada. Colocar la bolsa en homogeneizador peristáltico (*Stomacher*[®] 400 SEWARD) y realizar la digestión mecánica a la velocidad y tiempo que cada método requiera. Repartir el contenido en tubos Falcon de 50 mL dividido en 2 partes iguales. Centrifugar a 1698.24 g por 5 min (*Centrifuga Heraeus Modelo Biofuge Primo R*). Juntar ambas partes del sobrenadante en matraz Erlenmeyer de 125 mL. Homogenizar el digerido con movimientos circulares hacia la derecha por 10 s y hacia la izquierda por 10 s más.

Diluciones secundarias

Tomar 1 mL de la dilución primaria y agregarlo a un tubo con 9 mL de agua peptonada (Dilución 1:100). Agitar la muestra manualmente en un arco de 30 cm con 25 movimientos de arriba abajo, efectuados en un tiempo de 7 segundos. Realizar las diluciones decimales seriadas siguientes según lo requiera la metodología.

Inoculación de diluciones

Inocular por duplicado, 1 mL de la dilución correspondiente en caja Petri desechable. Agregar de 18 a 20 mL del medio fundido y mantenido a 45 °C. Para homogenizar, mezclar mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás a adelante, sobre una superficie lisa y horizontal hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el medio no moje la cubierta de las cajas. Dejar solidificar. El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no debe exceder de 20 minutos. Incluir una caja sin inóculo por cada lote de medio y diluyente preparado como testigo de esterilidad. Incubar las cajas en posición invertida durante el tiempo y a la temperatura que se requiera, según la metodología de la cual se trate, como se indica para cada una de las metodologías propuestas en IV. Metodología.

Bibliografía

Adaptaciones realizadas a normas: NOM-092-SSA1-1994 y NOM-110-SSA1-1994.

ANEXO 2: Preparación, composición de medios de cultivo y soluciones

Agar Cuenta Estándar (BD Difco™)	
Triptona	5 g
Extracto de levadura	2.5 g
Dextrosa (Glucosa)	1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

Para preparar 1 L de medio, suspender 23.5 g del polvo en 1 L de agua destilada, calentar a ebullición por 1 min para su completa disolución. Esterilizar en autoclave a 121 °C/ 15 min/ 15 lb. pH final = 7.0 ± 0.2

Agar MRS BD Difco™ Lactobacilli MRS agar	
Proteosa peptona No.3	10.0 g
Extracto de carne	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Dextrosa	20.0 g
Polysorbato 80	1.0 g
Citrato de amonio	2.0 g
Acetato de sodio	5.0 g
Sulfato de magnesio	0.1 g
Sulfato de manganeso	0.05 g
Fosfato dipotásico	2.0 g
Agar	15.0 g

Suspender 70 g del medio en 1 L de agua destilada. Agitar y calentar con agitación frecuente, hervir por 1 min para disolver por completo los componentes. Esterilizar a 121 °C / 15 min/ 15 lb. pH final 6.5 ± 0.2

Agar MRS-LiCl	
Agar MRS BD Difco™ Lactobacilli MRS agar	70 g
Cloruro de litio (<i>J.T. Baker</i>)	5 g
Agua destilada	1 L

Para preparar un litro de medio, pesar 5 g de LiCl y 70 g del medio comercial MRS, suspender en 1 L de agua destilada. Agitar y calentar con agitación frecuente, hervir por 1 min para disolver por completo los componentes. Esterilizar a 121 °C / 15 min/ 15 lb, pH final 6.5 ± 0.2

Agar MRS-NaCl

Agar MRS BD Difco™ Lactobacilli MRS agar	70 g
Cloruro de sodio (<i>J.T. Baker</i>)	40 g
Agua destilada	1 L

Para preparar un litro de medio, pesar 40 g de NaCl y 70 g del medio comercial MRS, suspender en 1 L de agua destilada. Agitar y calentar con agitación frecuente, hervir por 1 min para disolver por completo los componentes. Esterilizar a 121 °C / 15 min/ 15 lb, pH final 6.5 ± 0.2

Agar MRS-V

Agar MRS BD Difco™ Lactobacilli MRS agar	70 g
Vancomicina 0.05 % (<i>USBiological</i> ®)	2 mL
Agua destilada	1 L

Para preparar un litro de medio, pesar 70 g del medio comercial MRS, suspender en 1 L de agua destilada. Agitar y calentar con agitación frecuente, hervir por 1 min para disolver por completo los componentes. Esterilizar a 121 °C / 15 min/ 15 lb, pH final 6.5 ± 0.2

Para la solución de vancomicina al 0.05%, pesar 50 mg de vancomicina y disolver en 100 mL de agua destilada. Esterilizar por filtración con un filtro Millipore® de 0.22 µm. En condiciones de esterilidad, agregar 2 mL de la solución estéril al medio MRS, agitar suavemente para incorporar la solución de vancomicina.

Agar Dextrosa y Papa (BD Bioxon®)

Almidón de papa (infusión de papa sólidos)	4.0 g
Dextrosa (Glucosa)	20.0 g
Agar	15.0 g
Agua destilada	1 L

Disolver 39 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, remojar de 10 a 15 min, calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 min.

pH final 5.6 ± 0.2 a 25 °C. Esterilizar a 121 °C durante 15 min y 15 lb de presión. Una vez esterilizado el medio tiene que acidificarse para obtener un pH = 3.5 ± 0.2, esto se logra agregando 14 mL de una solución de ácido tartárico al 10 % estéril por cada litro de medio.

Alcohol-Acetona (GRAM)

Etanol (95%)	800 mL
Acetona	200 mL

Mezclar el alcohol y la acetona en un frasco ámbar, homogenizar y almacenar.

Buffer especial de fosfatos

Bacto-peptona (<i>Becton, Dicson and Company</i>)	0.1 g
Fosfato dibásico de potasio (<i>J.T. Baker</i>)	0.25 g
Fosfato monobásico de potasio (<i>J.T. Baker</i>)	0.25 g
Cloruro de sodio (<i>J.T. Baker</i>)	0.85 g
Tween 80 (<i>droguería Cosmopolita S.A. de C.V</i>)	0.1 g
Agua destilada	100 mL

Pesar todos los componentes y agregar 100 mL de agua destilada. Agitar hasta la completa disolución e integración de los mismos. Esterilizar en autoclave a 121 °C/ 15 min/ 15 lb. Refrigerar hasta su uso.

Buffer regular de fosfatos

Peptona de soya (<i>BD Bioxon®</i>)	0.1 g
Fosfato dibásico de potasio (<i>J.T. Baker</i>)	0.121 g
Fosfato monobásico de potasio (<i>J.T. Baker</i>)	0.034 g
Agua destilada	100 mL

Pesar todos los componentes y agregar 100 mL de agua destilada. Agitar hasta la completa disolución e integración de los mismos. Esterilizar en autoclave a 121 °C/ 15 min/ 15 lb. Refrigerar hasta su uso.

Cristal violeta de GRAM

Cristal violeta	1 g
Agua destilada	100 mL

Disolver el colorante en agua, homogenizar y guardar en frasco ámbar.

Citrato de sodio al 2%

Citrato de sodio (<i>Sigma-Aldrich</i>)	2 g
Agua destilada	100 mL

Pesar el citrato de sodio y agregar 100 mL de agua destilada. Agitar hasta su completa disolución. Esterilizar en autoclave a 121 °C/ 15 min/ 15 lb. Conservar en refrigeración.

Fenolftaleína al 1%

Fenolftaleína (<i>Sigma-Aldrich</i>)	1 g
Etanol 96%	100 mL

Pesar 1 g de fenolftaleína y disolver en 100 mL de etanol. Guardar en frasco ámbar. Caducidad 3 meses.

Solución salina isotónica + peptona 0.1%

Cloruro de sodio (<i>J.T.Baker</i>)	8.5 g
Bacto-peptona (<i>Becton, Dickson and Company</i>)	1.0 g
Agua destilada	1 L

Para preparar un litro se pesan los reactivos, se homogeniza y se esteriliza a 121 °C/ 15 min/ 15 lb.

Lugol (Solución de yodo yodurado) de GRAM

Yodo metálico (I_2)	1 g
Yoduro de potasio (KI)	2.0 g
Agua destilada	300 mL

En un mortero mezclar el I_2 y el KI, molerlos finamente. Agregar una pequeña cantidad de agua para lavar el material y transvasar a frasco ámbar, aforar con el volumen restante de agua y agitar vigorosamente.

ANEXO 3: Determinación de pH y acidez en queso

Preparación del extracto

Se pesaron 9 g ramos de la muestra en balanza analítica (Voyager OHAUS V10640), se suspendieron en 100 mL de agua destilada (pH=7, T=40°C) dentro de un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se agitó durante 15 min a 175 rpm. A continuación, se filtró la suspensión con manta de cielo para separar los sólidos.

Medición de pH

Se midió el potencial de hidrógeno del extracto con un potenciómetro calibrado (Modelo Hanna HI 4211) empleando un electrodo de vidrio en combinación con un electrodo de referencia de calomel (Beckman Lote No. 5310ª Modelo 511064).

Medición de acidez

Se tomó una alícuota de 25 mL del extracto y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Se adicionaron 0.5 mL de solución alcohólica de fenolftaleína al 1% y se procedió a titular con una solución valorada de NaOH 0.01 N con agitación continua, hasta que se observó un vire de color rosa claro (retención del color por lo menos 30 s). El cálculo para determinar la acidez, expresada como % ácido láctico, se muestra a continuación:

$$\% \text{ Ácido láctico} = \left(\frac{((\text{mL de NaOH gastados}) * (\text{Normalidad de NaOH}) * (0.09 \text{ meq de Ácido láctico}))}{\text{g muestra}} \right) \times 100$$

Bibliografía

Adaptaciones realizadas a la Norma Mexicana NMX-F-099-1970 y Norma Mexicana NMX-F-206-1986.

ANEXO 4: Fórmula matemática (Fórmula 1) para la determinación de la cantidad del inóculo

La cuenta en placa realizada en este anexo, se realizó siguiendo la metodología del Anexo 1, el medio utilizado fue agar MRS (*BD Difco™ Lactobacilli MRS agar*), incubación anaerobia (Jarra de anaerobiosis *Anaero Jar™ AG0025A Oxoid*, sistema de anaerobiosis: *Anaero GEN™ 2.5 L Oxoid*), a 37°C por 48 h. Diluciones inoculadas 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . Rango de sensibilidad, estadísticamente confiable: 30 a 300 UFC.

Siguiendo la metodología propuesta en la sección 4.1.1.2. *Determinación de la cantidad del inóculo*, las fórmulas matemáticas utilizadas para las cepas fueron las siguientes:

- *Lactobacillus casei* cepa *FD-DVS 413®* Probio-Tec® CHR HA NSEN.

Concentración del liofilizado: 5.8×10^{10} UFC/ g_{lio}filizado

$$\text{Fórmula} = \frac{6.90 \times 10^{-4} \text{ g liofilizado}}{\text{g cuajada}}$$

- *Lactobacillus acidophilus* cepa *FD-DVS LA-5®* - Probio-Tec^T CHR HANSEN.

Concentración del liofilizado: 3.3×10^{10} UFC/ g_{lio}filizado

$$\text{Fórmula} = \frac{1.21 \times 10^{-3} \text{ g liofilizado}}{\text{g cuajada}}$$

- *Lactobacillus casei* cepa Rosell-215 N D- 100B INSTITUT ROSELL

LALLEMAND. Concentración del liofilizado: 1.3×10^{11} UFC/ g_{lio}filizado

$$\text{Fórmula} = \frac{3.08 \times 10^{-4} \text{ g liofilizado}}{\text{g cuajada}}$$

- *Lactobacillus acidophilus* R0052-150, INSTITUT ROSELL L ALLEMAND.

Concentración del liofilizado: 2.3×10^{11} UFC/ g liofilizado

$$\text{Fórmula} = \frac{1.74 \times 10^{-4} \text{ g liofilizado}}{\text{g cuajada}}$$

- *Lactobacillus acidophilus* cepa Probiocap™ Rosell-52 M E, 50 INSTITUT ROSELL LALLEMAND.

Concentración del microencapsulado: 2.1×10^{10} UFC/ g microencapsulado

$$\text{Fórmula} = \frac{1.90 \times 10^{-3} \text{ g liofilizado}}{\text{g cuajada}}$$

ANEXO 5: Método 3M™ Petrifilm™ para el recuento rápido de coliformes

Descripción

La placa Petrifilm™ para el recuento de coliformes (*Coliform Count, CC*) contiene nutrientes de Bilis Rojo-Violeta (BRV), un agente gelificante soluble en agua fría (goma guar/carragenina) que se rehidrata al depositar la muestra en su superficie; y un indicador tetrazolium (2,3,5-trifeniltetrazolio TTC) que facilita la enumeración de colonias (Guía 3M, 2011).

La placa está estructurada como un sistema de doble película con medio deshidratado e indicadores impregnados en la película inferior y superior. Su estructura se muestra en el diagrama siguiente:

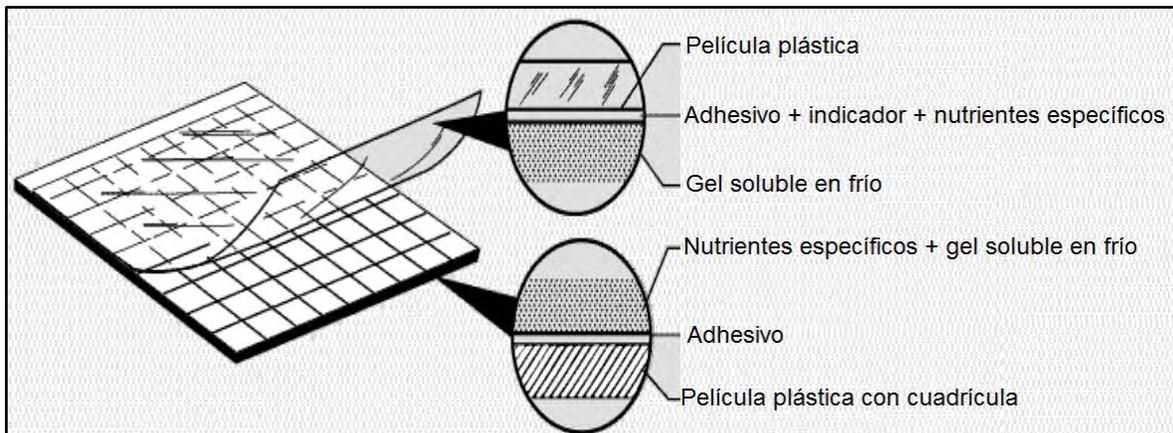


Figura A.5.1. Estructura general de las placas Petrifilm™ (Guía 3M, 2011)

Las colonias de coliformes que crecen en la Placa Petrifilm™ CC, producen un ácido que causa el oscurecimiento del gel por el indicador de pH. El gas atrapado alrededor de las colonias rojas de coliformes confirma su presencia (Guía 3M, 2011).

Metodología de aplicación

La preparación de la muestra y las diluciones primarias se realiza siguiendo el ANEXO 1.

La inoculación, se realiza siguiendo la Guía 3M para el recuento de coliformes:

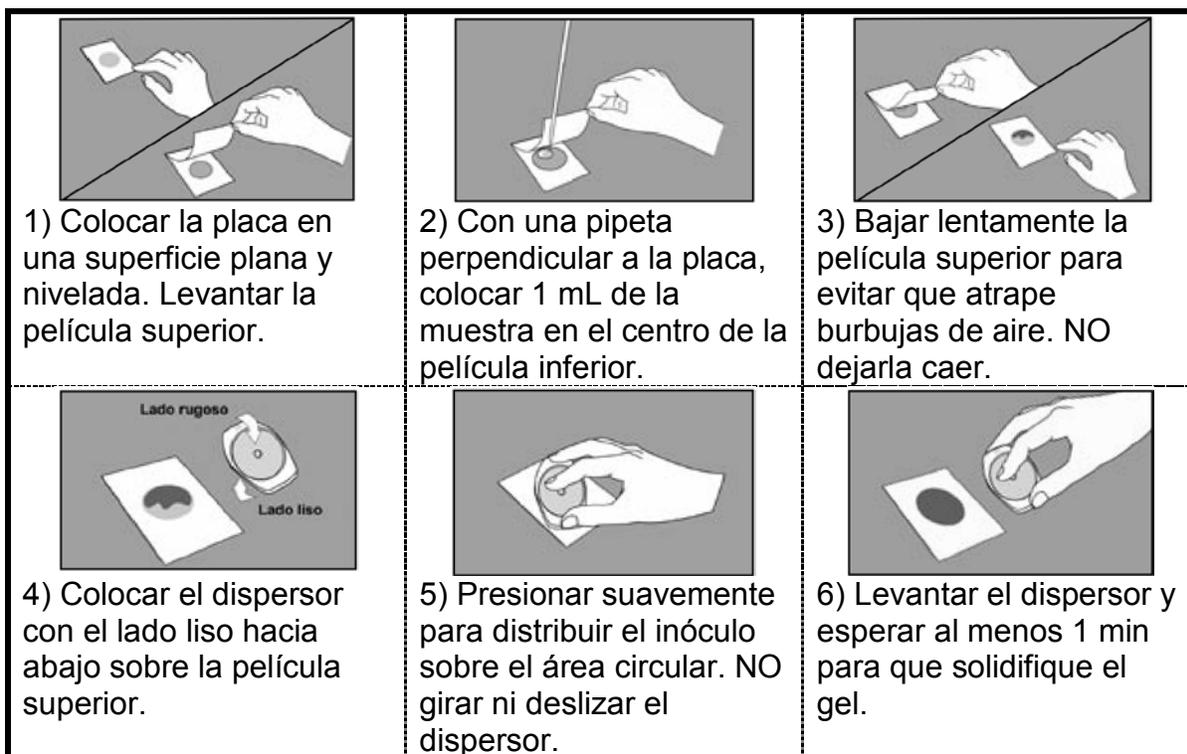


Figura A.5.2. Metodología de inoculación Placas Petrifilm™ 3M™ para el recuento de coliformes (Guía 3M, 2011).

La incubación se realiza de la siguiente forma:



Figura A.5.3. Incubación de Placas Petrifilm™ 3M™ para el recuento de coliformes (Guía 3M, 2011).

Interpretación de resultados

Se cuentan las colonias que son rojas y están rodeadas por burbujas. El rango para la población total en las Placas Petrifilm™ CC es entre 15 y 150 (Guía 3M, 2011).

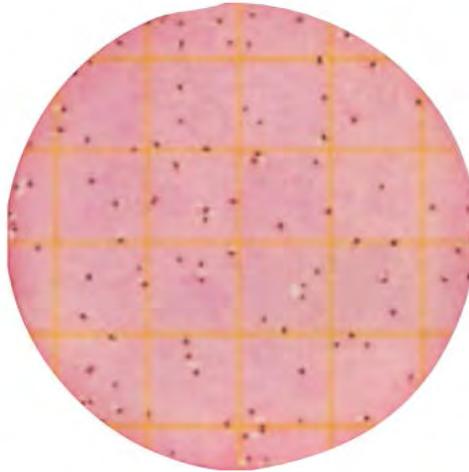


Figura A.5.4. Ejemplo de crecimiento de coliformes en Placa Petrifilm™ para el recuento de coliformes (Guía 3M, 2011).

ANEXO 6: Tinción de Gram

Desarrollada empíricamente en 1884 por el danés Christian Gram; posteriormente se determinó que la diferencia de la reacción se basa en la composición y estructura de la pared celular, que determina que unas bacterias retengan el primer colorante, en tanto que otras lo pierdan, lo que les permite reaccionar con el colorante de contraste (Ramírez *et al.*, 2008).

Preparación fija

En un portaobjetos limpio colocar una gota de agua destilada, esterilizar asa en la flama del mechero al rojo vivo, dejar enfriar y tomar ligeramente parte de una colonia del agar correspondiente. Disolver la colonia en la gota de agua y esparcir. Dejar secar al aire y fijarlo en la flama pasándolo 4 ó 5 veces sobre ella (Ramírez *et al.*, 2008).

Tinción de Gram

Cubrir la preparación fija con cristal violeta de Gram y dejarlo actuar durante 1 min, escurrir el exceso de colorante y lavar con agua destilada. Cubrir la preparación con lugol de Gram y dejarlo 1 min, escurrir el exceso y lavar con agua destilada. Decolorar agregando alcohol-acetona, mientras se sostiene ligeramente inclinada para que el decolorante resbale lentamente. Tan pronto como las gotas de esta solución ya no arrastren color, lavar con agua para detener la acción del colorante. Cubrir la preparación con safranina y dejarla por 1 min. Escurrir el exceso, lavar con agua y dejar secar al aire (Ramírez *et al.*, 2008). La preparación de las sustancias utilizadas se muestra en el Anexo 2.

ANEXO 7: Resultados completos de la evaluación de la vida de anaquel

RESULTADOS PARTE 1

Tabla A.7.1. Resultados de cuantificación de probióticos y parámetros fisicoquímicos correspondientes a la parte I

Para queso simbiótico blanco:

		<i>L.casei</i> (logUFC/g _{queso})	<i>L.acidophilus</i> (logUFC/g _{queso})	pH	Acidez (% Ácido láctico)
Día 0	Lote 1	7.2	8.0	6.59	0.03
	Lote 2	7.2	9.0	6.61	0.03
	Promedio lotes (Resultado final)	7.2	8.5	6.60	0.03
Día 3	Lote 1	7.1	7.6	6.87	0.03
	Lote 2	7.0	7.4	6.88	0.03
	Promedio lotes (Resultado final)	7.1	7.5	6.86	0.03
Día 8	Lote 1	7.0	7.4	6.87	0.03
	Lote 2	7.1	7.6	6.88	0.03
	Promedio lotes (Resultado final)	7.1	7.5	6.86	0.03
Día 12	Lote 1	6.9	7.0	6.98	0.03
	Lote 2	6.8	7.1	6.91	0.03
	Promedio lotes (Resultado final)	6.9	7.0	6.94	0.03
Día 18	Lote 1	6.7	6.6	6.85	0.03
	Lote 2	6.8	6.7	6.84	0.03
	Promedio lotes (Resultado final)	7.0	6.7	6.85	0.03
Día 21	Lote 1	6.6	6.9	6.89	0.03
	Lote 2	6.5	7.0	6.87	0.03
	Promedio lotes (Resultado final)	6.6	6.9	6.88	0.03

Tabla A.7.1. (Continuación) Resultados de cuantificación de probióticos y parámetros fisicoquímicos correspondientes a la parte I
Para queso simbiótico con chile jalapeño:

		<i>L.casei</i> (logUFC/g _{queso})	<i>L.acidophilus</i> (logUFC/g _{queso})	pH	Acidez (% Ácido láctico)
Día 0	Lote 1	8.6	9.7	5.47	0.13
	Lote 2	8.6	9.8	5.32	0.11
	Promedio lotes (Resultado final)	8.6	9.7	5.39	0.12
Día 3	Lote 1	8.7	9.1	5.41	0.11
	Lote 2	8.7	9.3	5.37	0.11
	Promedio lotes (Resultado final)	8.7	9.2	5.39	0.11
Día 8	Lote 1	8.6	9.1	5.23	0.25
	Lote 2	8.6	8.4	5.19	0.26
	Promedio lotes (Resultado final)	8.6	9.1	5.21	0.26
Día 12	Lote 1	8.8	9.5	5.29	0.28
	Lote 2	8.8	9.5	5.25	0.25
	Promedio lotes (Resultado final)	8.8	9.5	5.27	0.27
Día 18	Lote 1	8.5	9.1	4.88	0.32
	Lote 2	8.5	9.0	4.86	0.33
	Promedio lotes (Resultado final)	8.5	9.0	4.87	0.33
Día 21	Lote 1	8.7	9.1	5.02	0.35
	Lote 2	8.6	9.1	4.99	0.33
	Promedio lotes (Resultado final)	8.6	9.1	5.00	0.03

Tabla A.7.1. (Continuación) Resultados de cuantificación de probióticos y parámetros fisicoquímicos correspondientes a la parte I
Para queso simbiótico con chile chipotle:

		<i>L.casei</i> (logUFC/g _{queso})	<i>L.acidophilus</i> (logUFC/g _{queso})	pH	Acidez (% Ácido láctico)
Día 0	Lote 1	8.0	9.7	4.57	0.24
	Lote 2	8.0	9.7	5.23	0.22
	Promedio lotes (Resultado final)	8.0	9.7	4.90	0.23
Día 3	Lote 1	8.1	9.7	4.93	0.25
	Lote 2	8.2	9.8	4.92	0.23
	Promedio lotes (Resultado final)	8.1	9.8	4.93	0.24
Día 8	Lote 1	9.0	9.3	4.76	0.29
	Lote 2	9.1	9.2	4.72	0.30
	Promedio lotes (Resultado final)	9.0	9.3	4.74	0.30
Día 12	Lote 1	9.2	9.2	4.69	0.31
	Lote 2	9.2	9.4	4.67	0.32
	Promedio lotes (Resultado final)	9.2	9.3	4.68	0.31
Día 18	Lote 1	9.4	10.1	4.79	0.34
	Lote 2	9.5	10.3	4.76	0.35
	Promedio lotes (Resultado final)	9.4	10.2	4.77	0.35
Día 21	Lote 1	9.1	9.4	4.00	0.31
	Lote 2	9.2	9.4	4.92	0.31
	Promedio lotes (Resultado final)	9.2	9.4	4.46	0.31

RESULTADOS PARTE 2

Tabla A.7.2. Resultados de cuantificación de *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* liofilizado, mesofílicos aerobios y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico blanco

		<i>L.casei</i> (logUFC/g _{queso})	<i>L.acidophilus</i> (logUFC/g _{queso})	MA (logUFC/g _{queso})	pH	Acidez (%Ácido láctico)
Día 0	Lote 1	7.1	7.1	Negativo*	6.96	0.02
	Lote 2	7.1	7.1	Negativo*	6.93	0.02
	Promedio lotes	7.1	7.1	Negativo*	6.94	0.02
Día 3	Lote 1	7.0	7.1	Negativo*	6.82	0.02
	Lote 2	7.0	7.0	Negativo*	6.85	0.02
	Promedio lotes	7.0	7.0	Negativo*	6.84	0.02
Día 8	Lote 1	7.2	7.2	2.68	6.86	0.02
	Lote 2	7.2	7.0	0.70	6.82	0.02
	Promedio lotes	7.2	7.1	1.69	6.84	0.02
Día 12	Lote 1	7.1	7.1	2.70	6.90	0.03
	Lote 2	7.1	7.0	1.48	6.85	0.02
	Promedio lotes	7.1	7.0	2.09	6.87	0.03
Día 18	Lote 1	7.1	7.0	3.13	6.74	0.03
	Lote 2	7.2	7.0	3.04	6.69	0.03
	Promedio lotes	7.2	7.0	3.08	6.72	0.03
Día 21	Lote 1	7.2	7.0	3.48	6.45	0.03
	Lote 2	7.2	7.0	3.04	6.42	0.03
	Promedio lotes	7.2	7.0	3.26	6.43	0.03

*Sensibilidad del método: 10 UFC/ g queso

Tabla A.7.3. Resultados de cuantificación de *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* microencapsulado, mesofílicos aerobios y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico blanco

		<i>L.casei</i> (logUFC/g _{queso})	<i>L.acidophilus</i> (logUFC/g _{queso})	MA (logUFC/g _{queso})	pH	Acidez (%Ácido láctico)
Día 0	Lote 1	7.1	7.7	2.08	6.83	0.02
	Lote 2	6.9	7.7	1.90	6.87	0.02
	Promedio lotes	7.0	7.7	1.99	6.85	0.02
Día 3	Lote 1	6.8	7.4	1.98	6.88	0.02
	Lote 2	6.4	7.3	2.11	6.79	0.03
	Promedio lotes	6.6	7.4	2.05	6.84	0.02
Día 8	Lote 1	6.0	7.4	2.32	6.85	0.03
	Lote 2	6.9	7.4	2.36	6.72	0.02
	Promedio lotes	6.5	7.4	2.34	6.79	0.02
Día 12	Lote 1	6.1	7.3	1.90	6.75	0.03
	Lote 2	6.4	7.3	2.42	6.82	0.03
	Promedio lotes	6.3	7.3	2.16	6.78	0.03
Día 18	Lote 1	6.2	7.3	2.30	6.66	0.03
	Lote 2	6.9	7.2	2.80	6.79	0.03
	Promedio lotes	6.5	7.2	2.55	6.72	0.03
Día 21	Lote 1	6.0	7.2	2.40	6.86	0.03
	Lote 2	7.2	7.3	2.40	6.74	0.03
	Promedio lotes	6.6	7.3	2.40	6.80	0.03

Tabla A.7.4. Resultados de cuantificación de *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* liofilizado, mesofílicos aerobios y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico con chile jalapeño

		<i>L.casei</i> (logUFC/g _{queso})	<i>L.acidophilus</i> (logUFC/g _{queso})	MA (logUFC/g _{queso})	pH	Acidez (%Ácido láctico)
Día 0	Lote 1	7.0	6.7	1.40	6.72	0.02
	Lote 2	6.9	6.9	1.54	6.77	0.02
	Promedio lotes	7.0	6.8	1.47	6.75	0.02
Día 3	Lote 1	6.1	6.1	1.98	6.67	0.02
	Lote 2	6.4	6.8	2.00	6.74	0.02
	Promedio lotes	6.3	6.5	1.99	6.71	0.02
Día 8	Lote 1	6.0	6.5	2.00	6.66	0.02
	Lote 2	7.0	7.1	2.27	6.61	0.02
	Promedio lotes	6.5	6.8	2.13	6.63	0.02
Día 12	Lote 1	2.78	6.7	3.23	6.69	0.03
	Lote 2	4.76	6.6	1.65	6.67	0.02
	Promedio lotes	3.8	6.7	2.44	6.68	0.03
Día 18	Lote 1	2.0	6.8	2.43	6.45	0.03
	Lote 2	2.0	6.7	3.26	6.38	0.03
	Promedio lotes	2.0	6.7	2.85	6.42	0.03
Día 21	Lote 1	1.0	6.3	3.30	6.09	0.03
	Lote 2	3.0	6.8	3.17	6.40	0.03
	Promedio lotes	2.0	6.5	3.24	6.24	0.03

Tabla A.7.5. Resultados de cuantificación de *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* microencapsulado, mesofílicos aerobios y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico con chile jalapeño

		<i>L.casei</i> (logUFC/g _{queso})	<i>L.acidophilus</i> (logUFC/g _{queso})	MA (logUFC/g _{queso})	pH	Acidez (%Ácido láctico)
Día 0	Lote 1	6.9	7.0	1.85	6.55	0.03
	Lote 2	7.2	7.0	1.78	6.61	0.03
	Promedio lotes	7.1	7.0	1.81	6.58	0.03
Día 3	Lote 1	6.9	6.9	2.10	6.55	0.04
	Lote 2	7.1	6.9	2.13	6.55	0.03
	Promedio lotes	7.0	6.9	2.11	6.55	0.04
Día 8	Lote 1	6.7	6.7	2.61	6.49	0.03
	Lote 2	7.0	6.7	2.27	6.50	0.03
	Promedio lotes	6.9	6.7	2.44	6.50	0.03
Día 12	Lote 1	4.0	6.7	2.90	6.56	0.04
	Lote 2	4.0	6.8	2.22	6.51	0.03
	Promedio lotes	4.0	6.8	2.56	6.53	0.04
Día 18	Lote 1	3.3	6.5	2.67	6.61	0.04
	Lote 2	3.0	6.5	2.45	6.56	0.04
	Promedio lotes	3.2	6.4	2.56	6.08	0.04
Día 21	Lote 1	2.0	6.6	4.29	6.53	0.04
	Lote 2	2.0	6.5	2.59	6.47	0.04
	Promedio lotes	2.0	6.6	3.44	6.50	0.04

Tabla A.7.6. Resultados de cuantificación de *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* liofilizado, mesofílicos aerobios y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico con chile chipotle

		<i>L.casei</i> (logUFC/g _{queso})	<i>L.acidophilus</i> (logUFC/g _{queso})	MA (logUFC/g _{queso})	pH	Acidez (%Ácido láctico)
Día 0	Lote 1	7.2	6.7	1.7	6.75	0.03
	Lote 2	7.1	6.8	1.9	6.77	0.03
	Promedio lotes	7.1	6.8	1.8	6.76	0.03
Día 3	Lote 1	5.2	6.8	2.1	6.75	0.03
	Lote 2	4.0	6.6	1.7	6.74	0.03
	Promedio lotes	4.6	6.7	1.9	6.74	0.03
Día 8	Lote 1	4.6	6.9	1.8	6.64	0.03
	Lote 2	3.8	7.2	2.2	6.61	0.03
	Promedio lotes	4.2	7.0	2.0	6.62	0.03
Día 12	Lote 1	3.8	6.6	2.0	6.67	0.03
	Lote 2	2.0	6.5	2.0	6.67	0.03
	Promedio lotes	2.9	6.5	2.0	6.67	0.03
Día 18	Lote 1	2.8	6.7	2.7	6.46	0.03
	Lote 2	3.8	6.7	1.6	6.38	0.03
	Promedio lotes	3.3	6.7	2.1	6.42	0.03
Día 21	Lote 1	2.0	6.6	3.2	6.45	0.03
	Lote 2	2.0	6.6	1.9	6.40	0.03
	Promedio lotes	2.0	6.6	2.5	6.43	0.03

Tabla A.7.7. Resultados de cuantificación de *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* microencapsulado, mesofílicos aerobios y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico con chile chipotle

		<i>L.casei</i> (logUFC/g _{queso})	<i>L.acidophilus</i> (logUFC/g _{queso})	MA (logUFC/g _{queso})	pH	Acidez (%Ácido láctico)
Día 0	Lote 1	6.2	6.2	2.1	6.61	0.03
	Lote 2	6.9	6.3	1.9	6.60	0.03
	Promedio lotes	6.6	6.3	2.0	6.61	0.03
Día 3	Lote 1	7.0	6.1	2.0	6.58	0.04
	Lote 2	7.0	6.2	2.2	6.58	0.03
	Promedio lotes	7.0	6.2	2.1	6.58	0.04
Día 8	Lote 1	7.0	6.2	2.4	6.61	0.03
	Lote 2	7.1	6.1	2.5	6.58	0.03
	Promedio lotes	7.0	6.2	2.4	6.60	0.03
Día 12	Lote 1	6.8	6.1	2.3	6.61	0.04
	Lote 2	6.8	6.2	2.4	6.58	0.03
	Promedio lotes	6.8	6.2	2.4	6.60	0.04
Día 18	Lote 1	6.8	5.9	3.3	6.57	0.04
	Lote 2	6.8	6.0	2.9	6.56	0.04
	Promedio lotes	6.8	6.0	3.1	6.56	0.04
Día 21	Lote 1	6.9	5.9	3.3	6.54	0.04
	Lote 2	6.9	6.0	3.3	6.59	0.04
	Promedio lotes	6.9	6.0	3.3	6.58	0.04

Tabla A.7.8. Resultados de cuantificación de *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* liofilizado, mesofílicos aerobios y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico con epazote

		<i>L.casei</i> (logUFC/g _{queso})	<i>L.acidophilus</i> (logUFC/g _{queso})	MA (logUFC/g _{queso})	pH	Acidez (%Ácido láctico)
Día 0	Lote 1	7.4	7.4	1.3	6.81	0.02
	Lote 2	7.4	7.4	1.7	6.77	0.03
	Promedio lotes	7.4	7.4	1.5	6.79	0.03
Día 3	Lote 1	7.1	7.4	1.3	6.80	0.02
	Lote 2	6.8	7.4	2.2	6.74	0.03
	Promedio lotes	7.0	7.4	1.7	6.77	0.03
Día 8	Lote 1	6.8	7.2	1.9	6.81	0.03
	Lote 2	6.8	7.1	1.7	6.61	0.03
	Promedio lotes	6.8	7.1	1.8	6.71	0.03
Día 12	Lote 1	6.7	6.8	2.9	6.72	0.03
	Lote 2	7.2	7.2	2.5	6.67	0.03
	Promedio lotes	7.0	7.0	2.7	6.69	0.03
Día 18	Lote 1	5.4	6.3	2.7	6.56	0.03
	Lote 2	4.3	6.5	2.8	6.38	0.03
	Promedio lotes	4.9	6.4	2.8	6.47	0.03
Día 21	Lote 1	4.0	6.5	2.9	6.73	0.03
	Lote 2	4.0	6.4	3.0	6.40	0.03
	Promedio lotes	4.0	6.4	2.9	6.56	0.03

Tabla A.7.9. Resultados de cuantificación de *L.casei* liofilizado y *L.acidophilus* microencapsulado, mesofílicos aerobios y parámetros fisicoquímicos para queso simbiótico con epazote

		<i>L.casei</i> (logUFC/g _{queso})	<i>L.acidophilus</i> (logUFC/g _{queso})	MA (logUFC/g _{queso})	pH	Acidez (%Ácido láctico)
Día 0	Lote 1	7.4	6.2	2.1	6.61	0.03
	Lote 2	6.9	7.3	2.0	6.68	0.03
	Promedio lotes	7.1	6.8	2.1	6.65	0.03
Día 3	Lote 1	6.9	6.1	2.0	6.58	0.03
	Lote 2	6.9	7.0	2.3	6.72	0.03
	Promedio lotes	6.9	6.6	2.2	6.65	0.03
Día 8	Lote 1	7.0	6.2	2.2	6.61	0.03
	Lote 2	7.0	7.1	2.4	6.81	0.03
	Promedio lotes	7.0	6.7	2.4	6.71	0.03
Día 12	Lote 1	6.8	6.1	2.3	6.61	0.03
	Lote 2	6.9	6.9	2.5	6.73	0.03
	Promedio lotes	6.9	6.5	2.4	6.67	0.03
Día 18	Lote 1	6.8	5.9	3.3	6.57	0.04
	Lote 2	7.1	7.0	3.5	6.69	0.03
	Promedio lotes	7.0	6.4	3.4	6.63	0.04
Día 21	Lote 1	6.9	5.9	3.3	6.57	0.04
	Lote 2	7.1	6.9	3.8	6.72	0.03
	Promedio lotes	7.0	6.4	3.5	6.65	0.04

IX. Bibliografía

Alvídrez A., González B., Jiménez Z. 2002. Tendencias en la producción de alimentos: Alimentos Funcionales. Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición, Universidad Autónoma de Nuevo León. [En línea] (Actualizado en el año 2002). Disponible en:

http://www.respyn.uanl.mx/iii/3/ensayos/alimentos_funcionales.html

[Último acceso el 3 de abril de 2013].

Ashraf R. and Shah N. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt: A review. 2011. International Journal of Food Microbiology, 149, pp. 194-208.

Bourges H. 2011. Aspectos sobre el Chile y su papel en la alimentación de la población mexicana. Cuadernos de Nutrición, 34:6, noviembre-diciembre, pp. 204-209.

Camacho, A., Giles M., Ortega A., Palao M., Serrano B. y Velázquez O. 2011. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 3ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.

Cervantes F., Villegas A., Cesín A. y Espinoza A. 2008. Los quesos mexicanos genuinos: Patrimonio cultural que debe rescatarse. Mundi-Prensa México, Universidad Autónoma Chapingo y Universidad Autónoma del Estado de México.

Champagne C., Gardner N. 2005. Challenges in the Addition of Probiotic Cultures to Foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45, pp. 61-84.

Coeuret V., Dubernet S., Bernardeau M., Gueguen M., Vernoux J. 2003. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait*, 83, pp. 269–306.

Dave R. and Shah N. 1996. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *Bifidobacteria*. *Journal of Dairy Science*, 79, pp. 1529-1536.

De Vrese M. and Schrezenmeir J. 2008. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. *Advanced Biochemistry Engineer*, 111, pp. 1-66.

Dorantes L., Colmenero R., Hernández H., Mota L., Jaramillo E., Fernández E., Solano C. 2000. Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 57, pp. 125-128.

Escobar M., Tassell V., Martínez F., Singh M., Castaño E., Amaya S. and Miller J. 2012. Characterization of a panela cheese with added probiotics and fava bean starch. *Journal of Dairy Science*, 95, pp. 2779–2787.

Epazote, Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. [En línea] (Actualizado en el año 2009). Disponible en:

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7646>

[Último acceso el 2 de junio de 2013].

Figuroa I., Quijano G., Ramírez G. and Cruz A. 2011. Probiotics and prebiotics – perspectives and challenges. *Journal Science Food Agriculture*, 91, pp. 1341-1348.

Gomes A., Alonso B., Flávia C., Batista C., Fonseca J. and Isay S. 2009. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 20, pp. 344-354.

Gómez J. 2008. Epazote (*Chenopodium ambrosioides*). Revisión a sus características morfológicas, actividad farmacológica, y biogénesis de su principal principio activo, ascaridol. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7,1, pp. 3-9.

Granato D., Branco F., Gomes A., Fonseca J. and Shah N. 2010. Probiotic Dairy Products as Functional Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9, pp. 455-470.

Guía de interpretación 3M. Placa Petrifilm™ para el recuento de coliformes. Documento proporcionado por el proveedor (Distribuciones Biotecnológicas) de las Placas Petrifilm™. Año de compra, 2011.

Guías Prácticas de la Organización Mundial de Gastroenterología (OMGE). 2008. Probióticos y prebióticos 1. pp. 3-22.

Hill A. 2007. Cheese Families. *Food Science. Dairy Science and Technology*. [En línea] (Actualizado en el año 2007). Disponible en:
http://www.deejayssmokepit.net/CheeseDownloads_files/CheeseFamily.pdf
[Último acceso el 5 de marzo de 2013].

ICMSF. *Microorganisms in foods 1: Their significance and methods of enumeration* represents a major step in establishing a common understanding of, and developing standard methods for, important foodborne microorganisms. 1978. 2ª ed. Canadá. pp. 3-14.

Isolauri, E. 1991. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics*, 8, 1, pp. 90-97.

Kailasapathy K. 2002. Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3, pp. 39-48.

Karimi R., Sohrabvandi S. and Mortazavian A. 2012. Review Article: Sensory Characteristics of Probiotic Cheese. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, pp. 437-448.

Leuschner R. and Lelsch V. 2003. Antimicrobial effects of garlic, clove and red hot chilli on *Listeria monocytogenes* in broth model systems and soft cheese. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 54, pp. 127-133.

Madigan M., Martinko J., Parker J. 2008. *BROCK Biología de los microorganismos*. 10ª ed. Pearson Prentice Hall.

Martínez R. 2005. Probióticos en leches fermentadas. Tesis profesional. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. México D.F.

Miremedi F. and Shah N. 2012. Applications of inulin and probiotics in health and nutrition. *International Food Research Journal* 19, 4, 1337-1350.

Nighswonger B., Brashears M. and Gilliland S. 1996. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in Fermented Milk Products During Refrigerated Storage. *Journal of Dairy Science*, 79, pp. 212-219.

Norma Mexicana NMX-F-099-1970. Método de prueba para la determinación de pH en quesos procesados. Normas mexicanas. Dirección general de normas.

Norma Mexicana NMX-F-206-1986. Alimentos. Lácteos. Determinación de acidez expresada como ácido láctico en leche en polvo.

Norma Mexicana NMX-713-COFOCALEC-2005. Sistema productivo leche-alimentos-lácteos-queso y queso de sus uero-denominaciones, especificaciones y métodos de prueba.

Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. [En línea]. Disponible en:

<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/092ssa14.html>

[Último acceso el 15 de mayo de 2013].

Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. [En línea].

Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>

[Último acceso el 15 de mayo de 2013].

Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. [En línea].

Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/121ssa14.html>

[Último acceso el 5 de marzo de 2013].

Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. [En línea]. Disponible en:

www.cofepris.gob.mx/MJ/Documents/Normas/243ssa1.pdf

[Último acceso el 3 de octubre de 2012].

Oberg C., Moyes L., Domek M, Brothersen C. and McMahon D. 2011. Survival of probiotic adjunct cultures in cheese and challenges in their enumeration using selective media. Journal of Dairy Science, 94, pp. 2220-2230.

Qurat R. and Tariq M. 2013. Recent Trends and Applications of Encapsulating Materials for Probiotic Stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, pp. 231–244.

Patlán F. 2012. Elaboración y Evaluación de Quesos Frescos Funcionales. Tesis profesional Licenciatura Química de Alimentos. Facultad de Química. UNAM. México D.F.

Ramírez R., Luna B., Mejía A., Velázquez O., Tsuzuki G., Vierna L., Hernández L., Müggenburg I., Camacho A., Uruza M. 2008. Manual de Prácticas de Microbiología General. Laboratorio de Microbiología Experimental. Facultad de Química, UNAM. México. D.F.

Ravula R. and Shah P. 1998. Selective enumeration of *Lactobacillus casei* from yogurts and fermented milk drinks. *Biotechnology Techniques*, 12: 11, pp. 819–822.

Rodrigues D., Rocha T., Pereira C., Gomes A., Malcata X., Freitas C. and Shah P. 2011. The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 100-108.

Durand *et al.* 2007. Particles containing coated living microorganisms, and method for producing same. United States Patent. Institut ROSELL.

Shah P. 2000. Symposium: Probiotic bacteria. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. *Journal of Dairy Science*, 83, pp. 894-907.

Shah P. 2007. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17, pp. 1262–1277.

Shah P., Gómez A., Faria A. 2011. Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to Human Health. Nova Science Publishers, Inc. USA. pp. 4, 43, 169-175, 442-446.

Singh P., Wani A., Karim A. and Langowski C. 2012. The use of carbon dioxide in the processing and packaging of milk and dairy products: A review. International Journal of Dairy Technology, 65: 2, pp. 161-177.

Steed H., Macfarlane T. and Macfarlane S. 2008. Prebiotics, synbiotics and inflammatory bowel disease. Molecular Nutrition & Food Research, 52, pp. 898-905.

Tabasco R., Paarup T., Jøner C., Plaés C., Requena T. 2007. Selective enumeration and identification of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *Bifidobacterium lactis* in fermented milk. International Dairy Journal, 17, pp. 1107-1114.

Teubner C., Mair H. and Friedrich E. 2005. El gran libro del queso. 5ª ed. España. Editorial Everest.

Tharmaraj N. and Shah P. 2003. Selective Enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. Journal of Dairy Science, 86, pp. 2288-2296.

Tortora G., Funke B., Case C. 2007. 9ª ed. Introducción a la microbiología. Editorial Médica Panamericana.

Vasiljevic T., Shah P. 2008. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. International Dairy Journal, 18, pp. 714-728.

Vermeiren L., Devlieghere F., Van M., De Kruijf N., Debevere J. 1999. Developments in the active packaging of foods. *Trends in Food Science & Technology*, 10, pp. 77-86.

Villarruel, L. 2011. Evaluación de la viabilidad de probióticos durante la vida de anaquel de un yogurt funcional. Tesis Profesional Licenciatura Química de Alimentos. Facultad de Química. UNAM. México D.F.

Vinderola C. and Reinheimer J. 2000. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 10, pp. 271-275.

Vinderola C., Prosello W., Ghiberto D. 2000. Viability of Probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and Nonprobiotic Microflora in Argentinian Fresco Cheese. *Journal of Dairy Science*, 83, pp. 1905-1911.

Vinderola G., Prosello W., Molinari F., Ghiberto D., Reinheimer J. 2009. Growth of *Lactobacillus paracasei* A13 in Argentinian probiotic cheese and its impact on the characteristics of the product. *International Journal of Food Microbiology*, 135, pp. 171-174.

Wood B., Holzapfel W. 1995. The lactic acid bacteria. Vol. II. The genera of lactic acid bacteria. Chapman & Hall. Gran Bretaña.