

6. Materiales y Métodos

6.1 Materias primas

En esta investigación se empleo como materia prima leche de marca comercial Lala (entera) ultrapasteurizada, la cual fue adquirida en tiendas de autoservicio de la ciudad de Puebla. La leche fue utilizada para la elaboración de queso fresco. Con este propósito también se utilizo cuajo comercial (Qualact).

Además se uso el producto lácteo Yakult para el aislamiento de *Lactobacillus casei*.

La materia prima utilizada para la encapsulación de los *Lactobacillos* fue la siguiente:

Alginato de Sodio, Gelatina (Duche) y κ -carragenina (MP4134, Mc Cormick, Pesa)

6.2 Métodos

33.7.03 Humedad

Se determinó la humedad del queso fresco probiótico mediante el método 926.08 del AOAC (2000) mediante diferencia de pesos.

33.7.19 Grasa

Se determinó la grasa mediante el método 933.05 del AOAC (2000). Por medio del método de extracción con éter.

33.7.07 Cenizas

Se determinó el porcentaje de cenizas por medio del método 935.42 del AOAC (2000).

33.7.12 Proteína

Se determinó el porcentaje de proteína por medio del método 920.123 del AOAC (2000) mediante la determinación de Nitrógeno para después calcularlo como porcentaje de proteína.

6.3 Metodología

6.3.1 Efecto del potencial redox sobre la viabilidad de *L. casei*

El método para la evaluación de la viabilidad de *L. casei* al adicionar diferentes cantidades de L-cisteína fue el propuesto por Dave y Sha, (1997a) y modificado para leche pasteurizada y sin la adición de cultivos iniciadores.

Por otro lado, el método para la evaluación de la viabilidad de *L. casei* al adicionar diferentes cantidades de ácido ascórbico fue el propuesto por Dave y Shah, (1997b) y modificado para leche pasteurizada y sin la adición de cultivos iniciadores.

Se colocará un mililitro del producto comercial Yakult en 100 ml de leche y se le adicionará diferentes cantidades de L-cisteína y ácido ascórbico para lograr las concentraciones de la **Tabla 1**.

Una vez inoculados estos sistemas se colocaron en Incubadora Imperial III Lab Line a 37 °C durante 8 días y se obtuvieron las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} con solución salina isotónica.

Se utilizó un mililitro de las diluciones anteriores para la siembra por medio de vertido en placa en agar MRS por duplicado en condiciones anaeróbicas para así conocer el número total de UFC/ml.

6.3.2. Aislamiento del microorganismo

L. casei se aisló del producto lácteo comercial Yakult elaborado por la empresa Yakult Honsha Co. Para ello se agitó vigorosamente el contenido de una botella del producto lácteo Yakult para suspender el contenido microbiano. El producto lácteo se inoculó en medio MRS (De Man Rogosa Sharpe) (Merck). Una vez que fue inoculado el medio las cajas petri se incubaron de manera anaerobia usando un desecador al vacío, posteriormente se colocó en incubadora Imperial III Lab Line por 72 horas a 37°C. Para el almacenamiento de este microorganismo se mantuvo en su respectivo medio de cultivo a 4°C.

6.3.3. Técnicas de encapsulación

Microencapsulación con alginato de sodio

La técnica de encapsulación es la propuesta por Lee y Heo, (2000) en donde se inoculó un mililitro de *L. casei* en 100 ml de caldo MRS, el caldo se incubó a 37 °C durante 20 horas. Al término de las 20 horas, el caldo fue centrifugado y el precipitado obtenido fue lavado dos veces con solución salina isotónica. Posteriormente el precipitado se resuspendió en 50 ml de solución salina. Por otro lado, se mezclaron 2 g de alginato de sodio y 0.09 g citrato de sodio en 50 ml de solución salina, se vertió en 50ml de solución salina calentado a 35 °C. Se mezclaron las dos soluciones (el precipitado de *L. casei* en solución salina se incorporó a la mezcla de alginato y citrato de sodio).

Se llenó una jeringa de insulina con la mezcla, y se elaboraron las esferas por medio de goteo en una solución de CaCl_2 0.1 M.

Estas cápsulas presentaron un tamaño aproximado de 2 a 3 mm de diámetro. Esta técnica ha sido aplicada a la encapsulación de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) principalmente para observar su viabilidad en medios ácidos (Fávaro-Trindade y Grosso, 2002; Muthukumarasamy et al., 2006).

Microencapsulación con gelatina

La técnica empleada para la inmovilización de células de *L. casei* fue la propuesta por Wang (s/a). En esta, se preparó una solución de 50 ml de gelatina (20% p/v) calentando la solución levemente en un rango de temperatura de 35 a 37 °C para evitar la muerte celular. Se lavaron 100 ml de células bacterianas obtenidas de la sección 6.3.2 con dos porciones de solución salina isotónica estéril. Posteriormente se adicionaron a la solución tibia de gelatina y esta mezcla se vertió en un molde y se llevó a una temperatura de 4 °C para que se llevara a cabo la solidificación. Una vez solidificada, la gelatina se mantuvo a temperatura ambiente y se cortó en cubos de aproximadamente 3mm de lado.

Microencapsulación con κ -carragenina

La técnica usada para la elaboración de microcápsulas con κ -carragenina fue el propuesto por Kebary et al., (1998). En este método 100 ml de células bacterianas obtenidas de la sección 6.3.2, se lavaron con dos porciones de solución salina estéril al 0.85%, a 3000 rpm durante 10 min. Estas células fueron añadidas y se mezclaron con una solución de κ -carragenina al 3%. La mezcla de κ -carragenina con las células fue añadida por goteo usando una jeringa de 3 ml en 100 ml de una solución de KCl 3M para formar las microcápsulas. Estas cápsulas se separaron por medio de filtrado.

6.3.4. Elaboración de queso fresco.

Se utilizó la metodología de elaboración de queso Panela empleada en la industria Quesos Villa Nolasco, Atlixco, Pue., que se presenta en el diagrama de flujo de la Fig. 1.

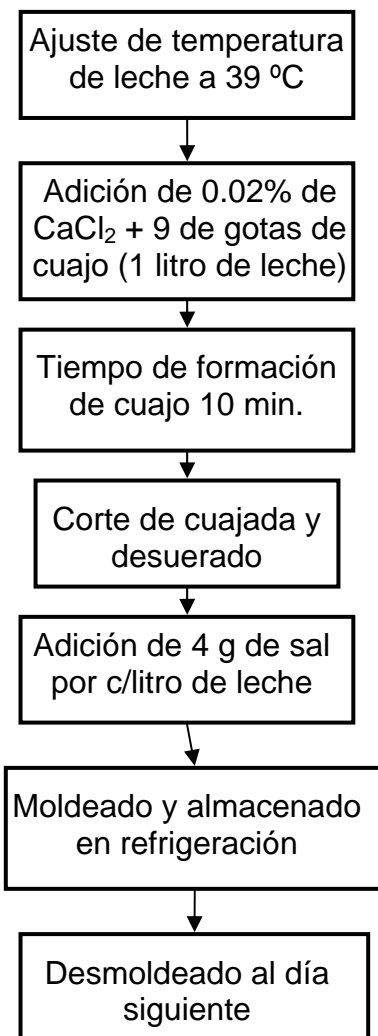


Figura 1. Diagrama de flujo de la elaboración de queso. Fuente: Sangronis y García, 2007.

Las cápsulas con los diferentes agentes gelificantes se adicionaron junto con la sal añadida. Se adicionaron 100 g de cápsulas por cada 2 litros de leche ya que de acuerdo a la determinación de *L. casei* encapsulado en los diferentes gelificantes, se comprueba que esta proporción es la adecuada.

El queso se empacó en papel encerado y se mantuvo en bolsa de plástico a temperatura de refrigeración durante dos semanas.

6.3.5. Viabilidad de microorganismos

Viabilidad de microorganismos en alginato

Se determinó la viabilidad del microorganismo en los diferentes sistemas propuestos para el queso probiótico. Se colocaron 10 gramos de queso en 90 ml de solución 1% de citrato de sodio esterilizado, con la finalidad de que las cápsulas sean disueltas y liberen al microorganismo. Posteriormente se colocó 1 ml de esta dilución en 9 ml de solución salina 0.9% esterilizada. Se obtuvieron las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} y posteriormente fueron sembradas en agar MRS para el recuento de lactobacilos, comenzando por el día de la elaboración del queso y realizando estudios de viabilidad del microorganismo cada tercer día durante dos semanas. Se sembraron las muestras por duplicado, para el conteo de lactobacilos, en cajas petri y se incubaron a 37°C en condiciones anaerobias. Se realizó el conteo total de microorganismos, para determinar las UFC/g de cada una de las diluciones.

Viabilidad de microorganismos en gelatina

Se colocaron 10 g de queso en un contenedor con 90 ml de solución salina isotónica a 37°C con agitación continua. Con esta solución se realizaron las diluciones correspondientes.

Las muestras se sembraron por duplicado para el conteo de lactobacilos en cajas petri con agar MRS incubaron en condiciones anaerobias a 37°C durante 48 horas. Se realizó el conteo total de microorganismos, para determinar las UFC/g.

Viabilidad de microorganismos en κ - carragenina

L. casei fue liberado de las cápsulas de carragenina añadiendo 10 g de queso a 90 ml de EDTA 0.05M en buffer de fosfato de sodio 0.1 M a pH 7, e incubando a 37 °C por 20 minutos antes de realizar alguna dilución en solución salina isotónica previamente esterilizada. Las diluciones fueron sembradas en cajas petri con agar MRS de manera anaerobia utilizando desecador al vacío a 37°C por 48 horas.

Se realizó el conteo total de microorganismos, para determinar las UFC/g.

6.3.6. Evaluación de la viabilidad por efecto de la encapsulación

Se evaluó la viabilidad de *L. casei* por efecto de la encapsulación realizando comparaciones de su número con respecto al tiempo.

Se elaboraron 3 lotes diferentes lotes de queso fresco cada uno conteniendo el encapsulado con los diferentes agentes gelificantes (alginato, gelatina y carragenina).

Cada cuarto día se evaluó la viabilidad de *L. casei* con los métodos previamente establecidos, durante 2 semanas, y se realizaron comparaciones de cuenta total de microorganismos encapsulados en los agentes gelificantes con respecto al tiempo.

6.3.7. Análisis microbiológico del queso probiótico

Se realizó un análisis microbiológico al queso de acuerdo a las Normas Mexicanas NOM-092-SSA1-1994, NOM-113-SSA1-1994, para determinar la incidencia de: mesófilos aerobios y coliformes totales respectivamente en 25 g. Se sembraron las diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) en agar nutritivo (BD Bioxon) para el recuento de mesófilos aerobios y en agar bilis y rojo violeta (BD Bioxon) para el recuento de coliformes totales, las siembras se hicieron por duplicado. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 24 horas. El conteo se realizó al finalizar el periodo de incubación.

La determinación de *Salmonella* se basó en la NOM-114-SSA1-1994, usando agar *Salmonella-Shigella* (SS). Se realizó el conteo de este microorganismo en 25 g de muestra.

La determinación de *Listeria monocytogenes* se basó en la NOM-143-SSA1-1994, usando medio Oxford. Se realizó el conteo en 25 g de muestra sembrándola por medio de vertido en placa.

La determinación de *Staphylococcus aureus* se basó en la NOM-115-SSA1-1994, usando medio Baird-Parker con yema de huevo y tiosulfito. Se realizó el conteo en 10 g de muestra sembrándola con extensión en placa de 0.1 ml de cada dilución.

Para la determinación de hongos y levaduras se sembró de acuerdo a la NOM-111-SSA1-1994, en agar papa dextrosa (PDA de Merck), en placas por duplicado y se incubaron a 25°C durante 72 a 96 horas. El conteo se realizó al finalizar el periodo de incubación.

6.3.8. Evaluación sensorial

Se evaluó el sistema que presento mayor viabilidad de *L. casei* a lo largo del estudio. Se evaluaron los efectos en los atributos sensoriales utilizando una escala hedónica de cinco puntos. Los atributos que se evaluaron fueron textura, sabor, color, olor y aceptabilidad general.

Esta evaluación que se realizó fue con la participación de 20 jueces no entrenados, utilizando una escala hedónica de 9 puntos; ésta indico el nivel de agrado del producto.

Esta evaluación fue importante debido a que con los resultados obtenidos fue posible observar el grado de aceptabilidad que tendrá el producto en el mercado y el impacto sobre el consumidor (Bauza, 2006).

6.3.9. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de la evaluación del efecto del potencial redox se evaluaron por medio de un análisis de superficie de respuesta por medio del programa Minitab versión 15.

Los datos obtenidos en los siguientes puntos se evaluaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías y con la comparación de medias por prueba de Turkey con un nivel de significancia del 95% por medio del programa Minitab versión 15.