



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias Agropecuarias

Centro de Investigación en Ciencia y
Tecnología de los Alimentos

*“EFECTO DE PROCESOS TÉRMICOS EN LA VIABILIDAD
DE BACTERIAS PROBIÓTICAS
ENCAPSULADAS APLICADAS EN QUESO”*

TESIS

Que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIA DE
LOS ALIMENTOS**

PRESENTA:

Ana Guadalupe Estrada Fernández

Dirección: Dra. Diana Jaqueline Pimentel González

Asesores: Dra. Aurora Quintero Lira

Dra. María Eva Rodríguez Huevo

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Tulancingo, Hgo. Noviembre del 2012



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Agropecuarias

COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos
Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: **“Efecto de procesos térmicos en la viabilidad de bacterias probióticas encapsuladas aplicadas en queso”**, que desarrolla la estudiante I.A. Ana Guadalupe Estrada Fernández.

Asistentes:

Dra. Diana Jaqueline Pimentel González.

Dra. Aurora Quintero Lira.

Dr. Rafael Germán Campos Montiel.

A. Revisión de Trabajo de Tesis.

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicando a la I.A. Ana Guadalupe Estrada Fernández, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos.

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que la estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 23 de octubre del 2012.

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Dra. Aurora Quintero Lira.

Dra. Diana Jaqueline Pimentel González.



Agradecimientos

Al apoyo a CONACyT con la beca de Maestría en Ciencia de los Alimentos de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT.

A la Dra. Diana Jaqueline Pimentel González, por su apoyo, confianza y su gran amistad, por guiarme en estas experiencias con sus sabios y bien atinados consejos que sirven para crear un gran ejemplo de enseñanza en mi vida y por ser un ejemplo de entrega y dedicación, te quiero mucho.

A mis asesores por indicarme cuando no estaba en lo correcto, por sus consejos y compartir conmigo sus experiencias

A mis compañero y amigos de la maestría, que nunca dejamos caernos unos a otros. Gracias por esos momentos de alegrías compartidos en estos dos grandiosos años. Ya los extraño mucho.

A las personas más importantes de mi vida, mi familia (July, Clara y Karol), por soportar cada minuto en que me encontraba al máximo de trabajo, poder comprenderme y aún así hacerme formar parte de esta hermosa familia. Les dedico este esfuerzo más en la vida.

A Rodolfo por compartir conmigo esta etapa más de la vida lleno de incertidumbres, desvelos, alegrías y porque no una que otra decepción, Gracias!!!!.

Y a Dios por permitirme terminar esta etapa de mi vida y por darme la oportunidad de conocer a grandes personas y amigos que son parte importante en mi vida

.

Índice	Pág.
Resumen.....	I
1. Introducción	1
2. Marco teórico	4
2.1. Alimentos funcionales.....	4
2.2. Microorganismos probióticos	5
2.2.1. Bacterias en el tracto gastrointestinal humano	5
2.2.2. Bacterias lácticas.....	7
2.2.3. Efecto probiótico de las bacterias lácticas.....	8
2.3. Termotolerancia	12
2.3.1. Mecanismos responsables de la termotolerancia.....	12
2.4. <i>Lactobacillus plantarum</i>	13
2.5. Microencapsulación	15
2.5.1. Definición	15
2.5.2. Métodos generales para microencapsular	16
2.5.3. Técnica de emulsión	17
2.5.4. Emulsiones múltiples.....	19
2.5.5. Constituyentes de una emulsión	20
2.5.6. Mecanismos generales de inestabilidad de las emulsiones	23
2.5.7. Inestabilidad de emulsiones múltiples	24
2.6. Estabilizantes y emulsificantes.....	26
2.6.1. Surfactantes	23
2.7. Biopolímeros (Estabilizantes).....	28
2.8. Aguamiel	32
2.9. Queso.....	33
2.9.1. Clasificación de quesos.....	34
2.9.2. Elaboración de queso.....	36
2.10. Queso de pasta hilada	36
2.10.1. Queso Oaxaca	37

3. Antecedentes	41
4. Objetivo	44
4.1. Objetivos particulares.....	44
5. Hipótesis	45
6. Justificación	46
7. Metodología	47
7.1. Establecimiento del experimento	47
7.2. Localización del área de estudio	47
7.3. Aguamiel	48
7.4. Activación y cinética de crecimiento de <i>L. plantarum</i>	48
7.5. Primera etapa.....	49
7.5.1. Establecimiento de la formulación y el material de pared para obtener cápsulas estables en el tiempo con control de pH.....	49
7.5.2. Análisis de tamaño de partícula de las emulsiones dobles W ₁ /O/W ₂	51
7.6. Segunda etapa	54
7.6.1. Simulación de condiciones de procesamiento térmico para evaluar la estabilidad de la emulsión, así como la sobrevivencia de las bacterias encapsulados	54
7.7. Tercera etapa: Aplicación de la emulsión con probiótico en queso Oaxaca	54
7.7.1. Viabilidad de <i>L. plantarum</i> encapsulado en el proceso de elaboración del queso Oaxaca	56
7.7.2. Viabilidad de <i>L. plantarum</i> encapsulado en pruebas de fundido en queso Oaxaca.	57
7.7.3. Determinación de tolerancia de <i>L. plantarum</i> en acidez y sales biliares en emulsiones entapadas en el queso Oaxaca, después del proceso de fundido	57
7.7.4. Análisis fisicoquímicos	58
7.7.4.1. Determinación de pH.....	58

7.7.4.2. Determinación de materia grasa por el método de Gerber	58
7.7.4.3. Determinación de proteína	59
7.7.4.4. Determinación de humedad	60
7.7.4.5. Determinación de cenizas	60
7.8. Análisis de textura	61
7.9. Determinación de microestructura del queso Oaxaca.....	62
7.10. Análisis experimental	63
8. Resultados y discusiones	65
8.1. Cinética de crecimiento de <i>L. plantarum</i>	65
8.2. Establecimiento de la formulación y el material de pared para obtener cápsulas estables en el tiempo con control de pH.....	67
8.3. Simulación de condiciones de procesamiento térmico para evaluar la estabilidad de la emulsión, así como la sobrevivencia de las bacterias encapsuladas	77
8.4. Aplicación de la emulsión múltiple con probiótico en queso Oaxaca.....	80
8.4.1. Viabilidad de <i>L. plantarum</i> encapsulado en el proceso de elaboración del queso Oaxaca	80
8.4.2. Viabilidad de <i>L. plantarum</i> encapsulado en pruebas de fundido en queso Oaxaca	84
8.4.3. Determinación de tolerancia de <i>L. plantarum</i> en acidez y sales biliares en emulsiones atrapadas en el queso Oaxaca, después del proceso de fundido	86
8.4.4. Análisis fisicoquímicos	88
8.4.5. Microestructura y textura del queso Oaxaca	92
9. Conclusiones	99
10. Referencias	100
11. Anexos.....	110

Índice de cuadros	Pág.
Cuadro 2.1. Especies comúnmente utilizadas como probióticos.....	10
Cuadro 2.2. Posibles mecanismos de acción de probióticos.....	11
Cuadro 2.3. Productos alimentarios que contienen <i>L. plantarum</i>	14
Cuadro 2.4. Componentes típicos encontrados en emulsiones	21
Cuadro 2.5. Tipos de material de pared utilizados en microencapsulación.....	29
Cuadro 2.6. Clasificación de los quesos por tipo de pasta.....	34
Cuadro 2.7. Clasificación de los quesos según la consistencia de la pasta.....	35
Cuadro 2.8. Clasificación según el grado de maduración de la pasta.....	35
Cuadro 2.9. Composición química del queso Oaxaca.....	38
Cuadro 3.1. Ejemplos de probióticos encapsulados y su aplicación en quesos.....	41
Cuadro 7.1. Formulación de emulsión con diferentes fases acuosas internas y externas	50
Cuadro 7.2. Valores de los rangos de la relación $D_{3,2}/D_{4,3}$ que indican el tipo de estabilidad en una emulsión	53
Cuadro 8.1. Parámetros estimados y coeficientes de determinación de crecimiento de <i>L. plantarum</i> según el modelo de Gompertz.....	66
Cuadro 8.2. Formulación de emulsiones con diferentes fases acuosas internas y externas	67
Cuadro 8.3. Cinética de coalescencia de los glóbulos de la emulsión múltiple formada con biopolímeros.....	76
Cuadro 8.4. Composición fisicoquímica de los tratamientos de queso Oaxaca en un periodo de almacenamiento de 15 días	90

Índice de figuras	Pág.
Figura 2.1. Esquema del aparato digestivo humano, concentraciones de bacterias en cada región del estomago.....	5
Figura 2.2. Los grupos de microorganismos más importantes, sus cantidades y división aproximada según su potencial de efectos dañinos y benéficos	7
Figura 2.3. Métodos de encapsulación de probióticos: tamaño del rango previsto para cada método	17
Figura 2.4. Representación esquemática de emulsiones sencillas	18
Figura 2.5. Representación esquemática de una emulsión múltiple	20
Figura 2.6. Regiones que forman una emulsión.....	21
Figura 2.7. Las emulsiones pueden ser inestables debido a varios mecanismos físicos, incluyendo el cremado, sedimentación, floculación, coalescencia y fase de inversión.	24
Figura 2.8. Representación esquemática de los principales mecanismos de rompimiento de una emulsión doble: (A) coalescencia de las gotas exteriores, (B) coalescencia de las gotas interiores, (C) coalescencia de las gotas internas/externas y (D) contracción o hinchamiento de las gotas interiores	25
Figura 2.9. Representación de un surfactante	26
Figura 2.10. Representación de una micela.....	27
Figura 2.11. Proceso de elaboración del queso Oaxaca.....	39
Figura 2.12. Principales fases durante la texturización de una cuajada par aun queso de pasta hilada.....	40
Figura 7.1. Diagrama del proceso de elaboración del queso Oaxaca	55
Figura 7.2. Fotografía del queso Oaxaca, producto terminado	56
Figura 7.3. Prueba de extensibilidad en queso Oaxaca (Testigo, <i>L. plantarum</i> libre, control y <i>L. plantarum</i> encapsulado en emulsión múltiple (Texture Analyser, TA-XT2i; A/TG).....	62
Figura 8.1. Cinética de crecimiento de <i>L. plantarum</i>	66

- Figura 8.2. Fotografías de gotas de emulsiones dobles agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$): (a) emulsión $W_{Ag}/O/W_{GM20\%}$, (b) emulsión $W_{Ag+SdL}/O/W_{GM20\%}$, (c) emulsión $W_{SdL7\%}/O/W_{GM20\%}$, (d) emulsión $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$, (e) emulsión $W_{Ag+SdL}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$ y (f) emulsión $W_{SdL7\%}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$, todas tomadas al día 1 68
- Figura 8.3. Cambio de diámetro medio de las emulsiones primarias: (\blacklozenge), $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$; (\blacksquare), $W_{Ag}/O/W_{GM20\%}$; (\blacktriangle), $W_{Ag+SdL}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$; (\times), $W_{Ag+SdL}/O/W_{GM20\%}$; (\ast), $W_{SdL}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$ y (\bullet), $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$ 69
- Figura 8.4. Cambio de diámetro medio de las emulsiones múltiples: (\blacklozenge), $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$; (\blacksquare), $W_{Ag}/O/W_{GM20\%}$; (\blacktriangle), $W_{Ag+SdL}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$; (\times), $W_{Ag+SdL}/O/W_{GM20\%}$; (\ast), $W_{SdL}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$ y (\bullet), $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$ 71
- Figura 8.5. Resultados de la relación $[(D_{1,0})_{primaria} / (D_{1,0})_{múltiple}]$, para las seis formulaciones realizadas. Donde: (\blacklozenge), $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$; (\blacksquare), $W_{Ag}/O/W_{GM20\%}$; (\blacktriangle), $W_{Ag+SdL}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$; (\times), $W_{Ag+SdL}/O/W_{GM20\%}$; (\ast), $W_{SdL}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$ y (\bullet), $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$ 75
- Figura 8.6. Sobrevivencia de *L. plantarum* a 75 °C durante 10, 15 y 20 min de exposición..... 78
- Figura 8.7. Viabilidad de *L. plantarum* a través del proceso de elaboración del queso Oaxaca, en cuajada, malaxado y queso final..... 81
- Figura 8.8. Efecto del tiempo de fundido en queso Oaxaca a 73 °C por 3 min. . 85
- Figura 8.9. Sobrevivencia de *L. plantarum* en acidez pH 2.3 (Izquierda) y en sales biliares (derecha), encapsulada en una emulsión doble $W_{Ag}/O/W_{GA17+GM66+MD17}$ y libre, aplicados en queso Oaxaca y después de ser sometido el queso a un proceso de fundido..... 87
- Figura 8.10. Efecto de la adicción de *L. plantarum* encapsulado en una emulsión múltiple..... 93

- Figura 8.11. Micrografía electrónica de barrido del queso Oaxaca testigo (elaborado tradicionalmente), en la que puede apreciarse la formación de una red tridimensional de las caseínas alineadas a lo largo de la dirección de estiramiento que sufrió el queso Oaxaca en el proceso de malaxado (P); la presencia de un glóbulo graso de grasa láctea (O) embebido en la red de proteína: a) Magnificación 500 x, barra de escala = 50 μm y b) 3 000 x, barra de escala = 5 μm 95
- Figura 8.12. Micrografía electrónica de barrido del queso Oaxaca con *L. plantarum* libre, en la que puede apreciarse la formación de una red tridimensional de las caseínas de longitud corta y desordenada (P); la presencia de un glóbulo graso de grasa láctea (O) embebido en la red de proteína, y la presencia de *L. plantarum* (LP): a) Magnificación 500 x, barra de escala = 50 μm y b) 3 000 x, barra de escala = 5 μm 96
- Figura 8.13. Micrografía electrónica de barrido del queso Oaxaca control (elaborado con la emulsión múltiple pero sin *L. plantarum*), en la que puede apreciarse la formación de una red tridimensional de las caseínas (P); la presencia de un glóbulo graso de grasa láctea (O) y la emulsión múltiple (W_1/WO_2) embebidos en la red de proteína: a) Magnificación 500 x, barra de escala = 50 μm , b) y c) 3 000 x, barra de escala = 5 μm 98
- Figura 8.14. Micrografía electrónica de barrido del queso Oaxaca elaborado con la emulsión múltiple con *L. plantarum* encapsulado, en la que puede apreciarse la formación de una red tridimensional de las caseínas (P); la presencia de un glóbulo graso de grasa láctea (O) y la emulsión múltiple (W_1/WO_2) embebidos en la red de proteína: a) Magnificación 500 x, barra de escala = 50 μm , b) y c) 3 000 x, barra de escala = 5 μm y d) 13 000 x, barra de escala= 1 μm 98

Resumen

Los probióticos deben estar viables en el alimento para garantizar su potencial efectivo en el huésped. En México, el queso Oaxaca es ampliamente consumido. Su aplicación se ve limitada en este tipo de quesos por la presencia de temperaturas elevadas durante su elaboración y en el consumo debido a que se consume fundido. En este trabajo, se realizó la protección de *L. plantarum* en una emulsión múltiple agua-aceite-agua ($W_1/O/W_2$) contra la exposición al calor. La $W_1/O/W_2$ se realizó por el método de las dos etapas, usando para la fase acuosa interna, aguamiel de *Agave* sp., como fase oleosa, aceite de canola y tensoactivos de bajo peso molecular; y en la fase acuosa externa, una mezcla de Goma de mezquite 66%, Maltodextrina 17 % y Goma Arábica 17 %. Se monitoreó la viabilidad del probiótico encapsulado en puntos críticos de la elaboración del queso (cuajada, 9.11 ± 0.45 Log UFC/g; malaxado 8.35 ± 0.74 Log UFC/g; y queso terminado 8.15 ± 0.17 Log UFC/g para el probiótico encapsulado) comparando con un queso con bacterias sin encapsular (obteniendo concentraciones de 7.89 ± 0.60 , 7.21 ± 0.52 , 6.80 ± 0.08 LogUFC/g respectivamente). El queso con el probiótico encapsulado en $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$ fundido a 73 °C mostró una concentración significativamente más alta (7.06 ± 0.078 Log UFC/g) con respecto al queso con el probiótico sin encapsular (5.72 ± 0.078 LogUFC/g). El queso con *L. plantarum* encapsulado en la emulsión $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$ resistió las pruebas de condiciones gastrointestinales simuladas, teniendo una concentración final a un pH ácido de 6.14 ± 0.15 Log UFC/g y en sales biliares de 6.10 ± 0.108 Log UFC/g. Comparando con *L. plantarum* libre (3.60 ± 0.43 Log UFC/g y 3.36 ± 0.44 Log UFC/g, respectivamente), hubo efecto significativo con respecto al encapsulado, obteniendo para éste la concentración menor en todas las pruebas realizadas. La adición de la emulsión múltiple en el queso Oaxaca no afectó las características fisicoquímicas del queso y la concentración final que se obtuvo, aún, después del proceso de malaxado en la elaboración del queso fue la adecuada para considerarlo como un alimento probiótico (8.15 ± 0.17 Log UFC/g). Las emulsiones $W_1/O/W_2$ son un método eficaz para proteger a los probióticos

contra el calor en el proceso de elaboración del queso Oaxaca y en el fundido asegurando concentraciones suficientes para su actividad en el organismo.

1. Introducción.

La demanda del mercado nacional e internacional ha impulsado en los últimos años una nueva línea de alimentos funcionales probióticos, productos alimenticios que, además de su valor nutritivo intrínseco, ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo del huésped (Taranto y col., 2005). Además estos alimentos deben ser aptos para la vida común previendo conveniencia en su uso, buen sabor y un precio aceptable (Chandan, 1999).

Los alimentos probióticos han sido definidos de distintas maneras, dependiendo de sus efectos en la salud y el buen funcionamiento en el humano (Anal y Singh, 2006). Una definición sería “la preparación de un producto que contiene microorganismos viables, los cuales afectan la microflora (por implantación o colonización), en el comportamiento del huésped y tiene efectos benéficos sobre la salud del huésped (Teitelbaum y col., 2002). El uso de probióticos estimula el crecimiento de microorganismos deseables, desplaza potencialmente a las bacterias dañinas y refuerzan los mecanismos de defensa natural del cuerpo (Anal y Singh, 2006). El mecanismo de este efecto antipatógeno puede ser por la disminución del pH luminal, por la producción de ácidos grasos de cadena corta; como son ácido acético, ácido láctico o ácido propiónico, producción de nutrientes vitales no disponibles para patógenos, alteración del potencial redox del medio ambiente, producción de peróxido de hidrógeno y producción de bacteriocinas o algunas otras sustancias inhibitorias (Anal y Singh, 2006).

Las bacterias ácido lácticas son los probióticos más importantes típicamente asociados con el tracto gastrointestinal humano. Estas son bacterias Gram positivas, con forma de bacilos, no forman esporas, catalasa negativa, son anaerobios, pero son aerotolerantes, ácido tolerante y estrictamente fermentativo; ácido láctico es el producto mayor de la fermentación de la lactosa (Anal y Singh, 2006). Entre las bacterias probióticas, existen el género *Lactobacillus* y

Bifidobacterium las cuales se encuentran en el intestino delgado y el colon respectivamente, atraen la atención por sus habilidades para regular la función del intestino, ejercen efectos positivos en el sistema inmune (Shima y col., 2006).

La habilidad de los microorganismos probióticos para sobrevivir y multiplicarse en el huésped influye fuertemente en los beneficios del probiótico. La bacteria puede ser metabólicamente estable y activa en el producto, sobrevivir al paso por el tracto digestivo superior en gran número y tener efectos beneficiosos estando en el intestino del huésped. El estándar para la venta de algunos alimentos con propiedades saludables con la adición de probióticos, deben contener por gramo al menos $10^6 - 10^7$ CFU/g de bacterias probióticas viables. Desafortunadamente, este nivel recomendado de bacterias probióticas no es siempre obtenido en productos comerciales. En productos lácteos, las bacterias probióticas, las cuales son generalmente de la flora nativa, crecen lentamente en la leche y a menudo muestran una baja viabilidad durante la etapa de refrigeración. Su habilidad es afectada por el pH así como la presencia de ácido láctico, peróxido de hidrógeno y oxígeno disuelto (Lucas y col., 2003). Por lo tanto la sobrevivencia, es esencial para organismos dirigidos a poblar el intestino humano, uno de los tejidos más importantes en la provisión de beneficios de salud por la bacteria probiótica (Anal y Singh, 2006).

Como se menciona anteriormente, por los beneficios saludables percibidos, los probióticos han sido incorporados en un gran número de productos alimenticios. La microencapsulación es un proceso por el cual un material o mezcla de materiales es atrapada dentro de otro material o sistema, previendo protección y/o controlando la liberación del ingrediente atrapado (Rodríguez-Huezo y col., 2004). Esta tecnología es designada para proteger a la bacteria probiótica de las condiciones adversas del medio ambiente durante el procesamiento, en productos durante el almacenamiento, y durante el paso a través del tracto gastrointestinal (Crittenden y col., 2001).

Para preparar las microcápsulas hay numerosas técnicas, y se ha sugerido que podrían identificarse más de 200 métodos en la literatura de patentes. Una emulsión múltiple es una técnica de encapsulación, donde los

microorganismos quedan encapsulados en la fase acuosa interna de la emulsión doble agua–aceite–agua ($W_1/O/W_2$). Ésta consiste de pequeñas gotas de agua dispersas en gotas de aceite, las cuales a su vez están dispersas en una fase acuosa externa (Shima y col., 2006). Las emulsiones múltiples ($W_1/O/W_2$) tienen aplicación en la formulación de productos bajos en grasa, y como vehículo para la encapsulación y liberación de nutrientes o microorganismos durante la digestión (Taranto, 2005).

El queso es el vehículo que se va utilizar para agregar la bacteria probiótica, el cual es definido de acuerdo a Villegas (2004), como un producto resultante de la coagulación de la leche de ciertos mamíferos mediante la acción de la renina (presente en el cuajo) o enzimas similares, en presencia de ácido láctico producido por microorganismos agregados o propios de la leche, del cual se elimina una parte de la humedad por el corte de la cuajada, calentamiento y/o prensado, el cual es sometido a un moldeado, prensado, afinado y su conservación en condiciones convenientes. El queso Oaxaca, es uno de los quesos de mayor consumo en México. Es un queso mexicano que podría ser clasificado en la familia de los quesos de pasta hilada. En México el queso Oaxaca pertenece al grupo de los quesos frescos que se caracterizan por tener un alto contenido de humedad, sabor suave y no tener corteza. Su vida de anaquel va de los 15 a 20 días dependiendo de las condiciones de almacenamiento que se le den. La presentación del queso es en correas, “trenzas”, con la formación de bolas enrolladas (Villegas, 2009). Este queso Oaxaca, con este nombre, sólo se conoce en ciertas zonas de México, se fabrica en todo el país, y se le conoce también con los nombres de quesillo, queso de hebra y queso asadero (Franco, 2005). La cualidad del queso Oaxaca es que debe fundir (gratinar), ya que por esta característica que presenta es de gran apreciación en la elaboración y/o como acompañamiento en la elaboración de platillos típicos mexicanos (Scott, 1991).

2. Marco teórico.

2.1. Alimentos funcionales.

La demanda del mercado nacional e internacional ha impulsado en los últimos años una nueva línea de alimentos funcionales probióticos, productos alimenticios que, además de su valor nutritivo intrínseco, ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo del huésped. El concepto de alimentos funcionales tiene su origen de acuerdo a la comprensión de las bases moleculares de la relación existente entre alimentación, salud y la disponibilidad de contar con los reguladores biológicos (donde las bacterias lácticas juegan un papel protagónico) que disminuyan el riesgo de contraer enfermedades. Se definen también como alimentos funcionales probióticos a los “alimentos susceptibles de producir un efecto sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, de mejorar el estado de salud y de bienestar y/o de reducir el riesgo de una enfermedad (Taranto y col., 2005).

La adición de bacterias probióticas para la elaboración de alimentos funcionales depende por un lado, del sinergismo que debe establecerse entre estos cultivos y los iniciadores de la fermentación. Cabe mencionar que uno de los requisitos principales de este tipo de alimento funcional es que el microorganismos probióticos permanezcan viables y activos en el alimento y durante el paso gastrointestinal para garantizar así su potencial efectivo en el huésped (Taranto y col., 2005).

2.2. Microorganismos probióticos.

2.2.1. Bacterias en el tracto gastrointestinal humano.

Las concentraciones de bacterias en diferentes partes del tracto intestinal varían en gran manera como puede observarse en la figura 2.1. La membrana mucosa de la boca y las superficies de los dientes tienen una alta concentración de bacterias que pasan con la saliva y la comida masticada al esófago y después al estómago, donde la comida se mezcla con los jugos gástricos y se fluidifican. La acidez del jugo gástrico destruye eficazmente la mayoría de las bacterias que entran en contacto con él. La comida permanece en el estómago alrededor de cuatro horas y se va liberando gradualmente hacia el intestino delgado.

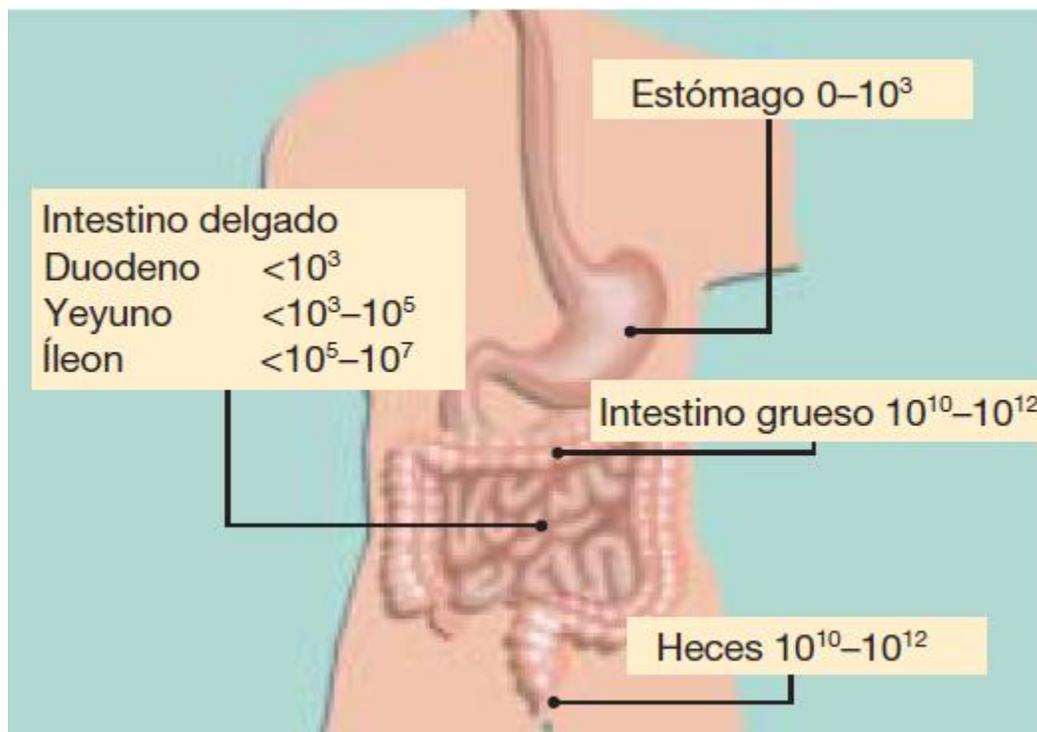


Figura 2.1. Esquema del aparato digestivo humano, concentraciones de bacterias en cada región del estómago.

La parte proximal del intestino delgado también es ácida debido a los ácidos que entran desde el estómago. Además, los ácidos de la bilis segregados en la parte proximal del intestino delgado destruyen las bacterias, por lo tanto el nivel de bacterias es relativamente bajo. Según decrece la acidez y se disuelven los ácidos de la bilis, el nivel de bacterias en la parte terminal del intestino delgado aumenta.

La gran área de superficie del intestino delgado permite una eficaz descomposición de los alimentos y la consiguiente absorción de los nutrientes a través de la membrana mucosa por la corriente sanguínea. El tracto digestivo empuja la comida y contenido intestinal hacia delante mediante potentes contracciones peristálticas. Moviéndose desde el intestino delgado al intestino grueso, disminuyendo los movimientos peristálticos. Como resultado, los contenidos del intestino se hacen más sólidos. Al mismo tiempo el nivel de bacterias también aumenta de manera muy cargada. Las bacterias descomponen los nutrientes que aún permanecen en la comida, como las proteínas parcialmente digeridas y los componentes fibrosos. Alrededor de la mitad de la mayoría de heces consisten de masa bacteriana (Capela y col., 2005)

El intestino grueso contiene alrededor de 400 diferentes especies microbianas. Los microorganismos nativos, que dominan la microflora en el colon, limitan la habilidad de géneros patógenos incluyendo *Escherichia*, *Clostridium*, *Salmonella* y *Campylobacter* que atacan el lumen (Capela y col., 2005).

La figura 2.2 presenta los géneros o grupos de bacterias más comunes y su principal influencia en el metabolismo bacteriano del intestino.

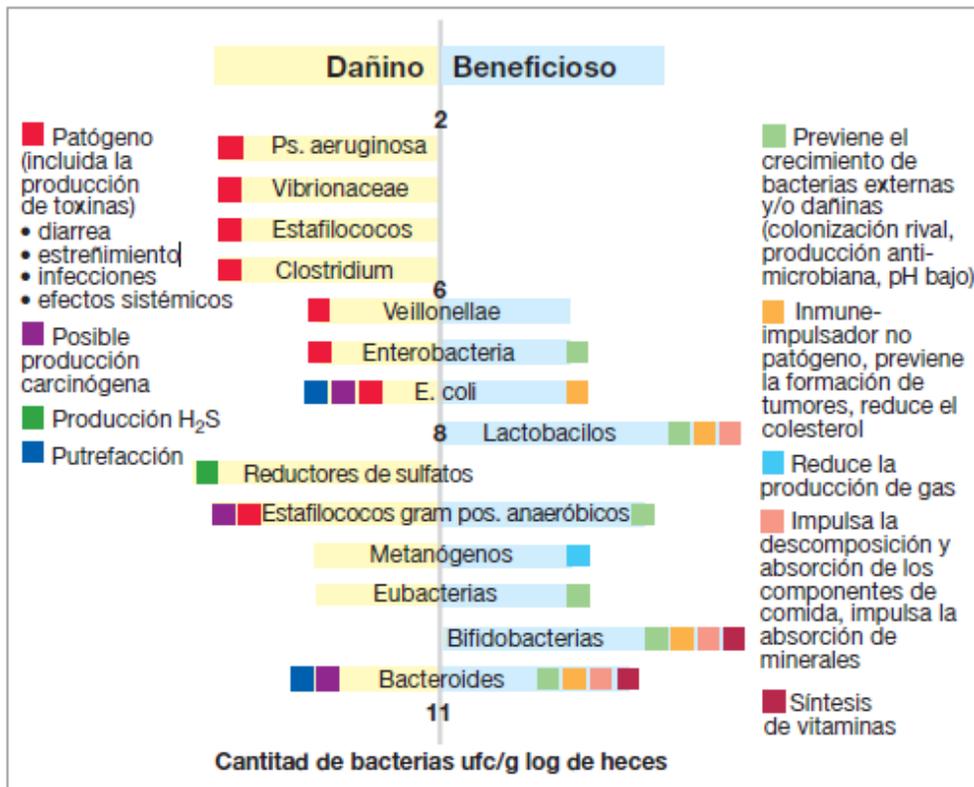


Figura 2.2. Los grupos de microorganismos más importantes, sus cantidades y división aproximada según su potencial de efectos dañinos y benéficos (Capela y col., 2005).

2.2.2. Bacterias lácticas.

Las bacterias lácticas emplean azúcares como glucosa y lactosa para producir ácido láctico mediante fermentación (Pacheco, 2007). Todas las bacterias ácido-lácticas (BAL) son bacterias Gram positivas y no forman esporas, son en forma de cocoides o bacilares inmóviles. En preparaciones para el microscopio aparecen aisladas o formando cadenas de cocos o de bacilos (Anal y Singh, 2006).

Una característica fisiológica distintiva de las bacterias ácido lácticas es su elevada tolerancia a los ácidos, misma que les permite eliminar la competencia

de la mayoría de las otras bacterias en ambientes que son ricos en nutrientes; su resistencia a la acidez les permite seguir creciendo durante las fermentaciones lácticas naturales, aún cuando el pH ha descendido a valores inferiores a cinco (Pacheco, 2007).

Los géneros más representativos de las bacterias lácticas son *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* y *Leuconostoc*. Los *Lactobacillus* son típicamente bacilares, pueden encontrarse bacilos largos y delgados, así como cortos y curvados, tienen dimensiones de 0.5 a 1.2 μm de ancho y 1 a 10 μm de largo. Corresponden a especies que son homofermentativas (producen solo ácido láctico durante la fermentación del azúcar Lactosa) en su mayor parte, aunque también existen algunas especies que son heterofermentativas (producen ácido láctico, etanol y dióxido de carbono, además del ácido láctico) (Pacheco, 2007). Los *Lactobacillus* son de gran importancia industrial y económica, principalmente de la industria de lácteos, ya que intervienen en los procesos de fermentación destinados a la producción de alimentos derivados de la leche (Pacheco, 2007). Estos forman parte normal de la flora intestinal, pueden encontrarse en el estómago y en la parte proximal del intestino delgado, esto es debido a que es la especie que tolera la acidez relativamente bien. Las especies más comunes reconocidas en la membrana mucosa del intestino son el grupo de los *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. jenseni*, *L. crispatus*), *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. agilis*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. pseudoplantarum*, *L. buchneri* y *L. reuteri* (Capela y col., 2005).

2.2.3. Efecto probiótico de las bacterias lácticas.

Hace un siglo, Elie Metchnikoff (premio nobel) postulo que las bacterias ácido lácticas (BAL) ofrecían beneficios a la salud que llevaban a la longevidad. Sugirió que la “autointoxicación intestinal” y el envejecimiento resultante podría suprimirse modificando la microbiota intestinal y utilizando microorganismos útiles para sustituir a los microorganismos proteolíticos como *Clostridium* (productores

de sustancias tóxicas que surgen de la digestión de proteínas, entre las que se encuentran fenoles, índoles y amoniaco). Desarrollo entonces una dieta con leche fermentada por la bacteria, a lo que denomino “bacilo búlgaro.”

El término probiótico fue introducido por primera vez en 1965 por Lily y Stillwell; a diferencia de los antibióticos, se definió al probiótico como aquel factor de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros organismos. En 1989, Roy Fuller enfatizó el requerimiento de viabilidad para los probióticos e introdujo la idea de que tienen un efecto benéfico para el huésped.

Hoy en día se conocen a los probióticos como microorganismos vivos que pueden incluirse en la preparación de una amplia gama de productos, incluyendo alimentos, medicamentos y suplementos dietéticos. En términos estrictos, el termino probióticos debe reservarse para los microorganismos vivos que han demostrado en estudios humanos controlados producir un beneficio a la salud (Teitelbaum y Walker, 2002).

Un probiótico siempre debe ser una cepa bacteriana determinada o una combinación de cepas conocidas cuya composición permanece estable y cuyos efectos han sido demostrados en estudios realizados en humanos y documentados en publicaciones científicas (Saxelin, 2002).

Para que un microorganismo sea considerado como probiótico debe comprender lo siguiente:

- ✓ Ser de origen humano.
- ✓ Comportamiento no patógeno.
- ✓ Resistente a los procesos tecnológicos.
- ✓ Resistencia a la acidificación gástrica y toxicidad de la bilis.
- ✓ Adhesión al tejido epitelial del intestino.
- ✓ Habilidad para persistir dentro del tracto gastrointestinal.
- ✓ Producción de sustancias antimicrobianas.
- ✓ Habilidad para modular respuestas inmunes.
- ✓ Habilidad para influir en las actividades metabólicas (asimilación del colesterol, actividad de la lactosa y producción de vitaminas) (Dunne y col., 2001).

En el cuadro 2.1 se pueden observar las especies ácido lácticas usadas comúnmente como probióticos (Parvez y col., 2006).

Cuadro 2.1. Especies comúnmente utilizadas como probióticos.

<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Bifidobacterium sp.</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Streptococcus sp.</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. cremoris</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>L. delbrueckii ssp. (bulgaricus)</i>	<i>B. animalis</i>		<i>S. diacetylactis</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. infantis</i>		<i>S. intermedius</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>		
<i>L. lactis</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			

(Parvez y col., 2006).

La habilidad de los microorganismos probióticos para sobrevivir y multiplicarse en el huésped influye en los efectos terapéuticos deseables. Las bacterias deben estar metabólicamente estables y activas en el producto, sobrevivir a través del paso del tracto digestivo en grandes cantidades y tener efectos benéficos en el intestino del huésped. El estándar de algunos alimentos en venta con la demanda de saludables, con la adición de probióticos, deben contener por gramo al menos 10^6 UFC de bacterias probióticas viables (Anal y Singh, 2006). Estos altos números deben ser debido a la reducción que pueden sufrir los microorganismos probióticos durante el tránsito del estómago y del intestino (Shah, 2000).

En la actualidad se proponen varios mecanismos de acción de los probióticos, los cuales en teoría son posibles (Cuadro 2.2) (Escalante, 2001).

Cuadro 2.2. Posibles mecanismos de acción de probióticos.

Beneficio asociado	Mecanismo de acción propuesto
Disminución en los síntomas de intolerancia a la lactosa.	Disminución en la concentración de lactosa en la leche fermentada por la actividad de la lactasa bacteriana durante la fermentación.
Disminución en la duración de diarrea en niños y adultos.	Efecto de barrera al evitar la colonización de la mucosa intestinal por bacterias potencialmente patógenas. Promoción de una respuesta IgM, IgA específica contra rotavirus a nivel local y sistemático
Disminución de infecciones gastrointestinales y prevención.	Efecto de barrera al evitar la colonización de la mucosa intestinal por bacterias potencialmente patógenas. Producción de compuestos antimicrobianos (ácido láctico, H ₂ O ₂ , bacteriocinas).
Disminución de los síntomas de dermatitis atópica y alergia a alimentos.	Efecto de barrera al evitar la colonización de la mucosa intestinal por bacterias potencialmente patógenas. Actividad proteolítica de bacterias probióticas contra la caseína de la leche y generación de péptidos con efectos supresores en la proliferación de linfocitos.

(Escalante, 2001)

2.3. Termotolerancia.

2.3.1. Mecanismos responsables de la termotolerancia.

El citoesqueleto celular está compuesto por una serie de estructuras proteicas poliméricas que forman microtúbulos, microfilamentos y filamentos internos. El choque calórico interrumpe numerosos procesos metabólicos y rompen estructuras celulares, pudiendo culminar con la muerte cuando el calor es intenso y sostenido, los principales daños se detectan en el citoesqueleto con desorganización de la red, relocalización de fibras de actina alrededor del núcleo, disrupción de los microtúbulos, así como pérdida de mitocondrias y desensamblaje de la fosforilación oxidativa. Diferentes grupos de proteínas en diferentes localizaciones, son dañados sucesivamente hasta que la célula expuesta al estrés entra en necrosis. Sin embargo, sería suficiente la estabilidad de al menos uno de estos grupos de proteínas para evitar la muerte y este papel estabilizador es atribuido a las proteínas de choque calórico HSP (por sus siglas en inglés heat shock proteins).

Las células de todos los microorganismos parecen emplear mecanismos de defensa cuando ocurren cambios abruptos en su medio ambiente local. Esta respuesta, referida como choque calórico o respuesta al estrés, vincula el cambio de las condiciones ambientales con la expresión de un grupo de proteínas conocidas como proteínas de choque calórico o proteínas del estrés. Las proteínas HSP, se expresan de manera constitutiva y ubicua en las células eucariotas y procariontes. En condiciones adversas, la función de éstas proteínas es proteger a la célula del daño producido por el estrés, mediante la unión de proteínas parcialmente desnaturalizadas, disociando agregados de proteínas, regulando el correcto doblado y traslocación intracelular en la síntesis de nuevas proteínas. Las proteínas del estrés son inducidas por varios agentes entre los que destacan la hipoglucemia, anoxia, calor, etanol, peróxido de hidrógeno, iones de metales pesados, arsenicales, infección con ciertos virus, radiación ultravioleta, radiación electromagnética de baja frecuencia y campos intensos de radiación gamma. Colectivamente las proteínas del estrés proveen protección a la célula

durante y/o después de recobrase de la agresión del estrés medioambiental (Lara y col., 2009).

2.4. *Lactobacillus plantarum*.

L. plantarum es un miembro del grupo de *Lactobacillus*, éste es descrito como una bacteria Gram positiva no esporada, en forma de barras rectas con puntas redondeadas con una anchura que va de 0.9 a 1.2 μm . Su metabolismo es homofermentativo, son moderadamente tolerantes al ácido, y son considerados como Generalmente Considerado como Seguro (por sus siglas en inglés GRAS) (Brinques y Záchia, 2010). Esta es una especie heterogénea y versátil que es encontrada en un gran variedad de ambientes, incluyendo lácteos, carnes, pescados, algunos vegetales y vegetales fermentados (Cuadro 2.3) (Zago y col., 2011). Por otra parte, es comúnmente encontrado en el tracto gastrointestinal humano; *L. plantarum* tiene la capacidad de codificación para la asimilación y utilización de muchos azúcares diferentes, captación de péptidos y la formación de algunos aminoácidos (Vries y col., 2005).

Cuadro 2.3. Productos alimentarios que contienen *L. plantarum*.

Materia prima	Producto
Productos derivados de plantas	Olivas
	Granos de cacao
	Yuca
	Chucrut
	Vino
Productos lácteos	Queso stilton (queso azul de Inglaterra)
	Tradicional queso feta (queso blanco de Grecia)
	Queso ricota
Productos cárnicos	Salchicha seca fermentada
	Salchicha Italiana fermentada
Bebidas de frutas	Proviva (presente en mercado)
Bebidas	Lactovital (presente en mercado)
Polvo/gel	ProBios (presente en mercado)

(Vries y col., 2005)

En diferentes cepas de *L. plantarum*, se encontró que muestran gran tolerancia a la exposición consecutiva de ácido hipoclorhídrico (pH 2.0), a sales biliares, tienen capacidad para sobrevivir al tránsito gástrico, colonizar el intestino y a temperaturas de calentamiento (de 50 a 70 °C de 30 a 60 min) para la elaboración de salchichas (Lara y col., 2009). Las células de *L. plantarum* sobreviven en estas condiciones de 0.003 a 10% en comparación con otros *Lactobacillus*, que tienen una sobrevivencia muy limitada (0 a 0.001%) de *L. casei* y *L. paracasei*, respectivamente (Vries y col., 2005). En algunos estudios, el consumo de *L. plantarum* muestra, entre otros efectos, reducción en transporte de enterobacterias fecales, reducción de ciertos factores de riesgos de enfermedades de arterias coronarias (Vries y col., 2005).

2.5. Microencapsulación.

2.5.1. Definición.

La microencapsulación es definida como una tecnología de empaquetar materiales sólidos, líquidos o gases en miniatura, cápsulas cerradas realzan su contenido, en la liberación de proporciones controladas bajo la influencia de condiciones específicas (Anal y Singh, 2006). Esta provee un medio de envasar, separar y almacenar materiales en escala microscópica en una matriz o sistema pared. La microencapsulación hoy en día se aplica para preservar y/o proteger numerosos ingredientes comerciales (Pedroza, 2002). Una ventaja adicional es que un compuesto encapsulado se libera gradualmente del compuesto que lo ha englobado o atrapado y se obtienen productos alimenticios con mejores características (Yañez y col., 2002).

La microencapsulación de bacterias microbianas involucra el atrapamiento de microorganismos vivos entre un gel polimérico semipermeable. El uso de células encapsuladas ofrece varias ventajas sobre las células libres, incluyendo protección contra compuestos tóxicos que la inhiban, contra el pH bajo, altas concentraciones de bilis, promueven actividad fisiológica, incrementa la densidad de células, y el crecimiento de microorganismos (Sultana y col., 2000).

Varios sistemas de polímeros han sido usados para encapsular microorganismos probióticos para protegerlos. Estos son fáciles de preparar, y algunos ingredientes pueden ser encapsulados si este es hidrofílico, hidrofóbico, líquido, un aceite viscoso, o sólido (Anal y Singh, 2006).

Un reto importante es mejorar la viabilidad de los probióticos que son adicionados en alimentos, es que resistan los procesos de fabricación tecnológicos, en particular el tratamiento térmico. En consecuencia, no parece que haya productos probióticos comerciales disponibles que son estables a altas temperaturas. Teniendo en cuenta la importancia de producir microorganismos probióticos termorresistentes, que son de intereses en los alimentos (Anal y Singh, 2006).

La tendencia actual para encontrar una solución a este problema es:

1. Descubrir nuevas cepas de bacterias probióticas que son naturalmente estables al calor o han sido genéticamente modificadas.
2. Desarrollo de un sistema de encapsulación tan efectivo que actué como material de aislamiento (Anal y Singh, 2006).

2.5.2. Métodos generales para microencapsular.

Para prepara las microcápsulas hay numerosas técnicas, y se ha sugerido que podrían identificarse más de 200 métodos en la literatura.

En la selección del proceso de encapsulación se considera el tamaño medio de la partícula requerida, las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante y la sustancia a encapsular, las aplicaciones para el material microencapsulado, el mecanismo de liberación y el costo (Yañez y col., 2002).

La tecnología de encapsulación de probióticos, presentan dos problemas: el tamaño de la bacteria (típicamente entre 1 a 5 μm de diámetro), el cual inmediatamente excluye la nanotecnología, y el hecho de que deben mantenerse vivas. Este último aspecto ha sido crucial para la selección del método adecuado de microencapsulación. Algunas tecnologías pueden ser aplicadas a la encapsulación de probióticos y cada uno de ellos provee microcápsulas con diferentes características en términos de tamaño de partícula y el tipo de cápsula. Por ejemplo, la formación de emulsiones permite la producción de un amplio rango de tamaño de partícula de 0.2 a 5000 μm , mientras que la extrusión da un pequeño rango, pero, no provee partículas menores a 300 μm . En la figura 2.3 se pueden apreciar los diferentes tipos de partículas obtenidos de cada método (Burgain y col., 2011).

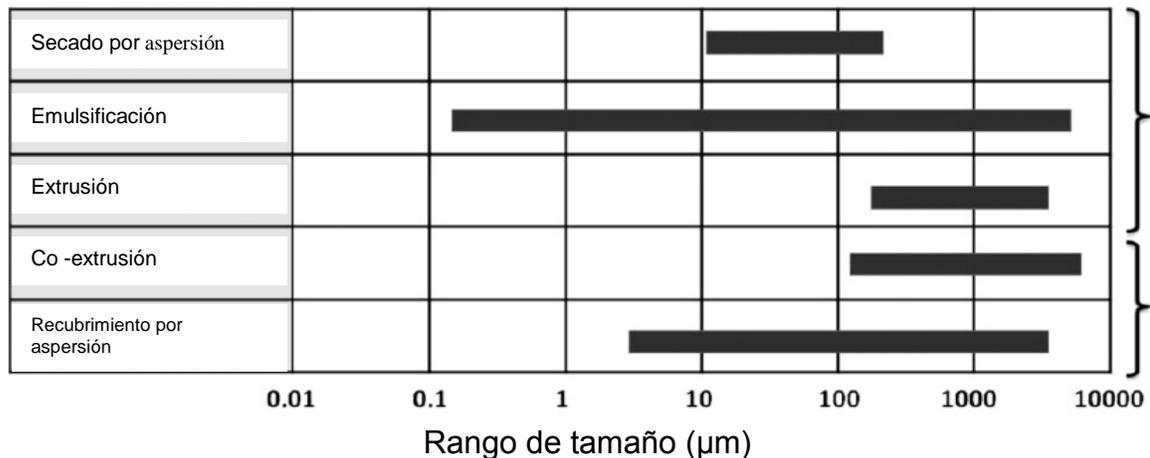


Figura 2.3. Métodos de encapsulación de probióticos: tamaño del rango previsto para cada método (Burgain y col., 2011).

La microencapsulación es un proceso en el cual las células son retenidas entre una membrana encapsulante que reduce el daño en las células o pérdida de células. Las técnicas de encapsulación aplicadas a probióticos para el uso en lácteos, pueden ser clasificada en dos grupos, dependiendo el método usado para formar las gotas: extrusión (método de goteo) y emulsión. Ambas técnicas extrusión y emulsión incrementan la sobrevivencia de bacterias probióticas hasta en un 80 – 95 % (Krasaekoopt y col., 2002).

2.5.3. Técnica de emulsión.

Una emulsión se describe generalmente como un sistema que contiene dos fases líquidas inmiscibles usualmente agua (W) y aceite (O), que al ser agitados energéticamente se obtiene una dispersión de uno de ellos en forma de pequeñas gotas disperso en el seno de otro. La fase formada por pequeñas gotitas se denomina fase interna o dispersa, y matriz en las que están disueltas se denomina fase externa o continua (Fennema, 1993).

Las emulsiones pueden ser clasificadas de acuerdo a la distribución de la fase del aceite y de la fase acuosa. Un sistema que consiste de gotas de aceite dispersas en una fase acuosa es llamada como emulsión aceite-en-agua (O/W)

(por sus siglas en inglés) o emulsión sencilla, en la figura 2.4 se observa la representación esquemática de las emulsiones sencillas, como ejemplo de estas tenemos: mayonesa, leche, cremas, sopas y salsa. Un sistema que consiste de gotas de agua dispersa en una fase de aceite es llamada emulsión agua-en-aceite (W/O) la cual también es una emulsión sencilla, ejemplos: margarina, mantequilla y panes (McClements, 1999). El proceso de convertir dos líquidos inmiscibles en una emulsión, o de reducir el tamaño de las gotas en una emulsión es conocido como homogenización.

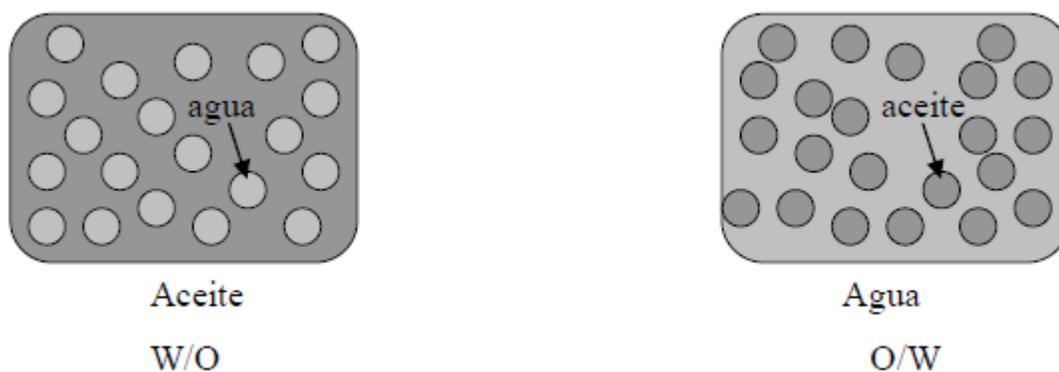


Figura 2.4. Representación esquemática de emulsiones sencillas.

Es posible formar una emulsión por homogenización de aceite y agua puros, pero las dos fases se separarían rápidamente en un sistema el cual consistiría de una capa de aceite (alta densidad) en la superficie y una capa de agua (baja densidad). Esto es porque las gotas tienden a unirse con sus próximas cuando chocan, lo cual lleva a una completa separación de las fases.

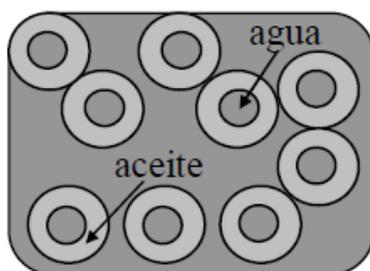
Coexiste una forma viable de realizar emulsiones que son cinéticamente estables por un periodo razonable de tiempo (días, semanas, meses y años) incluyendo sustancias conocidas como emulsificantes y agentes espesantes antes de la homogenización. Los emulsificantes son moléculas de superficie activa, el cual se adsorbe en la superficie de las gotas formadas recientemente después de la homogenización, formando una membrana protectora la cual previene un estado de agregación de las gotas. Los emulsificantes más usados son moléculas anfifílicas (tienen regiones polares y no polares en la misma molécula) y por lo regular son proteínas anfifílicas. Los agentes espesantes son ingredientes los

cuales son usados para incrementar la viscosidad de la fase continua de la emulsión, y con ellos aumenta la estabilidad de la emulsión porque se disminuye el movimiento de las gotas (McClements, 1999).

2.5.4. Emulsiones múltiples.

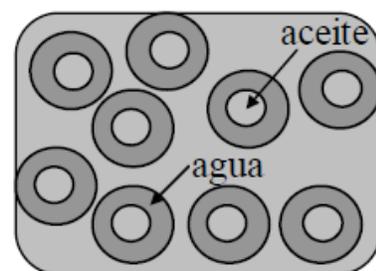
En la actualidad existe otro tipo de emulsión, denominada múltiple, que ha llamado la atención de fabricantes e investigadores de estos sistemas, el interés reciente de su estudio radica, en que dichas emulsiones pueden ser empleadas en procesos de separación de hidrocarburos, inmovilización de enzimas y de bacterias, entre otros procesos.

Una emulsión múltiple (o emulsión doble) es una emulsión de una emulsión. Existen dos tipos de emulsiones: agua-en-aceite-en-agua (W/O/W) y aceite-en-agua-en-aceite (O/W/O) (Figura 2.5). Las gotas de aceite de una emulsión W/O/W tienen gotas de agua dispersas en ellas, y las gotas de una emulsión O/W/O contienen gotas de aceite dispersas. Por lo tanto, una emulsión doble tiene tres fases distintas y dos interfases aceite-agua, o viceversa (Dickinson, 2010). La presencia de estas dos interfases significa, que dos diferentes agentes emulsionantes son esenciales para formar una emulsión doble, uno para estabilizar las gotas interiores (emulsión primaria) y otra para estabilizar las gotas exteriores (la emulsión secundaria) (Dickinson, 2010).



Agua

W/O/W



Aceite

O/W/O

Figura 2.5. Representación esquemática de emulsiones múltiples.

La formulación debe ser estabilizada en dos pasos de emulsificación, el procedimiento involucra una combinación de emulsificantes lipofílicos e hidrofílicos, para una emulsión W/O/W: el surfactante que es soluble en aceite se usa para preparar la emulsión W/O y también uno soluble en agua fue el agente emulsificante secundario (Dickinson, 2010).

2.5.5. Constituyentes de una emulsión.

Las emulsiones son materiales con una composición compleja los cuales contienen una amplia variedad de constituyentes químicos diferentes (Cuadro 2.4). La composición de una emulsión puede ser clasificada de diversa formas: por su concentración de átomos, concentración de moléculas (agua, amilosa, entre otras), concentraciones de grupos de moléculas (proteínas, lípidos, carbohidratos, minerales) y concentración de ingredientes (harina, leche, sal, huevos).

Cuadro 2.4. Componentes típicos encontrados en emulsiones.

Macrocomponentes	Microcomponentes
Agua	Emulsificantes
Lípidos	Minerales
Proteínas	Gomas
Carbohidratos	Sabores
	Colores
	Conservadores
	Vitaminas

(McClements, 1999)

La mayoría de las emulsiones pueden consistir en tres regiones las cuales tienen diferentes propiedades fisicoquímicas; el interior de la gota, la fase continua y la interfase (figura 2.6). Las moléculas en una emulsión se distribuyen en esas tres regiones de acuerdo a su concentración y su polaridad. Las moléculas no

polares tienden a localizarse en la fase del aceite, las moléculas polares en la fase acuosa y las moléculas anfifílicas en la interfase.

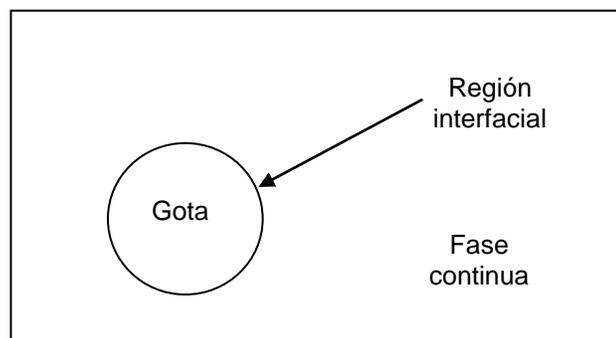


Figura 2.6. Regiones que forman una emulsión (McClements, 1999).

Las grasas y aceites son parte de un grupo de componentes conocidos como lípidos, por definición un lípido es un componente que es soluble en solventes orgánicos pero insoluble en agua. Este grupo de componentes contiene un gran número de diferentes tipos de moléculas, incluyendo acil-gliceroles, ácidos grasos y fosfolípidos. Los triglicéridos son los lípidos más comunes en los alimentos.

La fase oleosa también puede servir como solvente de otros componentes importantes como lípidos solubles, vitaminas, antioxidantes, conservadores y aceites esenciales.

Por otra parte el agua es de gran importancia en la determinación en los cambios fisicoquímicos y propiedades organolépticas de las emulsiones. Su forma molecular y sus propiedades estructurales determinan la solubilidad, conformación e interacción de los otros componentes de la fase acuosa. La fase acuosa de algunas emulsiones contiene una variedad de componentes solubles en agua, como son minerales, vitaminas, azúcar, surfactantes, proteínas y polisacáridos. Las interacciones entre estos constituyentes y las moléculas del agua determinan la solubilidad, conformación y reacciones químicas de algunos ingredientes alimentarios (McClements, 1999).

Hay emulsiones mucho más complejas que las mencionadas anteriormente (aceite, agua y emulsificante). La fase acuosa puede contener una

variedad de ingredientes solubles en agua, incluyendo azúcar, sal, ácidos, bases, surfactantes, proteínas y carbohidratos. La fase de aceite usualmente contiene una mezcla compleja de componentes de lípidos solubles, como son triglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres, esteroides y vitaminas. La región interfacial puede contener una mezcla de varios componentes de superficie activa, incluyendo proteínas, fosfolípidos, surfactantes, alcoholes y partículas sólidas.

2.5.6. Mecanismos generales de inestabilidad de las emulsiones.

El término estabilidad de la emulsión es ampliamente usado para describir la capacidad de la emulsión a resistir los cambios en sus propiedades con el tiempo. Sin embargo, hay una variedad de mecanismos fisicoquímicos que pueden ser responsables de las alteraciones en las propiedades de la emulsión. Los cambios fisicoquímicos más importantes responsables de la inestabilidad de las emulsiones se muestran en la figura 2.7. El cremado y la sedimentación son formas de separación gravitacional. El cremado describe el movimiento ascendente de las gotas debido a que tiene una baja densidad en comparación con el fluido que las circunda, la sedimentación describe el movimiento descendente de las gotas debido a que tienen una alta densidad en comparación con el líquido que las rodea. La floculación y coalescencia son tipos de agregación de gotas. La floculación ocurre cuando dos o más gotas están unidas formando un agregado en el cual las gotas retienen su integridad individual, considerando que la coalescencia es el proceso donde dos o más gotas se unen para formar una gota grande. La fase de inversión es el proceso en el cual una emulsión aceite en agua es convertida en una emulsión agua en aceite o viceversa (McClements, 1999).

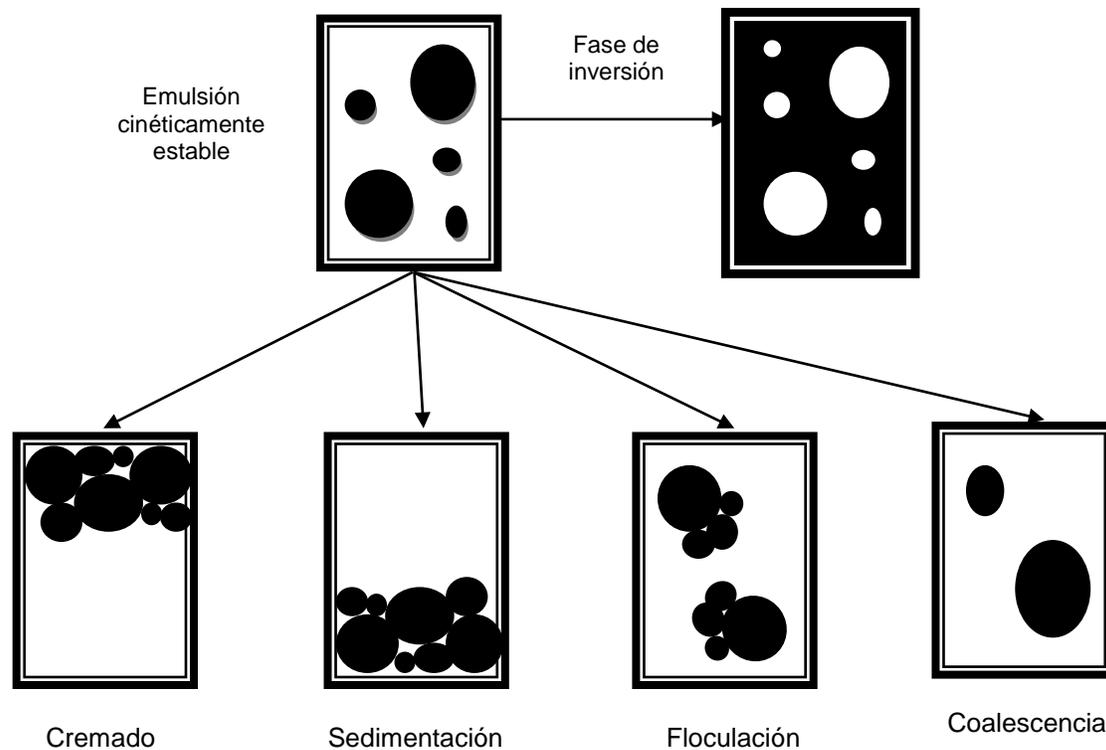


Figura 2.7. Las emulsiones pueden ser inestables debido a varios mecanismos físicos, incluyendo el cremado, sedimentación, floculación, coalescencia y fase de inversión (McClements, 1999).

2.5.7. Inestabilidad de emulsiones múltiples.

La inestabilidad de un sistema de emulsiones múltiples puede seguir una gran variedad de vías de destrucción dependiendo de su composición y microestructura. Los principales mecanismos de inestabilidad se muestran en la figura 2.8. El mecanismo A involucra la coalescencia de las gotas exteriores, este es semejante a la coalescencia de las gotas de una emulsión primaria. El mecanismo B es la coalescencia de las gotas interiores, no debe existir ningún cambio en la interfase de las gotas exteriores. El mecanismo C es la coalescencia de las gotas interiores con la interfase de las gotas exteriores, permitiendo la transferencia de algún material de la fase dispersa interna a la fase continua externa. El mecanismo D es la contracción o hinchamiento de las gotas interiores, derivados del cambio difusivo de material entre la fase interna y la fase externa

como resultado de transporte de masa hacia la película líquida que interviene (Dickinson, 2010).

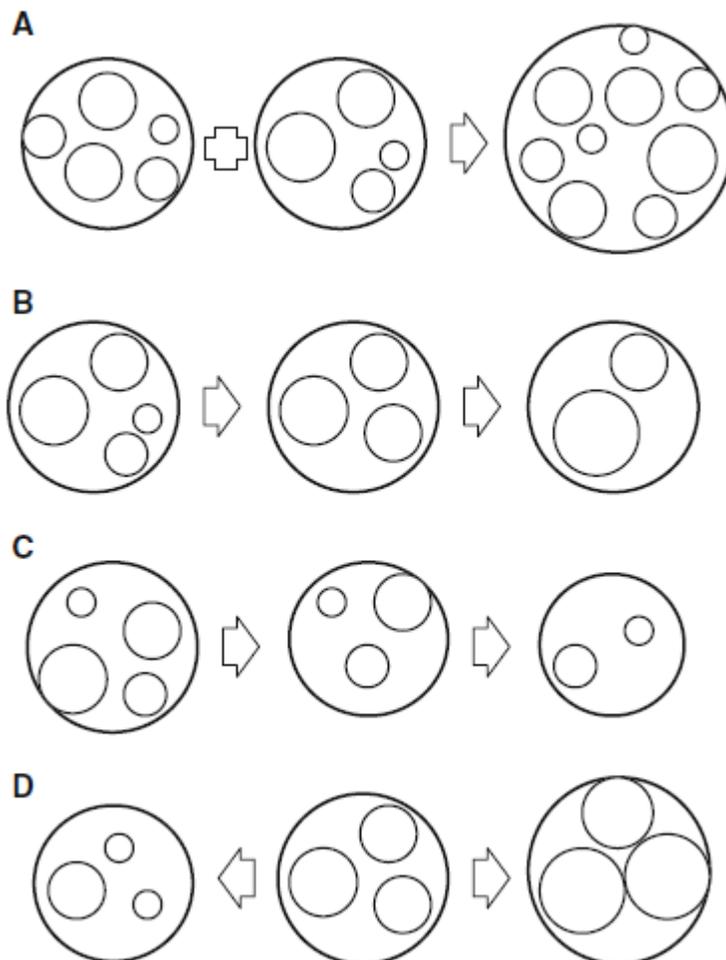


Figura 2.8. Representación esquemática de los principales mecanismos de rompimiento de una emulsión doble: (A) coalescencia de las gotas exteriores, (B) coalescencia de las gotas interiores, (C) coalescencia de las gotas internas/externas y (D) contracción o hinchamiento de las gotas interiores.

2.6. Estabilizantes y emulsificantes.

Desde el punto de vista del atrapamiento y retención de material encapsulado, uno podría considerar que un sistema de emulsión doble es de buena estabilidad si el rendimiento inicial, es de alrededor del 95 % (o arriba) y si el rendimiento después de varias semanas de almacenamiento se encuentra todavía, en el rango de 70 a 80 % (o arriba) (Dickinson, 2010). Es por eso que nos vemos en la necesidad de ocupar surfactantes de bajo peso molecular y biopolímeros.

2.6.1. Surfactantes.

Cuando se examina una superficie o una interfase, es decir, un límite entre dos sustancias inmiscibles, hay una fuerte probabilidad de encontrar un fenómeno interfacial, se pone en juego a un surfactante. Las propiedades y usos de los surfactantes provienen de dos propiedades fundamentales de estas sustancias; de su capacidad de adsorberse en las interfases y su tendencia a asociarse para formar estructuras organizadas.

Todos los surfactantes poseen una molécula que presenta a la vez un grupo polar (hidrofílico) y un grupo apolar (Hodrofóbo o lipofílico) (Salager, 1999). El grupo polar es en general un grupo funcional que contiene heteroátomos (O, S, N, P), mientras que el grupo apolar es en la mayoría de los casos un hidrocarburo parafínico o alquil–aromático (Figura 2.9).

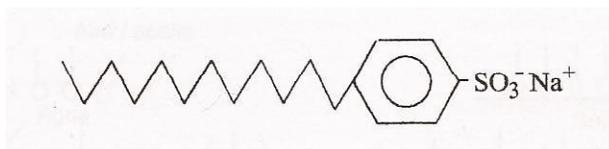


Figura 2.9. Representación de un surfactante

Cuando una molécula de surfactante se coloca en una interfase agua-aceite, ella puede orientarse de manera a que el grupo polar este en el agua, mientras que el grupo apolar se ubica fuera del agua, en el aceite. La adsorción

de un surfactante en una interfase líquido-líquido, produce en general una reducción de la tensión superficial o interfacial, de donde el nombre de tensoactivo (Salager, 1999).

Cuando a una solución se le añade cada vez más surfactante, este comienza por adsorberse a las interfases disponibles, luego su concentración aumenta hasta que se forman las primeras micelas. La micela es un polímero de asociación en el cual el surfactante alcanza una posición favorable (Figura 2.10). La fuerza motriz principal que favorece la formación de micelas es el efecto hidrófobo, es decir, la sustracción de la parte no polar del surfactante del contacto con las moléculas del agua y la formación de un contacto más favorable desde el punto de vista energético con las partes no polares de otras moléculas de surfactante.

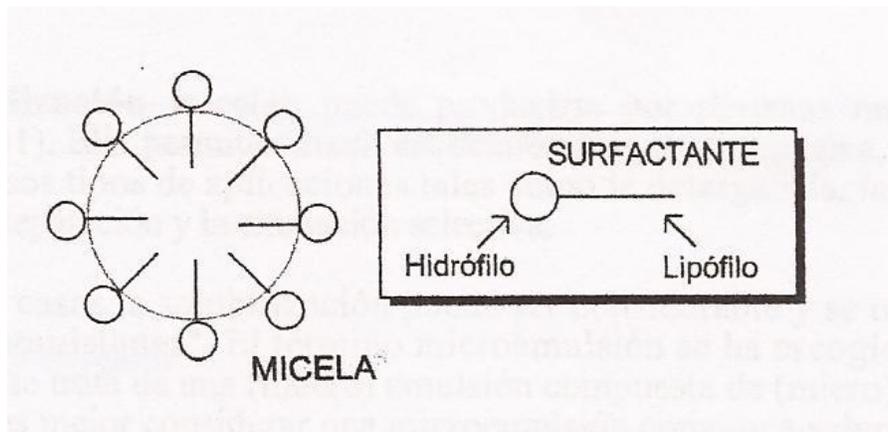


Figura 2.10. Representación de una micela.

La presencia de surfactantes es lo que permite controlar los diferentes fenómenos involucrados en la inestabilidad de las emulsiones, cuya escala de tiempo puede variar de una fracción de segundos a varios años y hasta más en sistemas perfectamente estables (Salager, 1999).

2.7. Biopolímeros (Estabilizantes).

Independientemente del método para preparar las microcápsulas, el primer paso para encapsular un ingrediente es la selección de una matriz de

encapsulación adecuada. Este material de soporte debe ser de grado alimentario si se usará en la industria de alimentos, y poder formar una barrera para proteger la sustancia encapsulada (Burgain y col., 2011). Un mecanismo básico para la estabilización de la emulsión es el estérico, el cual es creado por una capa del biopolímero adsorbido en la interfase.

Diferentes tipos de materiales de encapsulación usualmente dependen en las propiedades funcionales de las microcápsulas y en el proceso de encapsulación usados (Chen y col., 2005).

El agente estabilizante es un compuesto único (o mezcla) que confiere un largo periodo de estabilidad en la emulsión por mecanismos de adsorción, aunque no necesariamente en todos los casos. Los estabilizantes son generalmente biopolímeros (proteínas y polisacáridos) (Yañez y col., 2002).

Se pueden identificar tres beneficios técnicos del uso de biopolímeros como agentes estabilizantes en una emulsión doble:

1. Comparada con emulsificantes de bajo peso molecular, los biopolímeros son menos susceptibles a la difusión y migración de la fase externa acuosa a la interna.
2. Los biopolímeros pueden fácilmente estabilizar las estructuras de red en la fase acuosa continua, ejemplo por la viscosidad y gelificación.
3. La superficie activa de los biopolímeros puede ser usada como un estabilizante efectivo de la interfase exterior aceite –agua de las gotas de la emulsión W/O/W (Dickinson, 2010).

Varios emulsificantes proteicos alimentarios han sido utilizados en la estabilización de emulsiones dobles (Cuadro 2.5), y también algunos emulsificantes hidrocoloides como goma arábiga. Intentos también se han hecho para estabilizar las gotas exteriores de las emulsiones múltiples con varios polisacáridos solubles actuando como agentes espesantes/gelificantes, (pectina, carragenina, alginato, xantana) (Dickinson, 2010).

Cuadro 2.5. Tipos de material de pared utilizados en microencapsulación.

Tipo de cobertura	Cobertura específica
Gomas	Goma arábica, agar, alginato de sodio, carragenina.
Carbohidratos	Almidón, dextranos, sacarosa, jarabes de maíz.
Celulosas	Carboximetil – celulosa, metilcelulosa, nitrocelulosa, acetilcelulosa.
Lípidos	Ceras, parafinas, tristearina, ácido esteárico, monoglicéridos, diglicéridos, aceites, grasas.
Proteínas	Gluten, caseína, gnetina, albúmina.

(Yañez y col., 2002).

Investigaciones recientes, muestran que la estabilidad de emulsiones múltiples W/O/W, no pueden ser explicadas únicamente por efecto de la viscosidad, en tal caso un mecanismo básico para la estabilización es el estérico, el cual es creado por una capa de polímero adsorbido en la interfase. En ese sentido las emulsiones múltiples estabilizadas con biopolímeros pueden ser estables desde un punto de vista de agregación y de algunos factores que contribuyen a dicha estabilidad son la barrera energética y la barrera mecánica (Yañez y col., 2002).

La goma arábica es un exudado de algunos árboles del género *Acacia* (*Acacia senegal* y *Acacia seyal*), material muy heterogéneo, formado por dos fracciones, alrededor del 70 % de la goma, son cadenas de polisacárido con poco o ningún material nitrogenado y la otra fracción tiene proteínas como parte integral de sus estructuras. El contenido de proteína es alrededor del 2 % en peso, pero algunas fracciones específicas pueden obtener hasta un 25 % (Lara y col., 2009). Este componente proteico confiere a este hidocoloide alimentario su única superficie activa y sus propiedades emulsificantes. Esta misma funcionalidad puede ser explotada en la estabilización de las gotas exteriores de una emulsión W/O/W, concentraciones de alrededor del 10 % peso de la goma es requerida a fin

de lograr la preparación de una emulsión doble fina con buena estabilidad a largo plazo. Una ventaja adicional de la goma arábiga como agente emulsificante de emulsiones dobles es que, este puede proveer estabilidad coloidal con respecto a la floculación de las gotas sobre un amplio rango de pH (Dickinson, 2010).

La maltodextrina son obtenidas por una hidrólisis acida de diferentes almidones (maíz, papa u otros) (Saéñz y col., 2008). Se encuentran como equivalente de dextrosa (DEs), el grado de DE es una medida del grado de hidrólisis del almidón del polímero. Estos tienen la habilidad para formar matrices que son importantes en la conformación de sistemas de pared. En la selección de materiales de pared para la encapsulación, la maltodextrina es una buena opción entre costo y efectividad, ya que tiene un suave sabor, una viscosidad baja a alta proporción de sólidos y está disponible en diferentes pesos moleculares. Sus principales deficiencias son la capacidad de emulsionar y baja retención de compuestos volátiles (Madene y col., 2005).

La goma de mezquite, es un biopolímero originario del estado de México, que tiene una estructura química similar a la de la goma arábiga (2 % de proteína), pero con un mayor contenido de fracción proteica (5.8 %). Se ha reportado que químicamente es una sal neutra de un polisacárido ramificado de naturaleza acida formado por un núcleo de residuos de β -D-galactosa, constituyendo un esqueleto de uniones (1-3) y ramificaciones (1-6) conteniendo L-arabinosa (formas cíclicas de piranosa y furanosa), L-manosa, β -D-glucoronato y 4-6-metil- β -D-glucuronato como azúcares simples o cadenas laterales de oligosacáridos. También contiene una pequeña cantidad de proteína (0.7–5.8 %) ubicada en la parte central de la estructura primaria completa, siendo químicamente más similar a la goma arábiga. La goma de mezquite es una mezcla compleja constituida por cinco fracciones:

- ✓ La fracción 1 representa más del 85 % del total de la goma, sin embargo se encontró que es particularmente baja en proteína (3.7 % del total de proteína).
- ✓ Las fracciones 2 y 3 contribuyen con aproximadamente el 11 % del total de la goma y contiene aproximadamente el 25% del total proteico.

- ✓ Las fracciones 4 y 5 contribuyen con aproximadamente el 72% del total proteico a pesar de constituir solamente el 3.7 % del total de la goma.

Pudiendo ser las fracciones 2 y 3 las responsables de las propiedades emulsificantes de la goma de mezquite, por el mayor contenido de proteína.

Las propiedades especiales para formar películas y actuar como agente emulsificante surge de la presencia de esta fracción proteica. Se cree que los residuos hidrófobos de los aminoácidos se adsorben en la interfase aceite agua y que los bloques de los carbohidratos hidrofílicos se extienden dentro de la solución acuosa, previniendo la floculación y coalescencia de las gotas a través de fuerza de repulsión estérica (Yañez y col., 2002).

2.8. Aguamiel.

El “Maguey” es una planta de la familia *Agavaceae* que crece en el altiplano semiseco y frío de México. Los magueyes productores de pulque en el Valle de México son: *Agave teometl* Zucc., *A. weberi* Cels., *A. altísima* Jacobi., *A. compliata* Trel., *A. gracillispina* Englem., *A. malliflua* Trel., *A. quitifera* Trel. *A. crassispina* Trel., *A. mapisaga* Trel. *A. americana* L., *A. salmiana* Otto ex Salm. Las zonas productoras de pulque son principalmente Hidalgo, Tlaxcala, Edo. México y Puebla, aunque también se le encuentra marginalmente en San Luis Potosí, Michoacán, Querétaro, Morelos, Guanajuato, Veracruz y Oaxaca (Flores y col., 2004).

El aguamiel es un líquido dulce (7 a 14 °Baumé), éste puede ser ácido o ligeramente alcalino, un líquido translúcido de color ámbar (Islas, 2005). Posee un ligero olor herbáceo y contiene diversos minerales, además de ser rico en carbohidratos y proteínas.

El aguamiel presenta un pH promedio cercano a la neutralidad (6.8) con un porcentaje de humedad elevado (86%) y una proporción de sólidos solubles de 10.85 °Brix. El contenido de proteína soluble es de 5.3 %. La sacarosa es el azúcar que está presente en mayor proporción, aunque hay otros polisacáridos

compuestos por glucosa y fructosa como los oligofruetosacáridos y polifruetosacáridos (Islas, 2005).

De la fermentación del aguamiel, que tarda aproximadamente entre 24 y 48 horas, se obtiene la bebida alcohólica conocida como pulque. El producto primario es el aguamiel, el cual se toma como bebida refrescante, factible de industrializarse, además de ser medicinal y nutritiva, el aguamiel se fermenta y produce pulque que es una bebida lechosa que contiene de 4- 8 % de alcohol (Flores, 2004).

2.9. Queso.

El queso es una mezcla de caseínas, grasa láctea y otros componentes de la leche que se separan de las materias primas por las técnicas adecuadas. Este proceso de separación se favorece añadiendo enzimas, acidificando y/o calentando. Esta mezcla de sustancias generalmente se moldea, se sala, se prensa y se siembra con cultivos fúngicos o bacterianos. En muchos casos se les añade también colorantes, especias u otros alimentos no lácteos. Se consume en fresco o en distintos grados de maduración (Spreer, 1991).

De acuerdo a Villegas, (2004), el queso es el producto resultante de la coagulación de la leche de ciertos mamíferos mediante la acción de la renina (presente en el cuajo) o enzimas similares, en presencia de ácido láctico producido por microorganismos agregados o propios de la leche, del cual se elimina una parte de la humedad por el corte de la cuajada, calentamiento y/o prensado, y a continuación el moldeado, prensado, afinado y su conservación en condiciones convenientes.

La elaboración del queso es seguramente la forma más antigua de procesado de la leche. La producción de la leche unida al intento del hombre para conservar la tan valiosa y a la vez deteriorable proteína de la leche. Los diferentes procedimientos de fabricación del queso, que implica una serie de transformaciones bioquímicas, hacen que la, en un principio insípida, caseína adquiera un sabor agradable y característico para cada tipo de queso (Bain, 2004).

2.9.1. Clasificación de quesos.

Se conocen en todo el mundo unos 2,000 nombres de tipos diferentes de queso que, en parte presentan características muy distintas y que requieren para su elaboración una serie de procedimientos más o menos diferenciados. Ante esta perspectiva se hace necesario establecer una clasificación.

Aunque algunas variedades de queso se consumen fresco (en menos de dos semanas), esto es, sin un periodo de maduración, el proceso de la mayoría de variedades de quesos pueden subdividirse en dos fases bien definidas: elaboración y maduración. Este hecho define la primera clasificación de los quesos auténticos: frescos y madurados (Villegas, 2004).

En realidad la gran diversidad de tipo de quesos genuinos se debe a un gran número de características, como tipo de leche, método de elaboración, tamaño, forma, empaque, etc. Esto hace que su clasificación sea complicada. Sin embargo, prácticamente pueden clasificarse atendiendo a algunos criterios, por ejemplo:

Tipo de pasta: Esta clasificación se determina por el contenido de agua y calcio en la pasta, factores que afectan su estructura (Cuadro 2.6) (González, 2002).

Cuadro 2.6. Clasificación de los quesos por tipo pasta.

Pasta	Ejemplos
Untable	Doble crema, Crema, Cottage, Petit – Suisse.
Tajable	Chapingo, Cheddar, Chihuahua, Manchego, Emmental, Edam.
Rallable	Añejo, Cotija, Parmesano, Pecorino Romano.
Hilada	<u>Oaxaca</u> , Asadero, Guaje (Huasteco), Adobera, Mozzarella.

(Villegas, 2004)

Consistencia de la pasta: La blandura y la dureza es una importante propiedad textural y reológicas, determinante en la aceptación del producto por parte del consumidor. Como en la clasificación anterior estas propiedades se ven influenciadas por el contenido de agua y de calcio (Cuadro 2.7) (González, 2002).

Cuadro 2.7. Clasificación de los quesos según la consistencia de la pasta.

Pasta	Ejemplos
Blanda	Quesos untables, Panela; Queso crema tropical, Ranchero fresco.
Semidura	Chapingo, Chihuahua; tipo Manchego, Manchego, Cheddar, Emmental, Gouda, Oaxaca .
Dura	Añejo, Cotija, Parmesano; pecorino romano.

(Villegas, 2004)

Grado de maduración: En esta clasificación, más que al tiempo o lapso de maduración, se alude al grado en que las materias proteica y grasa se han transformado, impartiendo a la pasta nuevas características sensoriales, distintas a la de la pasta recién hecha (Cuadro 2.8) (González, 2002).

Cuadro 2.8. Clasificación según el grado de maduración de la pasta.

Pasta	Ejemplos
Fresca	Panela, Oaxaca, Ranchero, Queso crema, Adobera, Cotagge, Petit – Suisse, Oaxaca.
Semimaduro	Chapingo, Chihuahua, tipo Manchego Edam, Emmental.
Maduro	Cotija, Añejo, Camembert, Roquefort, Parmesano, Pecorino.

(Villegas, 2004)

2.9.2. Elaboración de queso.

La composición básica de la pasta de un queso, esto es, su contenido en los grandes constituyentes del producto (agua, proteínas, grasa y sal o cenizas), en la cual influyen muchos factores; algunos de ellos son los siguientes:

La riqueza en materia seca útil de la leche de proceso, es decir, del porcentaje de materia proteica (esencialmente de caseína) y de grasa butírica, en una cierta razón grasa/proteína, de acuerdo con el tipo de queso que va a elaborarse.

Lo fino del corte del gel y el grado de secado de la cuajada; esto en función del tiempo en el que se trabaja el grano tras el corte. Ambos determinan

el porcentaje de agua en la pasta y su proporción de sólidos totales; entre ellos destacan la proteína total y la grasa.

El grado de maduración (acidificación) de la leche y el de “chedarización” de la pasta en tina, ambos factores influyen en la intensidad de la sinéresis de la cuajada y, en la expulsión del suero, lo que finalmente se traduce en un porcentaje de humedad y sólidos totales determinados. La acidificación de la leche de proceso y/o de la pasta durante la fabricación también incide en los contenidos de calcio y fosfatos en el producto final (Villegas, 2004).

2.10. Quesos de pasta hilada.

Los quesos de pasta hilada son una variedad de quesos de pasta semi-dura, donde la cuajada es calentada por encima de 55 °C y estirada mecánicamente durante la manufactura del queso. El término de pasta filata (en Italiano) o pasta hilada, es un término que cubre varias variedades de queso caracterizados por un proceso especial de producción, donde la cuajada, la cual es drenada extensamente acidificada, es sometida a un tratamiento térmico para darle plasticidad y textura. Este tratamiento se realiza en agua caliente donde el producto final adquiere sus características físicas como son formación de fibras al ser desmenuzado y características de fundido (Franco, 2005).

2.10.1. Queso Oaxaca.

El queso Oaxaca es un queso mexicano que podría ser clasificado en la familia de los quesos de pasta hilada. En nuestro país el queso Oaxaca pertenece al grupo de los quesos frescos que se caracterizan por tener un alto contenido de humedad, sabor suave y no tener corteza. Pudiendo o no adicionarle ingredientes opcionales y tener un periodo de vida de anaquel corto, requiriendo condiciones de refrigeración. La presentación del queso es en correas, “trenzas”, con la formación de bolas enrolladas (Villegas, 2007). Este queso, con este nombre, solo

se conoce en México, donde se fabrica en todo el país. Se conoce también con el nombre de quesillo, queso de hebra y queso asadero (Franco, 2005).

Las características del queso Oaxaca son las siguientes:

- 1) El queso debe fundir (gratinar).
- 2) Las correas del queso deben permanecer bien definidas.
- 3) La correa del queso tiene una dureza intermedia, además de que al desmenuzarse forma hilos, siendo comparada con una pechuga de pollo cuando se deshebra.

La composición química, el pH y la actividad acuosa del queso Oaxaca se muestra en el cuadro 2.9. El valor medio del pH reportado para este queso es de 5.1, este valor concuerda con los determinados para otros quesos de pasta hilada (Scott, 1991).

Cuadro 2.9. Composición química del queso Oaxaca.

Parámetro	Media
pH	5.1 ± 0.3
Aw	0.991 ± 0.005
Humedad (% p/p)	51.5 ± 3.8
Cenizas (% p/p)	3.6 ± 0.4
Proteínas (% p/p)	21.2 ± 1.5
Materia grasa (% p/p)	21 ± 3.1
NaCl (% p/p)	1.8 ± 0.5
Materia grasa/materia seca	43.8 ± 6
Humedad/Sólidos no grasos	1.9 ± 0.3

(Franco, 2005)

La gran mayoría de las elaboraciones de queso Oaxaca, se hacen a partir de leche cruda. La secretaria de salud acepta el queso Oaxaca como queso pasteurizado tomando en cuenta que se emplea agua caliente en el fundido de este queso (malaxado). En la figura 2.11 se puede observar el proceso de elaboración de este queso por medio de acidificación directa de la leche con ácido cítrico (Palacio, 2006).

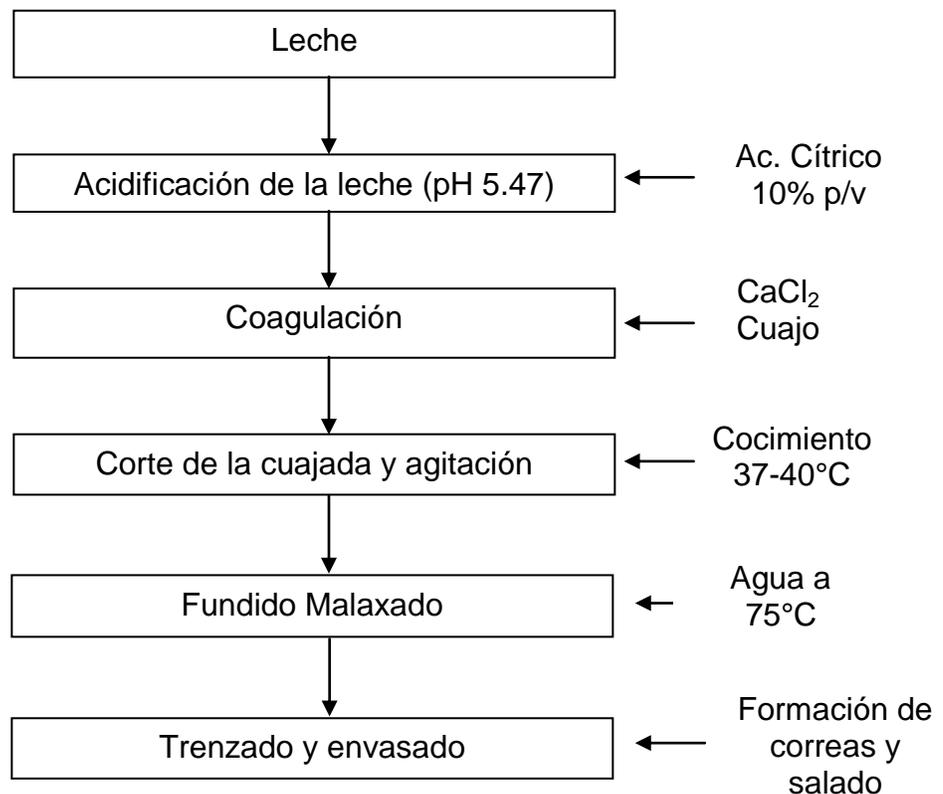


Figura 2.11. Proceso de elaboración del queso Oaxaca.

En el proceso de elaboración del queso Oaxaca las emulsiones múltiples probablemente se pueden adicionar junto con la sal, o en lugar de cultivos lácteos, pero se tendrá que evaluar el momento que presente las mejores características para poder adicionar la emulsión; así como también la cantidad de emulsión que se adicione para obtener una concentración final de 6 Log UFC /gr de queso el cual es límite mínimo permitido (Anal y Singh, 2006).

La textura característica de los quesos de pasta hilada puede explicarse por el re-arreglo estructural que las moléculas de caseína (α , β y κ , que forman parte de las micelas descalcificadas) sufren al someterse la pasta a calentamiento y trabajo mecánico. Este desarrollado durante el amasado, y el ascenso de temperatura por el aporte de agua caliente, provocará la desnaturalización de parte de las moléculas de caseína, alterando su conformación lamina- β y hélice- α .

La continuación de la acción mecánica, y el estiramiento al que se somete la pasta en un sentido (dirección) espacial, orientaran y “alinearan” a las proteínas, cual si fueran agregados de “hilos” (figura 2.12).

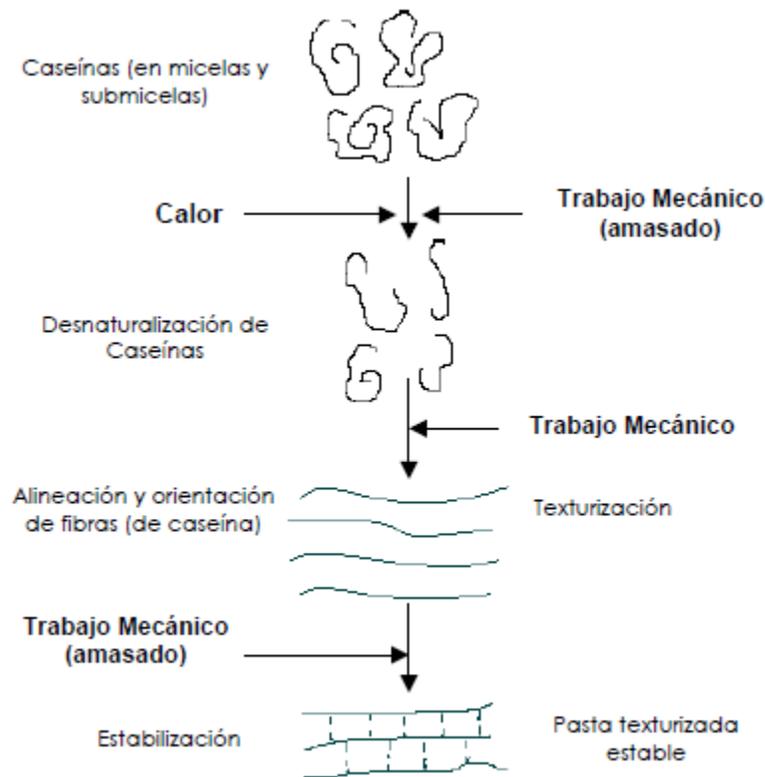


Figura 2.12. Principales fases durante la texturización de una cuajada para un queso de pasta hilada (Villegas, 2007).

3. Antecedentes.

En un esfuerzo para ampliar la gama de productos probióticos, algunos investigadores y compañías se han esforzado para manufacturar quesos que mantengan la viabilidad de los cultivos probióticos.

Algunos estudios han reportado el uso de probióticos encapsulados (Cuadro 3.1) y en particular en el queso Cheddar.

Cuadro 3.1. Ejemplos de probióticos encapsulados y su aplicación en quesos.

Tipo de queso	Probiótico	Técnica de encapsulación	Material usado como biopolímero
Fresco	<i>L. bulgaricus</i> <i>S. thermophilus</i>	Extrucción	Ca – alginato
Cheddar	<i>B. bifidum</i>	Emulsificación	K - carragenina
Fresco	<i>L. lactis</i> spp. <i>lactis</i>	Emulsificación	K - carragenina
Crescenza	<i>B. bifidum</i> <i>B. infantis</i> <i>B. longum</i>	Secado al frio	Ca – alginato
Cheddar	<i>L. paracasei</i> <i>L. acidophilus</i> <i>B. infantis</i>	Secado por asperción Emulsificación	Leche descremada Alginato/almidón
Feta	<i>L. acidophilus</i> <i>B. lactis</i>		Alginato
Kasar	<i>L. acidophilus</i> <i>B. bifidum</i>	Extrucción y emulsificación	Alginato
Blanco en salmuera	<i>L. acidophilus</i> <i>B. bifidum</i>	Extrucción y emulsificación	Alginato

(Crittenden y col., 2001)

Dinakar y Mistry (1994) inmovilizaron *Bifidobacterium bifidum* en k – carragenina con una técnica de emulsificación y las gotas de gel obtenidas fueron

congeladas y liofilizadas, la adicción de células inmovilizadas en el queso no fue uniforme, pero la sobrevivencia en el queso Cheddar no fue afectada, de hecho algunas células permanecieron viables hasta 24 semanas y no afectaron el sabor, la textura y la apariencia del queso.

De acuerdo a Sandoval-Catilla y col. (2009), *Lactobacillus casei* fue atrapado en gotas de alginato de sodio, por la técnica de extrusión. Se determinó el diámetro, esfericidad y propiedades de textura de las gotas y a la sobrevivencia de *L. casei* atrapada adicionada a yogurt y las condiciones gastrointestinales simuladas. La eficiencia de *L. casei* atrapada y su diámetro aumento con el incremento de la concentración total de biopolímeros. Análisis de componentes principales mostraron que la viabilidad de *L. casei* en yogurt y en jugos gástricos simulados, fue positivamente correlacionado con el diámetro y las propiedades de textura de las gotas, mientras que la viabilidad en jugos gástricos y sales biliares fue relacionado con la forma de las gotas.

Dureja y col. (2003) reporta la utilización de una mezcla de geles compuesta de alginato, pectina y proteína de suero, para encapsular células de *Bifidobacterium*, en pH gástrico simulados, para determinar su sobrevivencia, libres y encapsuladas. Después de 1 h de incubación en soluciones ácidas (pH 2.5), la cuenta de células libres disminuyó 4.74 Log, comparado con una disminución de < 1 log para células atrapadas. Las células libres no sobrevivieron después de 2 h de incubación a pH 2.5, mientras que las células inmovilizadas disminuyeron solo aproximadamente 2 Log.

Brinques y Záchia (2010), realizó una comparación de *Lactobacillus plantarum* BL011 libre y microencapsulado bajo condiciones de estrés, fue probado en alginato de sodio o pectina, recubiertos con alginato de sodio o quitosano. En medio gástrico simulado, reduce drásticamente la viabilidad. Hubo pérdida en la viabilidad de *L. plantarum* inmovilizada en 3% alginato recubierta con quitosano, en yogurt fue de 0.55 Log durante 38 días de almacenamiento. Los resultados de este estudio sugieren la eficiencia de técnicas de inmovilización para incrementar la viabilidad de *Lactobacillus* en yogurt bajo almacenamiento en refrigeración.

Wen-Chian y col. (2003), *Bifidobacterium longum* B6 y *B. infantis* CCRC14633, fueron microencapsuladas por secado por aspersion, la suspensión de células contenía al microorganismo y 10% (p/p) del materia de soporte, gelatina, almidón soluble, skim milk o goma arábica. Fueron sometidas a jugos gástrico simulados (pH 2 y 3) y a solución de bilis (0.5% y 2%), microorganismo libre y encapsulado. *B. infantis* fue más susceptible que *B. longum* al medio gástrico simulado y solución de bilis. También observó que el efecto protector que ejerce la encapsulación con secado por aspersion es diferente dependiendo del material de soporte utilizado con las cepas de *Bifidobacterium*.

Pimentel-González y col. (2009), encapsularon *Lactobacillus rhamnosus* por medio de una emulsión múltiple, la cual quedo atrapado en la fase acuosa interna de la emulsión W/O/W y utilizó lactosuero dulce concentrado como emulsificante. La viabilidad de *L. rhamnosus* en la emulsión doble fue comparada con células no atrapadas, sometiéndolas a bajo pH y condiciones de sales biliares. La viabilidad de las cepas control disminuyó significativamente a bajo pH y en condiciones de sales biliares, y su supervivencia fue de 71 a 89% respectivamente. Por lo tanto concluyó que las emulsiones dobles protegen a *L. rhamnosus* contra condiciones gastrointestinales simuladas.

4. Objetivo general.

Determinar la sobrevivencia de *L. plantarum* encapsulado en emulsiones múltiples ($W_1/O/W_2$) en procesos térmicos, aplicados en queso regional mexicano (queso Oaxaca), en pruebas de fundido y en condiciones gastrointestinales simuladas.

4.1. Objetivos particulares.

1. Establecer la formulación y la proporción de biopolímeros para obtener emulsiones estables en el tiempo.
2. Determinar la viabilidad de *L. plantarum* encapsulado en condiciones de procesamiento simuladas para determinar la efectividad de la protección sobre el microorganismo encapsulado.
3. Evaluar la sobrevivencia de *L. plantarum* encapsulado en procesos térmicos aplicados en un queso regional mexicano (queso Oaxaca), en pruebas de fundido y en condiciones gastrointestinales simuladas.

5. Hipótesis.

Las emulsiones múltiples al entrapar a *L. plantarum* y ser utilizadas en la elaboración del queso Oaxaca, es capaz de protegerlo contra la temperatura empleada en; 1) el proceso de elaboración del queso; 2) contra la temperatura empleada para su consumo de manera fundido y una vez teniendo el producto terminado éste resista el paso a través del tracto gastrointestinal y llegue en una concentración ≥ 6 Log UFC/g, dando como resultado un producto funcional.

6. Justificación.

En los últimos 20 años ha habido un incremento interesante en el funcionamiento de las bacterias probióticas en la salud humana (Sultana y col., 2000). Se ha encontrado que las bacterias lácticas o probióticas intervienen en la reducción de problemas como intolerancias a la lactosa e incluso están relacionadas con la estimulación del sistema inmunológico.

Una de las vías que se tienen para poner al alcance del consumidor los microorganismos probióticos son los llamados “alimentos probióticos”, que además de ser alimentos, tienen beneficios en la salud del consumidor.

Un alimento que se puede utilizar como vehículo para la aplicación de los microorganismos probióticos son los quesos frescos hilados, que dentro de esta clasificación se encuentra el queso Oaxaca, su consumo es en platillos mexicanos que requieren un tratamiento térmico (Fundido). Sin embargo, existen estudios que muestran que la viabilidad de bacterias lácticas es afectada de manera importante, en el caso del queso lo que afecta en el tratamiento térmico y por la presencia de bilis hepática y acidez durante su paso a través del tracto gastrointestinal y lo cual impide que muchos microorganismos lleguen viables hasta su sitio de acción (el colon) y realicen su labor probiótica.

Como una solución a esta problemática, en el presente trabajo se propone la aplicación de la técnica de encapsular al microorganismo probiótico, como un vehículo que sirva de transporte y brinde protección a dicha bacteria durante su recorrido por el tracto gastrointestinal, y durante la acción de la temperatura sobre el queso Oaxaca. Es necesario que para que estas bacterias tengan un efecto notable en el organismo, deba consumirse frecuentemente, además debe estar en una concentración no menor de 6 Log UFC/g en el queso fresco para que este sea considerado como probiótico y se garantice su efecto probiótico

7. Metodología.

7.1. Establecimiento del experimento.

La parte experimental consistió de tres etapas: (1) Primera etapa, que consistió en el establecimiento de la formulación y el material de pared para obtener cápsulas estables en el tiempo y con control de pH. Ya obtenida la mejor formulación, se prosigue a la (2) Segunda etapa, que consistió en la simulación de condiciones de procesamiento térmico para evaluar la estabilidad de la emulsión, así como la sobrevivencia de las bacterias encapsuladas. Y por último, (3) Tercera etapa, que consistió en la aplicación de la emulsión con probiótico en queso Oaxaca, para evaluar su resistencia del probiótico encapsulado contra la temperatura empleada en el proceso de elaboración y en el fundido para su consumo.

La realización de los tratamientos para la tercera etapa de la parte experimental radicó en tomar como testigo el queso Oaxaca tradicional sin adición de emulsión ni probióticos, el segundo tratamiento fue un queso Oaxaca agregando los microorganismos libres, el tercer tratamiento un queso Oaxaca control solo con la emulsión sin la encapsulación de *L. plantarum* y el cuarto tratamiento fue el queso al cual se le agregó al *L. plantarum* Lp 115 encapsulado en la emulsión múltiple.

7.2. Localización del área de estudio.

El presente trabajo se realizó en los laboratorios del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos y en los Laboratorio de Físicoquímica y Aprovechamiento Agroalimentario Integral del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, en Tulancingo, Hidalgo.

7.3. Aguamiel.

Se utilizó aguamiel proveniente del municipio de Singuilucan Hgo., para evitar posibles problemas de crecimiento microbiano, el aguamiel fue transportado inmediatamente en recipientes de cierre hermético al laboratorio y seguido de una congelación para evitar su fermentación.

7.4. Activación y Cinética de crecimiento de *L. plantarum*.

El cultivo liofilizado fue hidratado usando 1 % p/v del inóculo en medio MRS (Difco TM *Lactobacillus* MRS Broth BD, Francia), y fue incubado por 18 h a 37 °C con agitación de 120 rpm y sin control de pH. El cultivo de *L. plantarum* Lp-115 (DANISCO, Flora Fit, Custom Probiotics, Brabrand, Dinamarca) fue transferido dos veces más (37 °C por 18 h) en medio MRS usando 1 % v/v de inóculo para activación y adaptación. El cultivo activado, fue inoculado 1 % v/v en 18 mL de medio MRS para la realización de la curva de crecimiento, para observar los parámetros cinéticos y encontrar el final de la fase logarítmica para su crecimiento y realización del entrapamiento de la bacteria en fase de crecimiento (Pimentel-González y col., 2009).

El conjunto de datos experimentales para el crecimiento de *L. plantarum*, se ajustan al modelo de Gompertz (Ecuación 7.1), para determinar los parámetros cinéticos utilizando el software Graph Prism 3.02 (Graphpad, software Inc, San Diego, CA).

Ecuación (7.1).

$$Y = \left(N_0 + C \left[\exp \left(\frac{-\exp((2.718 \times \mu_{\text{max}} / C) \times (\text{Lag} - X) + 1))}{1 + \exp((2.718 \times \mu_{\text{max}} / C) \times (\text{Lag} - X) + 1))} \right) \right] \right)$$

Donde:

N0: Número inicial en log de células

C: Diferencia entre el número de células inicial y final

Lag: Tiempo de latencia

Mue: Máxima velocidad específica de crecimiento

X: Tiempo

Y: Log de células.

7.5. Primera etapa.

7.5.1. Establecimiento de la formulación y el material de pared para obtener cápsulas estables en el tiempo con control de pH.

Las células de *L. plantarum* crecidas en MRS, fueron removidas y centrifugadas en la fase logarítmica tardía a 15,800 g por 10 min usando una centrifuga minispin plus (Eppendorf Centrifuge type 22331, Eppendorf AG, Hamburg, Alemania) (Pimentel-González y col., 2009). El sobrenadante fue retirado y las bacterias fueron re-suspendidas en 30mL de Aguamiel (Ag), Suero de Leche (SdL) o una mezcla 1:1 de Ag+SdL.

Las emulsiones dobles fueron preparadas a temperatura ambiente (22 ± 2 °C) por el método de las dos etapas (Pimentel-González y col., 2009). En la primera etapa, una emulsión agua en aceite (W_1/O) fue preparada incorporando una fase acuosa (W_1) (70 g) constituida por aguamiel (Ag), suero de leche (SdL) y una mezcla 1:1 de ambos, como se puede ver en la figura 7.1, conteniendo aproximadamente 10.5 ± 0.23 Log UFC/mL de *L. plantarum* Lp-115, en una fase oleosa (O) (30 g), conteniendo aceite de canola (Capullo[®], Unilever de México, S.A. de C.V., Tultitlan Edo. de México, México) con una concentración total de emulsificantes de 8 % p/p. El emulsificante hidrofílico usado fue Panodam SDK (ésteres de monoglicéridos y diglicéridos de ácido diacetil tartárico) y el emulsificante hidrofóbico fue Grindsted PGRR 90 (ésteres de ácidos grasos de poliglicerol y poliricinoleato), ambos distribuidos por Danisco México, S. A. de C. V.

El proceso de emulsificación se llevó a cabo con un homogenizador Virtis 220 (Virtis Company, Gardiner, NY, EUA) a 9000 rpm durante 5 min.

Cuadro 7.1. Formulación de emulsión con diferentes fases acuosas internas y externas.

	Fase acuosa interna (W₁)	Fase acuosa externa (W₂)
1	Aguamiel	Suero de Leche 14%
2	<i>Aguamiel</i>	<i>Goma de Mezquite 20%</i>
3	Aguamiel	SdL 10% y GM 10%
4	Suero de Leche 7%	Suero de Leche 14%
5	<i>Suero de Leche 7%</i>	<i>Goma de Mezquite 20%</i>
6	Suero de Leche 7%	SdL 10% y GM 10%
7	Ag y SdL 7 %	Suero de Leche 14%
8	<i>Ag y SdL7%</i>	<i>Goma de Mezquite 20%</i>
9	Ag y SdL 7%	SdL 10% y GM 10%
10	<i>Aguamiel</i>	<i>GA17%, GM66% Y MD17%</i>
11	<i>Suero de Leche 7%</i>	<i>GA17%, GM66% Y MD17%</i>
12	<i>Ag y SdL7%</i>	<i>GA17%, GM66% Y MD17%</i>

En la segunda etapa, 30 mL de la emulsión primaria W₁/O fue re-emulsificada en 70 mL de medio acuoso, probando diferentes biopolímeros; Suero de leche (SdL), Goma de Mezquite (GM), una mezcla 1:1 de suero de leche y goma de mezquite y una mezcla ternaria de Goma de Mezquite (GM) 66 %, Maltodextrina (MD) 17 % y Goma Arábica (GA) 17 % como fase acuosa externa (W₂) usando un homogenizador Virtis a 4500 rpm por 5 min, produciendo emulsiones dobles (W₁/O/W₂) (Rodríguez-Huezo y col., 2007)

7.5.2. Análisis de tamaño de partícula de las emulsiones dobles W₁/O/W₂.

Un microscopio óptico Olympus BX 45 (Olympus Optical Co. Ltd, Tokyo, Japón) y un software analizador de imágenes Image –Pro Plus (versión 4.5, Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, MD, EUA) fueron utilizados para medir la longitud del diámetro medio de: a) glóbulos acuosos de la emulsión primaria W₁/O y b) los glóbulos de aceite de la emulsión doble. Se realizaron diluciones de las muestras

de la emulsión doble realizadas, se colocaron en un portaobjeto para su observación al microscopio. Se determinó el diámetro de 30 glóbulos seleccionados aleatoriamente para determinar la medida de los diámetros de la emulsión primaria y doble inmediatamente después de su realización y subsecuentemente en un periodo de tiempo de 1, 3, 6, 9 12 y 15 días.

Una vez realizada la emulsión múltiple ($W_1/O/W_2$), se realizó un análisis morfológico calculando el diámetro de los glóbulos internos y externos a través del tiempo con las ecuaciones 7.2 y 7.3 respectivamente por medio del sistema analizador de imágenes arriba descrito (Sherman, 1968).

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2}$$

Diámetro volumétrico superficial medio (Ecuación 7.2)

$$D_{4,3} = \sqrt[3]{\frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i}}$$

Diámetro volumétrico medio (Ecuación 7.3)

Donde n_i es la gota i , y d_i es el diámetro de la gota i .

Los diámetros de los glóbulos de la emulsión primaria o de los glóbulos internos de la emulsión múltiple se calcularon con el diámetro volumétrico superficial ($D_{3,2}$) debido a que está relacionado con el área superficial de los glóbulos expuestos a la fase continua por unidad de volumen de la emulsión (ecuación 2); y los glóbulos externos de la emulsión múltiple se calcularon con el diámetro volumétrico medio ($D_{4,3}$) que indica el número de glóbulos por unidad de volumen de la emulsión (ecuación 3). Estos dos parámetros se utilizan debido a que las emulsiones obtenidas son polidispersas, esto es, que presentaron glóbulos de tamaño variado y por lo tanto, los resultados se deben expresar en términos de diámetro medio volumétrico superficial ($D_{3,2}$) y volumétrico ($D_{4,3}$) de los glóbulos, los cuales fueron utilizados como variables de respuestas en los experimentos (McClements, 1999).

Con estos cálculos, se determinaron las cinéticas de coalescencia de los glóbulos de las emulsiones primarias y múltiples (ecuaciones 7.4, 7.5, 7.6) como

parámetro para evaluar su estabilidad en el tiempo (v. gr. 1×10^{-3} inestable, 1×10^{-7} estable, 1×10^{-12} súper estable) (Sherman, 1968).

$$N_t = \frac{6 \phi * 10^{12}}{\pi (D_m)^3} \quad (\text{Ecuación 7.4})$$

$$N_t = N_0 \exp^{-Ct} \quad (\text{Ecuación 7.5})$$

$$\ln N_t = \ln N_0 - Ct \quad (\text{Ecuación 7.6})$$

Donde ϕ es la fracción de la fase dispersa volumétrica; N_t , es el número de glóbulos/cm³ después del tiempo t ; 10^{12} es un factor de conversión de cm³ a μm^3 ; D_m es el diámetro medio del glóbulo ya sea $D_{3,2}$ o $D_{4,3}$; N_0 , es el número original de glóbulos por unidad de volumen; y C_t la velocidad de coalescencia de los glóbulos de la emulsión. Con las ecuaciones 5 y 6, se obtuvo el valor de C_t (s^{-1}) graficando $\ln N_t$ contra t .

Con los diámetros calculados de los glóbulos internos y externos de las emulsiones múltiples, se determinó como otro parámetro de estabilidad de la emulsión múltiple en el tiempo, la relación $D_{3,2}/D_{4,3}$ obteniendo diversos valores ubicándolos dentro de los rangos mostrados en el cuadro 7.2, y este parámetro indicó el tipo de estabilidad correspondiente a la emulsión formulada, si la relación tiende a cero y se mantiene constante en el tiempo, la emulsión es altamente estable, ya que indica que el área superficial de las gotas internas en relación al tamaño volumétrico de las gotas externas se mantiene constante a través del tiempo (Sosa-Fragoso, 2004).

Cuadro 7.2. Valores de los rangos de la relación $D_{3,2}/D_{4,3}$ que indican el tipo de estabilidad en una emulsión.

Estabilidad	Relación $D_{3,2}/D_{4,3}$
Baja	1 – 0.5
Intermedia	0.49 – 0.35
Alta	0.34 – 0

Ya que se obtuvieron emulsiones que fueran estables en el tiempo, se eligió la mejor formulación para encapsular a *L. plantarum*. Las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$ conteniendo las células atrapadas fueron centrifugadas a 15,800 x g por 10 min. Bajo estas condiciones, las emulsiones dobles son rotas y las células atrapadas son liberadas. El número de células viables fue determinado de acuerdo al método estándar en placa. Muestras de 1mL de emulsiones rotas fueron suspendidas en 9mL de amortiguador de fosfatos 0.05 M, y 50 μ L de las muestras fueron sembradas en placa con agar MRS y las colonias fueron contadas después de 24hrs de incubación a 37° C.

7.6. Segunda etapa.

7.6.1. Simulación de condiciones de procesamiento térmico para evaluar la estabilidad de la emulsión, así como la sobrevivencia de las bacterias encapsuladas.

Para determinar la termoresistencia de las emulsiones con probiótico atrapado, se colocaron 10mL de las emulsiones en tubos con tapa verticalmente posicionados en baños de agua a una temperatura de 75 °C y se mantuvo la temperatura por tiempos de 10, 15 y 20min. Después del tratamiento térmico, 50 μ L de cada tubo calentado a las diferentes temperaturas y tiempos fueron sembradas en cajas petri con agar MRS y se incubaron a 37 \pm 2 °C durante 24 h, se reporta el número de colonias supervivientes (León y col., 2006).

7.7. Tercera etapa: Aplicación de la emulsión con probiótico en queso Oaxaca.

La realización de los tratamientos para la tercera etapa de la parte experimental radicó en tomar como testigo el queso Oaxaca tradicional sin adición de emulsión ni probióticos, el segundo tratamiento fue un queso Oaxaca agregando los microorganismos libres, el tercer tratamiento un queso Oaxaca control solo con la emulsión sin la encapsulación de *L. plantarum* y el cuarto tratamiento fue el queso al cual se le agregó al *L. plantarum* Lp 115 encapsulado en la emulsión múltiple.

En la figura 7.1, se presenta el diagrama de flujo para la elaboración del queso Oaxaca por acidificación directa. La leche utilizada para la elaboración del queso fue pasteurizada, se llegó a un pH de 5.47 ± 0.03 por medio de la incorporación de ácido cítrico 10 % p/v en la leche. Se agregó 33 g de emulsión múltiple por cada litro de leche que fue utilizado. La adición de la emulsión se realizó en el siguiente orden: (1) cloruro de calcio, (2) emulsión múltiple que contenía encapsulado a *L. plantarum* y (3) Cuajo (quimisiona).

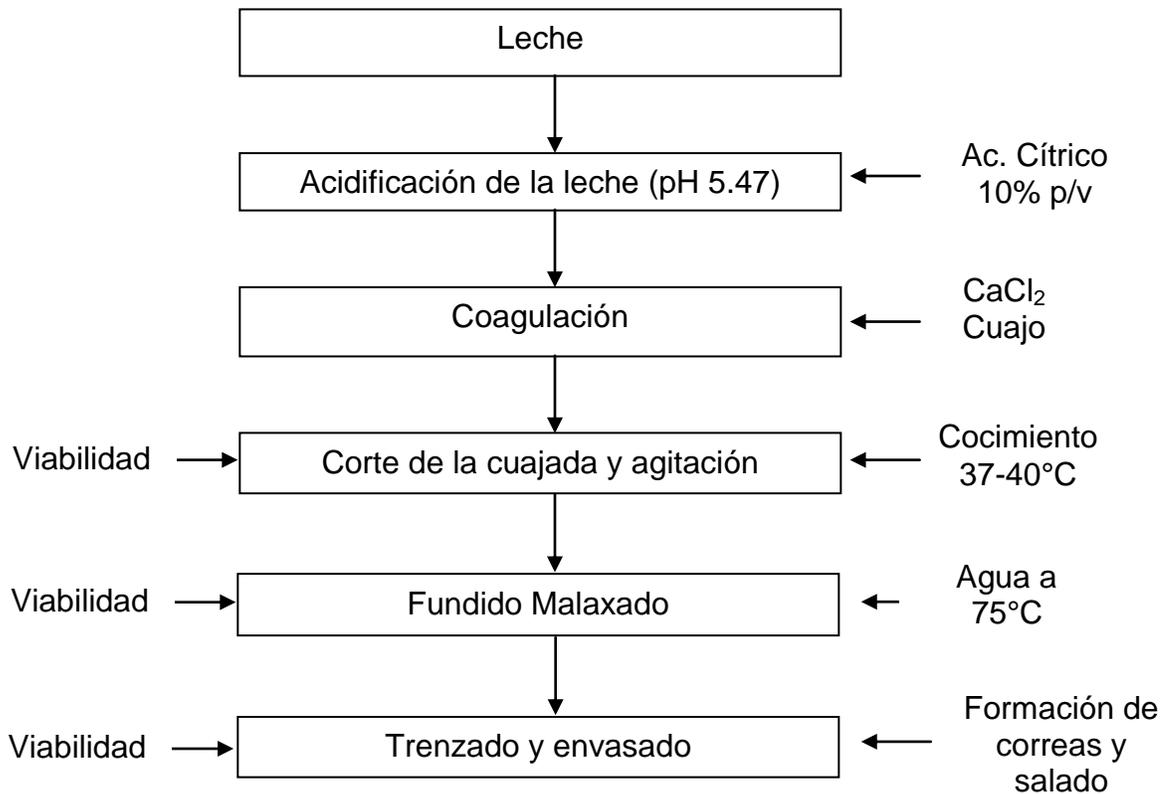


Figura 7.1. Diagrama del proceso de elaboración del queso Oaxaca.

El proceso que caracteriza la elaboración del queso Oaxaca es el “malaxado” o fundido, el cual consiste en la formación de correas. Para el malaxado de la cuajada se usó agua pasteurizada y caliente a 70 – 75 °C. Se ejerció presión manual a la cuajada con ayuda de guantes térmicos hasta formar una masa lisa y homogénea (Cuajada unida). Una vez completado el fundido de la cuajada, se comenzó a tensar los extremos de la pasta fundida hasta formar tiras (correas) de queso con áreas transversales aproximadas a 4 cm x 1,5cm, hasta llegar a obtener la forma característica de un queso Oaxaca, que es en forma de madeja como puede observarse en la figura 7.2 (Franco, 2005).



Figura 7.2. Fotografía del queso Oaxaca, producto terminado.

7.7.1. Viabilidad de *L. plantarum* encapsulado en el proceso de elaboración del queso Oaxaca.

Se determinó la viabilidad del probiótico en los diferentes sistemas que se han propuesto para el queso (Queso con *L. plantarum* libre y Queso con *L. plantarum* encapsulado en emulsión múltiple) en puntos críticos de la elaboración: (1) cuajada, (2) malaxado y (3) y queso terminado como se ve en diagrama de elaboración del queso Oaxaca (figura 12), para el probiótico encapsulado y libre. Se colocaron 10 g de queso en 90 mL de solución fosfato de potasio 0.05 M. Posteriormente se colocó 1 mL de esta dilución en 9 mL de fosfato mono potásico 0.05M. Se realizaron las diluciones correspondientes y posteriormente se sembraron en agar MRS a 37 °C por 24 h para el recuento de BAL, durante 1, 5, 10 y 15 días (Pimentel-González, 2009).

7.7.2. Viabilidad de *L. plantarum* encapsulado en pruebas de fundido en queso Oaxaca.

En un área estéril, se colocaron 10 g de queso Oaxaca que contenía *L. plantarum* Lp-115 libre y encapsulado en la emulsión múltiple, en un recipiente estéril, se colocó a fundir, monitoreando la temperatura de 73 °C por tres minutos. Al haber transcurrido un tiempo de 3 minutos (tiempo en el que se alcanzó el fundido total del queso, sin llegar a que éste se quemara), 25 g de queso fueron colocados en 75 mL de buffer de fosfatos 0.05 M, para lograr la completa homogenización de la muestra. Posteriormente se colocó 1 mL de esta dilución en 9 mL de fosfato mono potásico 0.05 M. Se realizaron las diluciones correspondientes y posteriormente se sembraron en agar MRS a 37 °C por 24 h para el recuento de BAL.

7.7.3. Determinación de tolerancia de *L. plantarum* en acidez y sales biliares en emulsiones entrapadas en el queso Oaxaca, después del proceso de fundido.

En este estudio, la tolerancia a la acidez y a las sales biliares fue estudiada por separado. Para determinar la tolerancia a ácido de *L. plantarum*, 1 g de queso que contenía a *L. plantarum* encapsulado y 1 g del queso que contenía a *L. plantarum* libre fueron inoculadas por separado en 9 mL de una solución de amortiguador de fosfato de sodio 0.05 M ajustado a pH de 2.3 con HCl 0.1 N. Las muestras fueron incubadas en la solución preparada de pH 2.3 a 37 °C por 2 h (Pimentel-González y col., 2009).

Para evaluar la tolerancia a sales biliares de *L. plantarum*, 1 g de queso que contenía a *L. plantarum* encapsulado y 1 g del queso que contenía a *L. plantarum* libre fueron inoculadas por separado en 9 ml de medio MRS fresco conteniendo 0.3 % p/v de sales biliares, compuesto de 50% de colato de sodio y 50% de deoxicolato de sodio. Las muestras fueron incubadas a 37 °C por 24 h.

Pimentel-González y col. (2009), menciona que los microorganismos probióticos deben soportar concentraciones de 0.3% de sales biliares durante 24 h, pues éste es el tiempo que tardará en estar presente en el intestino delgado y realizar sus funciones fisiológicas. La cepa puede ser considerada tolerante a bilis a una concentración de 0.3 % ya que ésta es considerada fisiológicamente relevante.

7.7.4. Análisis fisicoquímicos.

Los análisis que se realizaron para evaluar la composición química de los quesos son: pH, materia grasa, humedad, proteína y cenizas. Las determinaciones se realizaron los días 1, 5, 10 y 15.

7.7.4.1. Determinación de pH.

En un vaso de precipitados se mezclaron 10 grs. de queso molido y 50 mL de agua destilada. El pH de la mezcla se determinó con un potenciómetro previamente calibrado. Las determinaciones se hicieron por triplicado (AOAC, 1997).

7.7.4.2. Determinación de materia grasa por el método de Gerber.

Se colocó en un butirómetro Gerber para queso, 3 g de queso finamente picado, posteriormente se colocó ácido sulfúrico con una densidad de 1.522 g/mL hasta que cubriera completamente la muestra. Se puso a calentar en un baño maría a 65 °C para disolver la muestra, se agitó para asegurar la completa disolución de la muestra de queso, ya que no hay residuos de queso se llenó hasta la marca de 30 a 35 % con ácido sulfúrico y se le agregó 1 mL de alcohol isoamílico.

Se agitó hasta que se mezclaran todos los reactivos. Se centrifugó en una centrifuga para Gerber por 5 min. Se colocó en baño María para obtener una lectura más exacta del contenido de grasa en el queso (AOAC, 2004).

7.7.4.3. Determinación de proteína.

La determinación de proteína se realizó valorando el nitrógeno total mediante el método micro-Kjendahl y multiplicando el resultado por el factor de 6.38, que corresponde a un contenido promedio de nitrógeno en las proteínas de la leche de 15.65%. Para la cuantificación de nitrógeno total se utilizó 0.5gr de muestra, la cual se colocó en un matraz Kjendhal con 15 mL de ácido sulfúrico concentrado y 5 g de mezcla digestora. Las muestras se colocaron en un bloque de digestión hasta su completa digestión. Una vez fríos los tubos, se le adicionó 20 mL de agua destilada, se colocaron en un bloque de destilación, donde se le adiciona hidróxido de sodio al 40% p/v en exceso y se procedió a la destilación. El destilado se recuperó en matraces que contenían 50 mL de ácido bórico al 4% y se tituló con ácido sulfúrico 0.1N en presencia de rojo de metilo como indicador. El contenido de nitrógeno en las muestras se determinó con la ecuación 7 (AOAC, 1997).

Ecuación (7.7)

$$\%N = \frac{(B - C) * D * (0.014) * 100}{A}$$

Donde:

A = peso de la muestra en gramos.

B = Volumen gastado de H₂SO₄ en la muestra (mL)

C = Volumen gastado de H₂SO₄ es el testigo (mL)

D = Normalidad del H₂SO₄ (meq_{nitrógeno}/mL)

7.7.4.4. Determinación de humedad.

El contenido de humedad se determinó por deshidratación de la muestra a 102 °C durante 5.5 h. Se colocó 3 g. de muestra en capsulas de aluminio, previamente llevadas a peso constante. Las muestras se secaron en una estufa. El contenido de humedad se determinó con la ecuación 8 (AOAC, 1975).

Ecuación (7.8)

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(B - (C - A)) * 100}{B}$$

Donde:

A = peso de la cápsula

B = peso de la muestra húmeda

C = peso de la cápsula con muestra seca

7.7.4.5. Determinación de cenizas.

El contenido de cenizas se determinó en muestras incineradas a 550 °C durante 5 h. Se usaron 3 g. de muestra de queso y el porcentaje de cenizas en las muestras se determinó con la ecuación 9. Las determinaciones se realizaron por triplicado (AOAC, 1975).

Ecuación (7.9)

$$\% \text{ Cenizas} = \frac{(C - A) * 100}{B}$$

Donde:

A = Peso del crisol (g)

B = peso de la muestra (g)

C = Peso del crisol con ceniza

7.8. Análisis de textura

La determinación de extensibilidad fue llevada a cabo utilizando un analizador de textura TA.XT2i (Stable Microsystems, Haslemere, UK/Texture Technologies corp., Scarsdale, NY).

Las muestras de queso que se utilizaron, se realizó por medio de la elaboración de tiras de queso, teniendo un longitud de 10 cm cada tira y 0.5 cm de grosor, la prueba fue realizada a los días 0, 3, 5, 10 y 15.

Se utilizó el aditamento que consiste en dos pinzas de retención (Figura 7.3), una pinza se fijó al brazo, la parte móvil del texturómetro, la otra pinza se fija a la plataforma del texturómetro. En todos los casos se utilizó con una velocidad de pre ensayo de 2 mm/s, una velocidad de ensayo de 2 mm/s, con una distancia de 40 mm y una celda de 50 kg. Con los datos obtenidos se determinó la resistencia a la extensión y la extensibilidad.

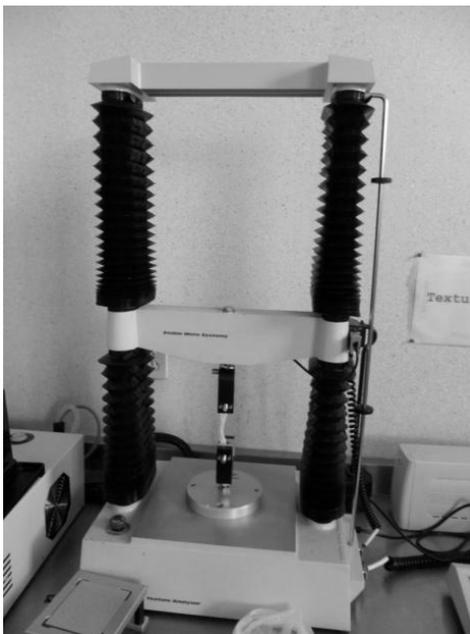


Figura 7.3. Prueba de extensibilidad en queso Oaxaca (Testigo, *L. plantarum* libre, control y *L. plantarum* encapsulado en emulsión múltiple (Texture Analyser, TA.XT2i; A/TG).

El queso se sujeto con las dos pinzas, se sometió a una tensión hasta su rompimiento, se obtuvo un grafico de fuerza contra distancia, con el cual se

determinó la distancia de extensibilidad (desde el punto inicial hasta la fuerza máxima de ruptura) y la fuerza máxima de ruptura (fuerza necesaria que debe aplicarse para provocar la ruptura (Román, 2006).

7.9. Determinación de microestructura del queso Oaxaca.

Se realizó la microscopía electrónica de barrido (SEM) en el queso. Se cortaron pequeños cilindros de queso con un sacabocados y fueron colocados en frascos de vidrio pequeños, con el fin de iniciar el tratamiento con glutaraldehído (Buffer de fosfato 0.1 M, pH 7.2) para fijar las proteínas que contiene el queso, se colocó en la solución de glutaraldehído al 2.5 % hasta cubrir la muestra y se dejó reposar durante 2 h, agitando cada 15 min la muestra. Cumplido el tiempo se cambió el glutaraldehído y se dejó la muestra sumergida en esta solución durante 24 h. Al cumplirse las 24 h la muestra se lavó con solución de fosfatos al 0.1 M, pH 7.2 hasta que desapareció el olor a glutaraldehído, para iniciar el fijado de la grasa con la solución de tetróxido de osmio durante 2 h. Al cumplirse las 2 h la muestra se lavó con solución de fosfatos al 0.1 M, hasta que desapareció indicios del tetróxido de osmio, para iniciar con el secado a través de alcohol a diferentes concentraciones.

El secado con alcohol se inició con una solución de etanol al 30 %, se hicieron dos cambios, cada hora, para todas las concentraciones de alcohol, los siguientes cambios fueron en soluciones de etanol al 30, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 %.

Al estar la muestra en etanol al 100 %, la muestra fue llevada al secador a punto crítico con CO₂. Posteriormente, la muestra se montó en un cilindro metálico, adherida con papel carbón y se llevó al aparato donde se cubrió con una capa fina de oro por 5 minutos para poder ser vista en el microscopio.

En todo el proceso de preparación de la muestra se debe hacer un manejo sumamente cuidadoso, puesto que en caso de manipular la muestra directamente con las manos, podemos dañarla o agregarle grasa, lo que

perjudicara la micrografía y no se verá la estructura real de nuestra muestra (Rodríguez-Huezo y col., 2007).

Un microscopio electrónico de barrido a altas presiones JOEL JMS-5600LV (Joel Ltd., Akishima, Japón), con una aceleración de 20 kV, fue usado para observar las muestras a una magnificación de 500x, 3000x y 13000x.

7.1. Análisis de resultados.

Se utilizó en la primera y segunda etapa un diseño Factorial y en la tercera etapa un Diseño Completamente al Azar con dos repeticiones ($n=2$). Se analizaron los resultados con un análisis de varianza cuando existan diferencias significativas ($P<0.05$), se utilizará una técnica de comparación de medias de Tukey.

8. Resultados y discusiones.

8.1. Cinética de crecimiento de *L. plantarum* Lp. 115.

Para los microorganismos, el crecimiento es la respuesta más inmediata al medio físico. El crecimiento es la replicación y cambio en el tamaño de la célula. Los microorganismos pueden crecer bajo una gran variedad de condiciones físicas, químicas y nutricionales. En un medio ideal, los microorganismos extraen nutrientes del medio y los convierten en compuestos biológicos. Los nutrientes entonces se emplean para la producción de energía, para la biosíntesis y formación de productos. Como resultado la biomasa microbiana aumenta con el tiempo y se puede estimar el tiempo en el cual se alcanza la fase logarítmica tardía, así como el tiempo en el que mueren.

Las especies de *Lactobacillus* se encuentran en el intestino de humanos y otros animales, teniendo una variación de acuerdo a la especie animal, la edad del huésped o la posición dentro del intestino (Vries y col., 2006). Las cepas de *Lactobacillus plantarum* son reconocidas como probióticos, es por eso la importancia de su estudio y el conocimiento de su cinética de crecimiento y para determinar la fase logarítmica tardía, para la cosecha de microorganismo, ya que en esta fase en cuando se encuentra ya adaptado al medio y en reproducción (Komenan y col., 2011). En la figura y cuadro 8.1, se observa la cinética y los parámetros de crecimiento determinada para *L. plantarum*, ajustada según el modelo de Gompertz.

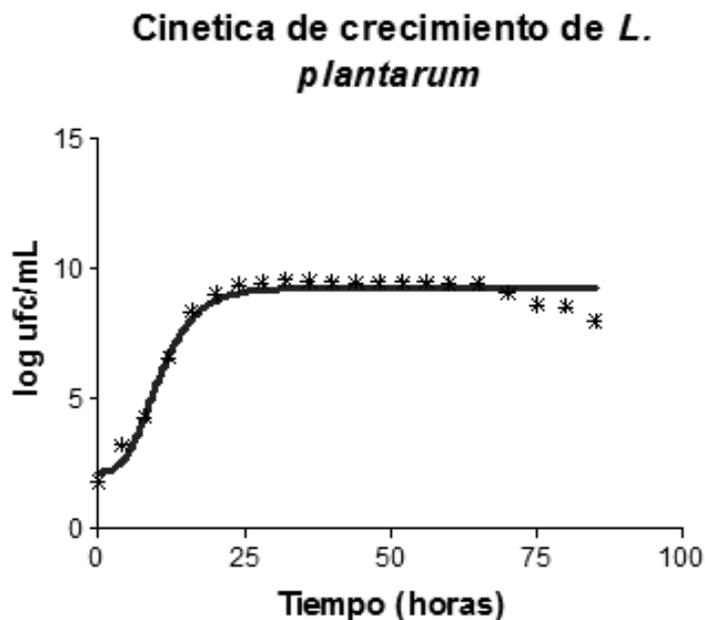


Figura 8.1. Cinética de crecimiento de *L. plantarum* Lp- 115.

Cuadro 8.1. Parámetros estimados y coeficientes de determinación de crecimiento de *L. plantarum* según el modelo de Gompertz.

Parámetro de ajuste	MRS
No (log ufc/mL)	2.139
C (log ufc/mL)	7.102
μ (h^{-1})	0.61
λ (h)	1.467
R^2	0.96

No número inicial de microorganismos; **C** Diferencia entre concentración inicial y final de microorganismos; μ Velocidad específica de crecimiento; λ fase de latencia; R^2 coeficiente de determinación.

De acuerdo a Agudelo y col. (2010), reporta una velocidad específica de crecimiento para *L. plantarum* de 0.53 h^{-1} , la cual es muy similar a la velocidad obtenida (0.61 h^{-1}), al igual que la fase de latencia (1.467 h) la cual es reportada de 1.28 horas para algunas cepas de *L. plantarum*.

8.2. Establecimiento de la formulación y el material de pared para obtener cápsulas estables en el tiempo con control de pH.

Para la obtención de una emulsión que fuera estable en un periodo de tiempo mínimo de 15 días (que es el tiempo de vida de anaquel del queso Oaxaca), se realizaron 12 emulsiones, observadas en el cuadro 7.1, las cuales se ajustaron a un pH de 5.2, que es el pH final del queso Oaxaca, bajo estas condiciones sólo 6 formulaciones fueron estables (Cuadro 8.2) y a ellas se les realizó el análisis de estabilidad en el tiempo.

Cuadro 8.2. Formulación de emulsiones con diferentes fases acuosas internas y externas.

	Fase acuosa interna (W₁)	Fase acuosa externa (W₂)
1	Aguamiel	Goma de Mezquite 20%
2	Suero de Leche 7%	Goma de Mezquite 20%
3	Ag y SdL7%	Goma de Mezquite 20%
4	Aguamiel	GM66%, MD17% y GA17%,
5	Suero de Leche 7%	GM66%, MD17% y GA17%,
6	Ag y SdL7%	GM66%, MD17% y GA17%,

El aguamiel y lactosuero utilizados como medio para contener las bacterias probióticas y ser utilizados en la fase acuosa primaria (W₁) en la elaboración de las emulsiones primarias (W₁/O), fueron pasteurizados a 80 ± 3 °C por 10 min. De acuerdo a Vasbinder y col. (2003), explica que el tratamiento a altas temperaturas (particularmente > 60 °C) induce la desnaturalización y agregación de las proteínas de lactosuero, mejorando su adsorción en la interfase y resultando en la formación de una delgada capa como gel, y en el caso del

aguamiel, el tratamiento fue necesario para eliminar bacterias patógenas que este pudiera presentar (Kiokias y col., 2007).

La fracción de la fase dispersa de las emulsiones formuladas fue de 0.3 debido a que es la fracción más adecuada para que las bacterias tengan una mejor viabilidad (Shima y col., 2006).

Existen tres tipos de emulsiones múltiples (Tipo A, B y C), todas las emulsiones múltiples formadas fueron del tipo C como se puede ver en la figura 8.2, donde la mayoría de las gotas de la emulsión múltiple contienen un número sustancial de gotas internas, con forma esféricas (Gartí, 1997).

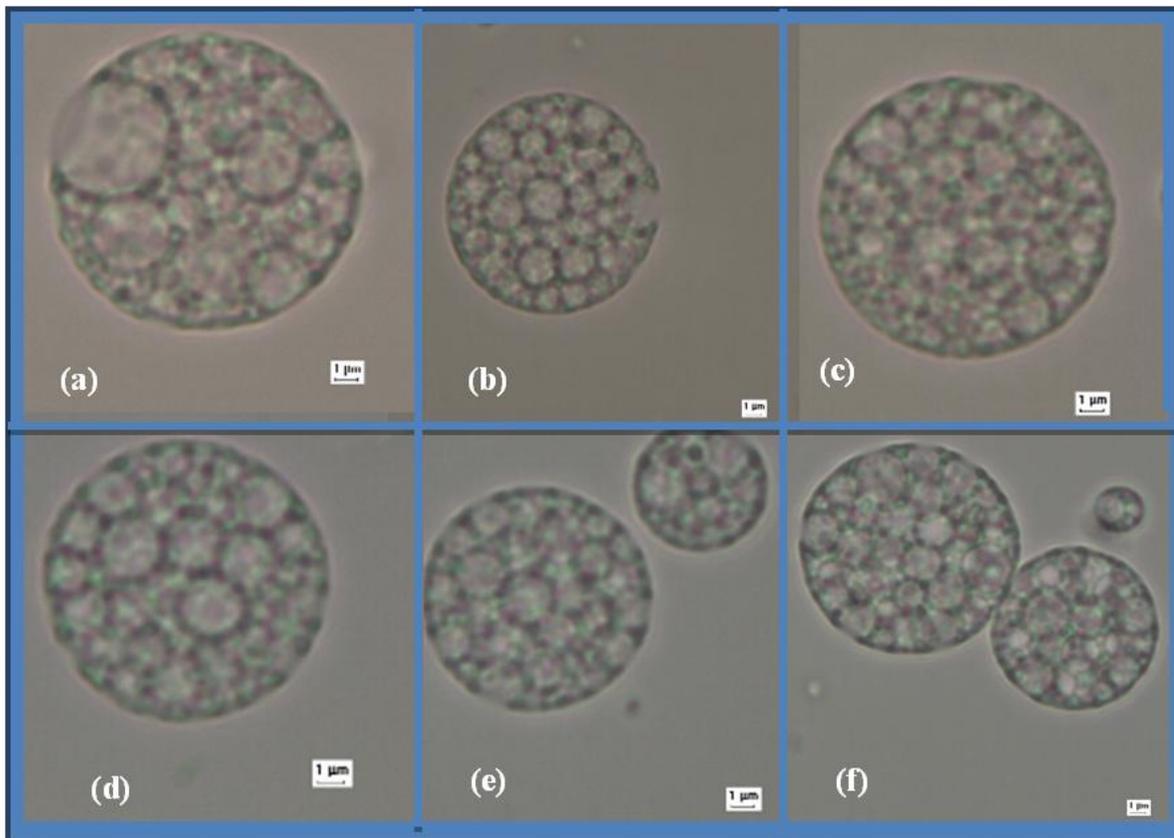


Figura 8.2. Fotografías de gotas de emulsiones dobles agua-en-aceite-en-agua ($W_1/O/W_2$): (a) emulsión $W_{Ag}/O/W_{GM20\%}$, (b) emulsión $W_{Ag+SdL}/O/W_{GM20\%}$, (c) emulsión $W_{SdL7\%}/O/W_{GM20\%}$, (d) emulsión $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$, (e) emulsión $W_{Ag+SdL}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$ y (f) emulsión $W_{SdL7\%}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$, todas tomadas al día 1.

Los diámetros internos medios $(D_{1,0})_{\text{primaria}}$ de las emulsiones primarias recién preparadas mostraron valores pequeños, teniendo una variación de $1.28 \pm 0.30 \mu\text{m}$ para la emulsión $W_{\text{Ag}}/O/W_{\text{GM}20\%}$ y $1.60 \pm 0.39 \mu\text{m}$ para la emulsión $W_{\text{Ag}}/O/W_{\text{GA}17\%+\text{GM}66\%+\text{MD}17\%}$ al día 1 de ser formuladas. Después de 15 días de almacenamiento a temperatura de refrigeración (4°C), como se puede ver en la figura 8.3, el diámetro medio $(D_{1,0})_{\text{primaria}}$ de las emulsiones primarias incrementó significativamente ($P>0.05$) para las 6 formulaciones estudiadas, lo cual indica que hubo un incremento en el tamaño de la gota sin llegar a una separación de las fases (Arranberri y col.,2006).

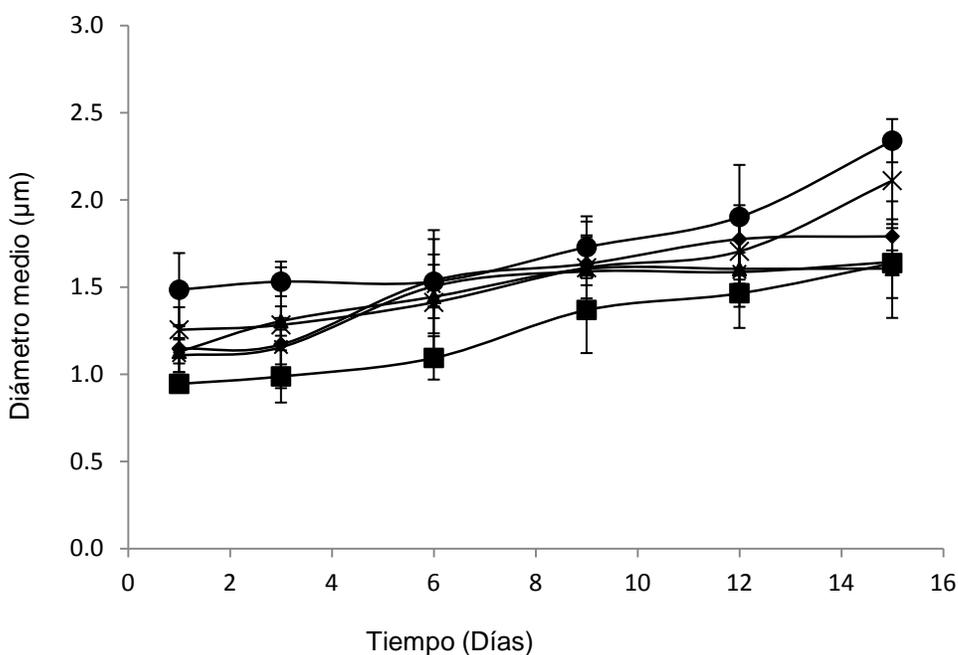


Figura 8.3. Cambio de diámetro medio de las emulsiones primarias: (◆), $W_{\text{Ag}}/O/W_{\text{GM}66\%+\text{MD}17\%+\text{GA}17\%}$; (■), $W_{\text{Ag}}/O/W_{\text{GM}20\%}$; (▲), $W_{\text{Ag}+\text{SdL}}/O/W_{\text{GM}66\%+\text{MD}17\%+\text{GA}17\%}$; (×), $W_{\text{Ag}+\text{SdL}}/O/W_{\text{GM}20\%}$; (*), $W_{\text{SdL}}/O/W_{\text{GM}66\%+\text{MD}17\%+\text{GA}17\%}$ y (●), $W_{\text{Ag}}/O/W_{\text{GM}66\%+\text{MD}17\%+\text{GA}17\%}$.

Jiménez-Alvarado y col. (2009), encapsularon bisglicinato ferroso en la fase interna de una emulsión múltiple agua en aceite en agua. El diámetro de la emulsión primaria recién preparada mostró una variación de 0.8 a $2 \mu\text{m}$, observado un incremento significativo al haber transcurrido 15 días de almacenamiento a temperatura ambiente. Los diámetros de las emulsiones

primarias recién preparadas en este trabajo mostraron valores pequeños y comparables, teniendo una variación de $1.28 \pm 0.30 \mu\text{m}$ para la emulsión $W_{\text{Ag}}/O/W_{\text{GM}20\%}$ y $1.60 \pm 0.39 \mu\text{m}$ para la emulsión $W_{\text{Ag}}/O/W_{\text{GM}66\%+\text{MD}17\%+\text{GA}17\%}$, siendo estables por 15 días, que es el tiempo de vida de anaquel del queso Oaxaca, estos diámetros se encuentran dentro los obtenidos por otros autores que han utilizado esta técnica para la encapsulación de un compuesto bioactivo.

El tamaño del glóbulo inicial de las emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$, está influenciado por la composición y estructura de los biopolímeros utilizado en la composición de la fase acuosa externa (W_2). Las mezclas ternarias de biopolímero afectaron significativamente el diámetro inicial $(D_{1,0})_{\text{doble}}$ de las emulsiones múltiples recién preparadas. La emulsión $W_{\text{Ag}}/O/W_{\text{GM}20\%}$ ($8.14 \pm 0.69 \mu\text{m}$) (Figura 8.4) mostró el diámetro medio $(D_{1,0})_{\text{doble}}$ menor, existiendo diferencia significativa con respecto a las emulsiones $W_{\text{Ag}}/O/W_{\text{GM}66\%+\text{MD}17\%+\text{GA}17\%}$ y $W_{\text{SdL}}/O/W_{\text{GM}66\%+\text{MD}17\%+\text{GA}17\%}$ (con un diámetro medio $(D_{1,0})_{\text{doble}}$ 11.21 ± 0.34 y $10.67 \pm 0.39 \mu\text{m}$, respectivamente), las cuales se consideran las mejores formulaciones para entrapar a *L. plantarum*, la selección de estas emulsiones es debido al desafío que involucra la encapsulación de microorganismos probióticos, debido a su tamaño ($0.9\text{-}1.2 \mu\text{m}$ aproximadamente). Ésta característica limita la encapsulación para la utilización de cápsulas pequeñas, ya que cuando se obtiene diámetros pequeños $<10\mu\text{m}$, pueden causar problemas al momento de encapsular un microorganismo pudiendo ocasionar una disminución en la viabilidad del probiótico a encapsular, o cuando las cápsulas son de gran tamaño producen un efecto negativo en las propiedades de textura de los productos alimenticios en los cuales son agregados (Pimentel-González y col., 2009). Las emulsiones dobles son sistemas notoriamente complejos, los cuales pueden llegar a presentar múltiples mecanismos de inestabilidad, así que son deseables más parámetros cuantitativos para seleccionar la correcta formulación.

Para la elaboración de la emulsión múltiple $W_1/O/W_2$, el uso de biopolímeros como agentes estabilizantes en la fase acuosa externa, mejoran la estabilidad de la emulsión múltiple. Las interacciones proteína-polisacárido juegan

un papel significativo en la estructura y estabilidad de algunos procesos alimentarios, y en el control de interacciones macromoleculares, es un factor importante, en el desarrollo de nuevas formulaciones de emulsiones múltiples. Estos biopolímeros pueden químicamente interactuar a través de enlaces covalentes o físicamente a través de interacciones electrostáticas. Estas interacciones pueden ser atractivas o repulsivas, fuertes o débiles, específicas o no específicas (Jiménez-Alvarado y col., 2009).

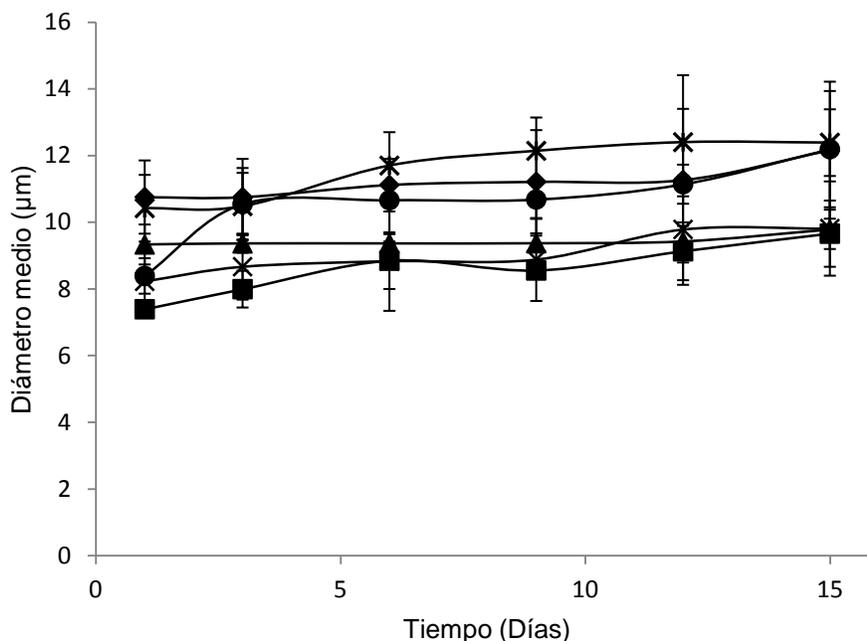


Figura 8.4. Cambio de diámetro medio de las emulsiones múltiples: (◆), $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$; (■), $W_{Ag}/O/W_{GM20\%}$; (▲), $W_{Ag+SdL}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$; (×), $W_{Ag+SdL}/O/W_{GM20\%}$; (*), $W_{SdL}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$ y (●), $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$.

Las emulsiones múltiples que presentan un mejoramiento en la estabilidad y homogeneidad en la distribución de tamaño de la gota, han sido preparadas con la utilización del complejo proteína-polisacárido en la interfase externa aceite-agua. La formación de complejos electrostáticos entre biopolímeros produce una mejor cobertura de la interface, y realiza la estabilización de las emulsiones múltiples contra mecanismos de agregación a través de efectos estéricos. La formación del complejo proteína-polisacárido depende de las

concentraciones entre los biopolímeros. Además estas variables influyen, en el tamaño esperado, la estructura y las propiedades mecánicas de las emulsiones (Vries y col., 2005). En el presente trabajo se utilizó como fase acuosa externa biopolímeros por si solos y mezclas ternarias, de las cuales las emulsiones que permanecieron estables en un periodo de tiempo de 15 días de almacenamiento son y sin presentar diferencia estadística entre ellas son: $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$ y $W_{SdL7\%}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$, sin presentar una separación de fases y microscópicamente no se observó una ruptura de las emulsiones múltiples. Ambas emulsiones fueron seleccionadas para ser utilizadas para encapsular a *L. plantarum* y realizar las pruebas posteriores.

De acuerdo a Shima y col. (2006), encapsularon a *L. acidophilus* en una emulsión múltiple $W_1/O/W_2$, los diámetros obtenidos para esta emulsión fueron en un rango de 11 a 27 μm , demostrando que la emulsión múltiple que tenía un diámetro mayor obtuvo la mayor viabilidad de la bacteria probiótica. Estos resultados sugieren que la viabilidad de la bacteria se ve afectada por el diámetro de la emulsión múltiple, debido a que la concentración fue mayor en la emulsión $W_1/O/W_2$ que tenía un diámetro mayor en las gotas de aceite y las gotas de la emulsión múltiple, afectando la viabilidad de las bacterias encapsuladas, es por esta razón que la selección de la formulación de la emulsión múltiple a considerar para la encapsulación de *L. plantarum*, fue de acuerdo a su estabilidad y al diámetro obtenido de cada formulación.

Pimentel-González y col. (2009), realizaron emulsiones múltiples, utilizando como fase acuosa externa suero de leche y suero de leche, obteniendo que la emulsión donde utiliza el suero de leche concentrado presentó la mejor estabilidad con respecto al tiempo, debido a que la cantidad de sólidos fue la suficiente para lograr la completa saturación de las superficie de las gotas de aceite previniendo la coalescencia de las gotas, ésta emulsión tuvo un pequeño incremento de $8.24 \pm 2.56 \mu\text{m}$ a $10.59 \pm 2.5 \mu\text{m}$ después de 192 h, en comparación son las emulsiones obtenidas en el presente trabajo, para las emulsiones; $W_{Ag}/O/W_{GM20\%+MD17\%+GA17\%}$ incrementó de $10.75 \pm 1.09 \mu\text{m}$ a $12.16 \pm 1.09 \mu\text{m}$ y para la emulsión $W_{SdL}/O/W_{GM20\%+MD17\%+GA17\%}$ de $10.42 \pm 0.90 \mu\text{m}$ a

12.39 ± 1.11 μm, después de 15 días de almacenamiento. Entre los materiales de barrera más utilizados tenemos diferentes biopolímeros como las gomas naturales (goma arábica y goma de mezquite) y maltodextrinas. Sin embargo, no todos los biopolímeros cumplen con todas las características o propiedades, como la estabilidad y durabilidad de la emulsión; por lo que hoy en día es conveniente apoyarnos en efectos sinérgicos que pueden ofrecer mezclas de biopolímeros que puedan proporcionar dichas funcionalidades, es por eso la utilización de una mezcla ternaria en la fase acuosa externa en la elaboración de emulsiones múltiples que ayuden a tener una mayor estabilidad de las emulsiones con respecto al tiempo (Pérez-Alonso y col., 2008). La presencia de biopolímeros como maltodextrina o goma arábica en la fase acuosa es esencial para la formación de una emulsión múltiple (Dickinson, 2011). La goma arábica forma películas fuertes viscoelásticas alrededor de las gotas de aceite que proporciona estabilidad contra la coalescencia de las gotas de aceite a través de fuerzas de repulsión estérica. La goma arábica tiene un peso molecular muy alto de modo que su difusión a la interfase recién formada durante el proceso de emulsificación es relativamente lenta, junto con el hecho de que solo una pequeña fracción de la goma contenida en la fase continua de la goma es adsorbido en la interfase aceite-agua, dando como resultado la formación de gotas relativamente de gran tamaño (Lobato-Calleros y col., 2008). La goma de mezquite a pesar de tener un peso molecular aún mayor al de la goma arábica, se ha reportado como de solubilidad en agua mucho mayor y que en disolución presenta una viscosidad aparente mucho menor que la goma arábica en las mismas concentraciones. Esto es indicativo de que las moléculas de goma de mezquite ocupan un volumen hidrodinámico relativamente menor a la goma arábica, y que se difunde más rápido a la interfase. También se ha reportado que el contenido proteínico de la goma de mezquite es mayor (en porcentaje) que el de la goma arábica comercial, por lo que tiene un mayor número de grupos hidrofóbicos capaces de adsorberse en la interfase aceite-agua y mayor capacidad emulsificante que la goma arábica (Martínez-Escamilla y col., 2002). Es probable que la capa adsorbida en la interfase aceite-agua de las emulsiones múltiples conteniendo en la mezcla

ternaria goma de mezquite sea más gruesa, este espesor de la capa adsorbida parece ser también el principal factor que afecta la estabilidad de la emulsión múltiple contra la coalescencia. Esto es debido a la superficie activa que tienen los biopolímeros, que pueden ser usados como efectivos estabilizadores de la interface de las emulsiones múltiples (Dickinson, 2010). Cuanto mayor es el peso molecular del polisacárido que componen el complejo proteína-polisacárido, mayor es el espesor de la capa adsorbida, y mayores son las fuerzas de repulsión estérica que evitan la coalescencia de las gotas de la emulsión múltiple (Vries y col., 2005; Dickinson, 2010).

Dado que nuestros dos indicadores para la estabilidad de las cápsulas en el tiempo son los diámetros $(D_{1,0})_{\text{primaria}}$ y $(D_{1,0})_{\text{múltiple}}$ y que el diámetro $(D_{1,0})_{\text{primaria}}$ es mucho más pequeño que el diámetro $(D_{1,0})_{\text{múltiple}}$, Pimentel-González y col. (18) propusieron que la relación $[(D_{1,0})_{\text{primaria}}/(D_{1,0})_{\text{múltiple}}]$ da una mejor idea con respecto a la estabilidad global de las emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$ que los parámetros observados individualmente. Propusieron arbitrariamente que las emulsiones múltiples $W_1/O/W_2$, se consideran con un comportamiento estable cuando presentan un valor de la relación $[(D_{1,0})_{\text{primaria}}/(D_{1,0})_{\text{múltiple}}]$ en un rango de 0-0.34; en el rango de 0.35-0.49, un comportamiento poco estable y, en un rango de 0.50-1.00, inestable. Cuando la relación $[(D_{1,0})_{\text{primaria}}/(D_{1,0})_{\text{múltiple}}]$ tiende a cero, y su valor es mantenido en el tiempo, esto significa que la emulsión es altamente estable (Pimentel-González y col. 2009). En la figura 8.5 podemos ver los resultados de la relación $[(D_{1,0})_{\text{primaria}}/(D_{1,0})_{\text{múltiple}}]$, para las seis formulaciones seleccionadas. Se puede ver que todas las formulaciones se encuentran dentro del rango de 0-0,34, encontrándose dentro del rango establecido para ser consideradas como estables.

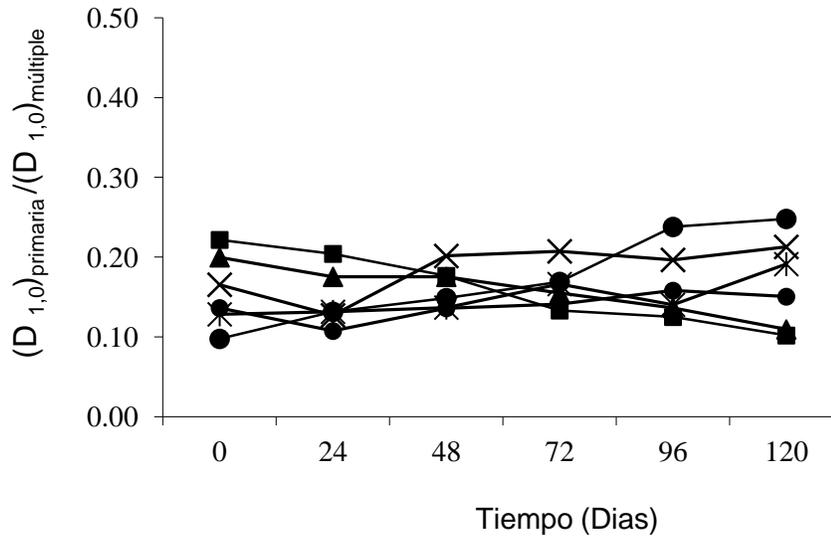


Figura 8.5. Resultados de la relación $[(D_{1,0})_{primaria} / (D_{1,0})_{múltiple}]$, para las seis formulaciones realizadas. Donde: (◆), $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$; (■), $W_{Ag}/O/W_{GM20\%}$; (▲), $W_{Ag+SdL}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$; (×), $W_{Ag+SdL}/O/W_{GM20\%}$; (*), $W_{SdL}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$ y (●), $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$.

En el cuadro 8.3 se muestran los valores obtenidos para las cinéticas de coalescencia de los glóbulos de las seis formulaciones de emulsiones estudiadas, entre ellas no se encontró una diferencia significativa. De acuerdo a Sherma (1968), establece que en emulsiones donde se obtienen valores de la cinética de coalescencia de 1×10^{-3} son inestables, 1×10^{-7} son estables y 1×10^{-12} son súper estables. Las cinéticas de coalescencia de las seis formulaciones se encuentran dentro del parámetro de estables (1×10^{-7}).

Cuadro 8.3. Cinética de coalescencia de los glóbulos de la emulsión múltiple formada con biopolímeros.

Formulación de emulsiones	Diámetro interno $D_{3,2}$ (s^{-1})	Diámetro Externo $D_{4,3}$ (s^{-1})
$W_{Ag}/O/WG_{A17\%+GM66\%+MD17\%}$	6×10^{-5}	1×10^{-6}
$W_{Ag}/O/WGM_{20\%}$	9×10^{-5}	5×10^{-7}
$W_{Ag+SL}/O/WG_{A17\%+GM66\%+MD17\%}$	6×10^{-5}	4×10^{-7}
$W_{Ag+SdL}/O/W_{GM20\%}$	7×10^{-5}	2×10^{-7}
$W_{SdL7\%}/O/W_{GA17\%+GM66\%+MD17\%}$	7×10^{-5}	4×10^{-7}
$W_{SdL7\%}/O/W_{GM20\%}$	7×10^{-5}	4×10^{-7}

De acuerdo a Jiménez-Alvarado y col. (2009), encapsulo bisglicinato ferroso por medio de emulsiones múltiples, utilizando como fases acuosas externas para estabilizar la emulsión; concentrado de proteína de suero de leche, goma arábica, goma de mezquite y pectina de bajo metoxilo. Las cinéticas de coalescencia de las emulsiones primarias no tuvieron cambios significativos con la utilización de una concentración total de surfactantes del 10%, obteniendo valores que van de 2.52×10^{-7} a $9.52 \times 10^{-7} s^{-1}$ y para la emulsión múltiple estabilizada con Concentrado de proteína de suero y goma de mezquite con velocidad de cinética de coalescencia de $7.09 \times 10^{-7} s^{-1}$. En el presente trabajo las velocidades de coalescencia son similares a lo reportado por Jiménez-Alvarado y col. (2009), indicando que las formulaciones obtenidas, para ambos trabajos, tienen una buena estabilidad contra la coalescencia de las gotas de las emulsiones.

8.3. Simulación de condiciones de procesamiento térmico para evaluar la estabilidad de la emulsión, así como la sobrevivencia de las bacterias encapsuladas.

Antes de aplicar la emulsión en el alimento que deseamos, primero se debe elegir la emulsión que ofrezca la mejor protección al microorganismo probiótico encapsulado contra las condiciones simuladas del proceso de elaboración del queso Oaxaca. Las emulsiones que contenían los microorganismos probióticos encapsulados, fueron sometidas a 75 °C y se mantuvo durante 10, 15 y 20 min. Esta temperatura y tiempos fueron seleccionadas de acuerdo al proceso de elaboración del queso, para obtener en el producto final una concentración viable de *L. plantarum* mínimo de 6 Log UFC/g (Anal y Singh, 2006).

La emulsión múltiple ($W_{SdL}/O/W_{GA17\%+GM66\%+MD17\%}$) que contenía encapsulado *L. plantarum* presentó concentraciones de 8.41 ± 0.25 , 7.34 ± 0.39 y 6.80 ± 0.81 Log UFC/mL, al tiempo de exposición de 10, 15 y 20 min respectivamente, así mismo, la emulsión $W_{Ag}/O/W_{GA17\%+GM66\%+MD17\%}$ obtuvo concentraciones finales de 8.19 ± 0.37 , 7.45 ± 0.42 y 6.93 ± 0.46 Log UFC/mL, al haber sido sometidas a 75 °C por tiempo de exposición de 10, 15 y 20 min. (Figura 8.6), no encontrando diferencia significativa entre la protección de la emulsión múltiple con respecto a las dos formulaciones empleadas durante la exposición de éstas a temperaturas elevadas.

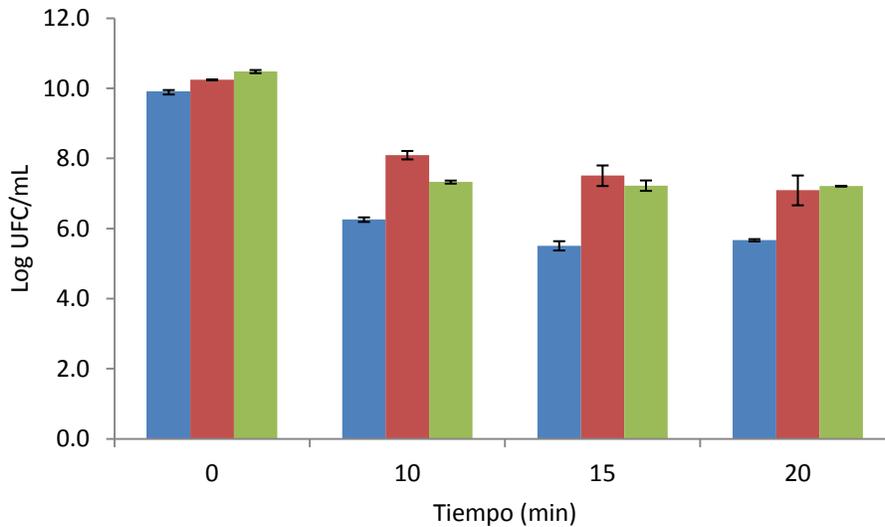


Figura 8.6. Sobrevivencia de *L. plantarum* a 75 °C durante 10, 15 y 20 min de exposición, donde: (■); Libres, (■); $W_{sdl}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$ y (■); $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$

Con respecto al control, *L. plantarum* libre, presentó una concentración de 6 ± 0.49 , 5.07 ± 0.91 y 4.36 ± 0.28 Log UFC/mL, sometidos a 75 °C por 10, 15 y 20 min respectivamente, obteniendo al final estadísticamente una concentración menor de microorganismos probióticos en relación con el probiótico que fue encapsulado, como puede verse en la figura 8.6. Podemos observar que cuando se aplica un tratamiento térmico a una temperatura de 75 °C por un tiempo de 15 min se obtienen concentraciones inferiores a 6 Log UFC/mL para *L. plantarum* libre, lo recomendado para ser considerados y aplicados a un alimento probiótico (Anal y Singh, 2007). La emulsión que se seleccionó para ser aplicada en la elaboración del queso Oaxaca, es la emulsión $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$, debido a que en su formulación se incluye la utilización de aguamiel, según Rodríguez-Huezo y col. (2007), el aguamiel actúa como termoprotector, aunque en este trabajo no hubo diferencia con la emulsión adicionada con suero de leche, se seleccionó debido a que es un recurso que es abundante en el estado de Hidalgo.

Rodríguez–Huezo y col. (2007) encapsularon a *B. bifidum* utilizando la técnica de secado por aspersion, utilizando aguamiel como un prebiótico termoprotector. La mayor viabilidad se obtuvo cuando las mezclas de coloides protectores se añadieron con aguamiel, lo que sugiere que este prebiótico tuvo un efecto positivo probablemente debido a que actuó como termoprotector para las células que experimentan el procesos de secado. La viabilidad de las células mostró una disminución cuando los polvos secados no contenían aguamiel. Cualquiera que sea el mecanismo por el cual el aguamiel afecta la viabilidad de las células, está claro que se produce un efecto simbiótico por la bacteria probiótica, que proporciona al microorganismo una mayor resistencia a los factores ambientales. En las emulsiones donde se utilizó aguamiel como fase acuosa primaria $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$, la concentración de *L. plantarum* fue de 8.26 ± 1.46 Log UFC/mL a una temperatura de 75°C y para la emulsión que no lo contenía $W_{SdL}/O/W_{GA17\%+GM66\%+MD17\%}$ fue de 7.82 ± 1.81 Log UFC/mL, no se vio afectada estadísticamente la viabilidad de *L. plantarum* entre la utilización o no de aguamiel, el suplemento de éste no funcionó en este caso como agente prebiótico termoprotector de las bacterias probióticas, siendo la emulsión la única barrera contra el efecto de la temperatura que pudiera ocasionar en el probiótico.

León y col. (2006), aislaron 8 cepas de salchichas comerciales, las cuales fueron sometidas a pruebas de termorresistencia en baño de agua a 50, 60 y 70° C durante un tiempo de 30-60 min. Cuatro cepas sobrevivieron a los tratamientos y fueron previamente identificados como *L. alimentarius*, *L. lactis*, *L. piscícola* y *Enterococcus*, teniendo conteos mayores a $2.47 \pm$ Log UFC/mL después de ser sometidas a las temperaturas y tiempos establecidos. Estas cuatro cepas fueron inoculadas en salchichas para estudiar su efecto sobre la aceptación de éste producto. Podemos observar que *L. plantarum* encapsulado en las dos formulaciones, emulsión $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$ 8.26 ± 1.46 Log UFC/mL y emulsión $W_{SdL}/O/W_{GA17\%+GM66\%+MD17\%}$ fue de 7.82 ± 1.81 Log UFC/mL, mostraron concentraciones mayores a 2.47 Log UFC/mL, sobreviviendo a temperaturas similares a las en lo reportado por León y col. (2006), observado que la encapsulación de *L. plantarum* en emulsiones múltiples, la protege contra los

factores de estrés que puede sufrir la bacteria, como es el caso de la exposición a temperaturas elevadas.

8.4. Aplicación de la emulsión con probiótico en queso Oaxaca.

8.4.1. Viabilidad de *L. plantarum* encapsulado en el proceso de elaboración del queso Oaxaca.

Debido al proceso de elaboración, un queso fresco es idealmente adecuado para que este sirva como portador de bacterias probióticas. Una razón, es que el queso fresco, es aquel que no necesita maduración, por lo tanto su almacenamiento es a temperaturas de refrigeración y en periodos no prolongados (Buriti y col., 2005). En la elaboración del queso Oaxaca una etapa importante, para lograr que este sea de pasta hilada, es el proceso de malaxado, el cual consiste en someter la pasta (cuajada), a un calentamiento (75 °C) y un trabajo mecánico (por 10 min aproximadamente). En este trabajo de investigación, una emulsión múltiple estable fue elegida en base a los resultados expuestos anteriormente para encapsular a *L. plantarum* y agregarla al queso Oaxaca, esta emulsión fue $W_{Ag}/O/W_{GM20\%+MD17\%+GA17\%}$, con el fin de promover la viabilidad de la bacteria probiótica contra la temperatura empleada (75 °C/10 min) en el proceso de elaboración de éste. *L. plantarum* fue incluido en la fase interna (compuesta por un prebiótico termoprotector como es el aguamiel), la cual, es protegida por la fase de aceite y a la vez recubierta por una fase acuosa final (Shima y col., 2006). La concentración inicial de *L. plantarum* encapsulado para adicionarlo en el proceso de elaboración del queso Oaxaca fue de 10.22 ± 0.53 Log UFC/g, durante el transcurso de elaboración del queso Oaxaca, en el proceso de corte de cuajada y cocción (40 °C por 30 min), se observó una disminución en la viabilidad de *L. plantarum* encapsulado a 9.11 ± 0.45 Log UFC/g, así mismo, durante el proceso de malaxado (a 75 °C por 10 min) realizado a la cuajada del queso Oaxaca la reducción que se presentó en la viabilidad de *L. plantarum* encapsulado fue de 8.35 ± 0.74 Log UFC/g y obteniendo al final del proceso de elaboración del queso Oaxaca una concentración final de 8.15 ± 0.17 Log UFC/g. En el queso Oaxaca que fue elaborado con la adición de *L. plantarum* libre, presentó una concentración

inicial al momento de agregarlo de 10.76 ± 0.41 Log UFC/g, en la cuajada después del proceso de cocción de esta misma fue de 7.89 ± 0.60 Log UFC/g, después del proceso de malaxado de 7.21 ± 0.52 Log UFC/g y presentando el queso final con una concentración final de 6.8 ± 0.08 Log UFC/g, siendo estadísticamente menor que el queso el cual contenía el probiótico encapsulado en la emulsión $W_{Ag}/O_{W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}}$, el cual presenta una concentración mayor al ser sometido al estrés térmico del proceso de elaboración del queso Oaxaca, como puede ver en la figura 8.7.

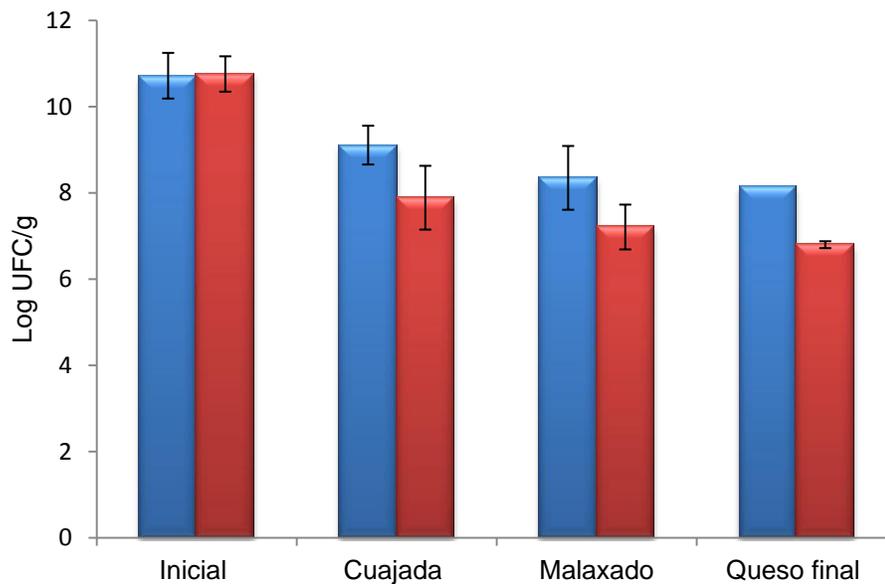


Figura 8.7. Viabilidad de *L. plantarum* a través del proceso de elaboración del queso Oaxaca, en cuajada, malaxado y queso final. Donde: (■), Encapsulados y (■), libres.

Ong (2009), evaluó la sobrevivencia de bacterias probióticas en el proceso de elaboración del queso Cheddar, iniciando con una concentración de 7.15 Log UFC/g, la cuenta de probióticos después del madurado de la leche, permaneció relativamente constante. Durante el cocimiento de la cuajada, la temperatura fue incrementada a 38 °C, el incremento de la temperatura aceleró el metabolismo de la bacteria encerrado dentro de la cuajada observándose un incrementando que va de solo de la mitad a un ciclo logarítmico. Durante el proceso de cheddarización (38 °C, 90 min) las bacterias probióticas sufrieron un

incremento ligero. La cuenta de probióticos en el queso Cheddar permaneció en niveles de 8-9 Log UFC/g al final del proceso de elaboración. Los resultados obtenidos en este trabajo para el queso Oaxaca, la concentración final fue de 8.15 ± 0.17 Log UFC/g para *L. plantarum* encapsulado, obteniendo concentraciones similares a lo reportado por Ong, (2009), con la diferencia que existe entre ambos quesos, es el proceso de elaboración, la temperatura que se emplea para ambos quesos es completamente distinta, en el queso Cheddar su temperatura máxima que alcanza es de 38 °C, temperatura que favorece el crecimiento de las bacterias probióticas, y en el queso Oaxaca, en el proceso de malaxado, la temperatura usada es de 75 °C, con un tiempo de exposición de 10 a 15 minutos o hasta conseguir que la pasta se funda completamente, seguida de un estirado y un baño en agua fría para asegurar que las hebras o correas no pierdan su forma. Esta etapa del proceso es crucial para la sobrevivencia de *L. plantarum*, por los cambios de temperatura, es importante que la emulsión proteja a los microorganismos contra estos cambios. La emulsión que se que se agregó al queso tenía una concentración inicial de *L. plantarum* de 10.22 ± 0.53 Log UFC/mL, teniendo un efecto significativo la temperatura empleada en el procedo de elaboración del queso Oaxaca sobre *L. plantarum* encapsulado en la emulsión $W_{Ag}/O/W_{GM20\%+MD17\%+GA17\%}$, tendiendo una reducción de aproximadamente 2.07 Log.UFC/g (8.15 ± 0.17 Log UFC/g). En cuanto a *L. plantarum* libre que se adicionaron en el queso hubo diferencias significativas con el queso donde se encapsularon los microorganismos, de 10.76 ± 0.41 Log UFC/g hubo una reducción de aprox. 3.97 Log UFC/g (6.80 ± 0.08 Log UFC/g), comprobando que la encapsulación si protege a los microorganismos contra la temperatura de calentamiento en el proceso de elaboración del queso Oaxaca.

Una gran variedad de quesos se les han agregado bacterias probióticas. Rodríguez-Cervantes (2011), aplicó *L. acidophilus* sin encapsular al queso Oaxaca después del proceso de malaxado obteniendo una concentración inicial de 7.20 Log UFC/g, pero solo al haber transcurrido 30 días de almacenamiento se observó que hubo un incremento en la concentración a 8.34 Log UFC/g, incrementando 1 fase Log durante su almacenamiento en refrigeración, en cambio *L. plantarum*

encapsulado tuvo una concentración similar a lo reportado por Rodríguez-Cervantes (2011) de 8.31 ± 0.43 Log UFC/g al día cero y al haber transcurrido 15 días de almacenamiento la concentración final que se obtuvo en el queso fue de 8.93 ± 0.66 Log UFC/g, observándose un incremento menor a 1 Log UFC/g. Gardiner y col. (2002), encapsularon a *L. paracasei* por medio de la técnica de secado por aspersión como ingrediente funcional para incorporar esta cepa como un complemento durante la elaboración del queso Cheddar, obteniendo una concentración final en el queso de 6.60 Log UFC/g, que es menor a la obtenida para el presente trabajo.

Vinderola (2009), incorporó tres bacterias probióticas (*L. acidophilus* A3, *B. bifidum* A1 y *L. paracasei* A13) durante el proceso de elaboración de un queso Argentino, obteniendo concentraciones finales de 7.2 ± 0.1 , 7.3 ± 0.1 y 7.4 ± 0.2 Log UFC/g, respectivamente, los resultados obtenidos demuestran que este queso puede ser otro tipo de matriz alimentaria que permite el crecimiento de ciertas bacterias, pero aún presenta viabilidad menores a las obtenidas para el queso Oaxaca.

Özer y col. (2009), encapsularon *B. bifidum* BB-12 y *L. acidophilus* LA-5, éstos fueron agregados en la elaboración de un queso turco, las técnicas de encapsulación que se ocuparon fueron extrusión en gotas de alginato de sodio obtenido diámetros de 0.1 a 0.3 mm y emulsificación utilizando κ -carragenina como fase acuosa; aceite de maíz como fase oleosa y Tween 80 como emulsificante, el tamaño de las gotas obtenidas por emulsión fue de 0.2 a 0.3 mm. Al día 1 de elaboración, la concentración de *B. bifidum* BB-12 fue de 8.37 Log UFC/g en el queso control, disminuyendo continuamente, esta disminución se atribuye al bajo pH que presenta el queso y alto contenido de sal en el queso final, lo cual limita el crecimiento de cepas probióticas sensibles al ácido y sal cuando se adicionan los probióticos libres. La viabilidad de *B. bifidum* BB-12 encapsulado permanece relativamente constante durante el almacenamiento, teniendo una reducción en la viabilidad de 8.55 y 8.04 Log UFC/g en el encapsulado por extrusión y emulsificación, respectivamente. Para *L. acidophilus* LA-5, al día 1 para las muestras de queso libres, encapsulados por extrusión y por

emulsificación tuvieron concentraciones de 6.69, 9.33 y 8.74 Log UFC/g, respectivamente. Ambas técnicas de microencapsulación fueron eficientes para mantener la viabilidad de bacterias probióticas, para que sean considerados como un producto probiótico funcional, la desventaja que presenta la utilización de la técnica de encapsulación por extrusión, es el tamaño que se obtiene de las cápsulas que son de tamaño milimétrico, las cuales son percibidas por el consumidor, éste problema no se presenta al utilizar la técnica de emulsiones múltiples, ya que los diámetros obtenidos van de 10 a 12 μm , y estas no son percibidas por los consumidores y no pueden ser destruidas al momento de que el alimento es masticado.

La selección de la variedad del queso a utilizar como vector para la adición del probiótico, en la mayoría de los casos no involucra en su elaboración algún tratamiento térmico a la cuajada como es, agitación constante, alta temperatura de cocimiento, adición de sal directa, lavado de la cuajada, entre otros, que pudieran perjudicar la viabilidad en el queso e incrementar la pérdida de las bacterias probióticas en el suero, al observar el proceso de elaboración del queso Oaxaca, involucra la utilización tanto de temperatura elevada y un proceso de amasado, lo cual produce una reducción mayor en la concentración de microorganismos probióticos libres que en los que fueron encapsulados en la emulsión múltiple $W_{Ag}/O/W_{GM20\%+MD17\%+GA17\%}$.

8.4.2. Viabilidad de *L. plantarum* encapsulado en pruebas de fundido en queso Oaxaca.

Ya que se obtuvo un queso con una concentración dentro de lo establecido para considerarse como probiótico ≥ 6 Log UFC/mL, el queso Oaxaca debido a su gran popularidad en México, que es por su excelente aptitud para fundir, y por lo que se consume frecuentemente acompañando los platillos tradicionales de la cocina mexicana, es aquí, otro punto crítico, donde la protección de la emulsión múltiple entra en juego otra vez para proteger al microorganismo probiótico contra la temperatura empleada. El queso con *L.*

plantarum libre y encapsulado se sometieron a pruebas de fundido, donde se alcanzó temperaturas de 73° C, por un tiempo de 3 min. Se observó un efecto significativo entre el queso con *L. plantarum* libre, teniendo una reducción de 4.6 ± 0.34 Log UFC/g a 3.89 ± 0.20 al haber transcurrido un periodo de 15 días de almacenamiento, teniendo un efecto significativo en comparación con el queso en el cual *L. plantarum* fue encapsulado en la emulsión $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$, con una viabilidad de 6.37 ± 0.17 Log UFC/g a 6.49 Log UFC/g, al haber transcurrido 15 días de almacenamiento (Figura 8.8).

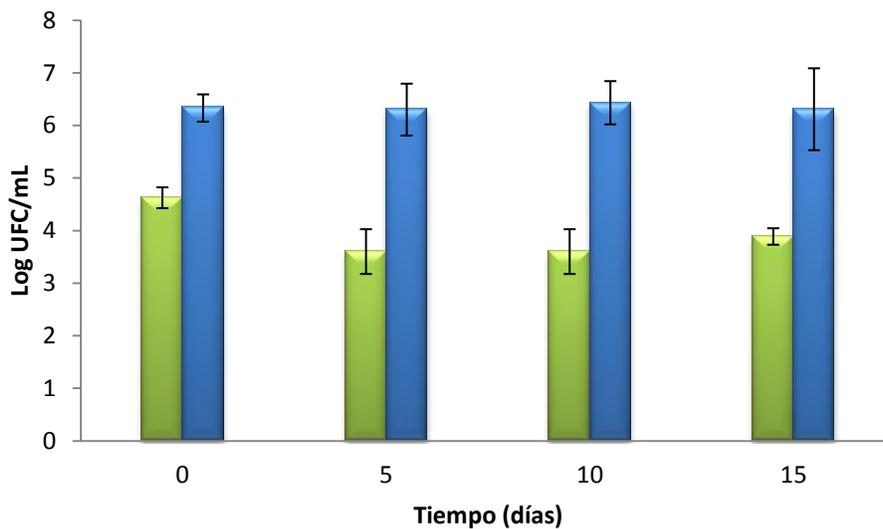


Figura 8.8. Efecto del tiempo de fundido en queso Oaxaca a 73 °C por 3 min. Donde (■); *L. plantarum* libre y (■); *L. plantarum* encapsulado en una emulsión múltiple $W_{Ag}/O/W_{GM20\%+MD17\%+GA17\%}$.

En la selección del tiempo de fundido del queso Oaxaca, a una temperatura de exposición del queso de 73 °C por un tiempo 3 min. fue donde se logró el completo fundido del queso sin que éste se llegue a quemar.

Hasta el momento ninguno de los quesos mencionados anteriormente, a los cuales se ha adicionado un microorganismo probiótico para darle un valor agregado se consume de manera fundida. El queso Oaxaca es de popularidad en México debido a esta característica tan peculiar de fundir. La aplicación de la emulsión múltiple, aparte de proteger a *L. plantarum* durante los procesos de

elaboración del queso Oaxaca, también lo protege durante la temperatura que se emplea para el consumo del queso.

8.4.3. Determinación de tolerancia de *L. plantarum* en acidez y sales biliares en emulsiones múltiples encapsuladas en el queso Oaxaca, después del proceso de fundido.

Cuando se desarrolla un alimento funcional con la adición de bacterias probióticas, es esencial que los probióticos mantengan su viabilidad no solo durante la fabricación y el almacenamiento del producto, sino también durante el tránsito del alimento a través del tracto gastrointestinal, resistiendo la acidez del estómago y las sales biliares del intestino delgado (Bergamini, 2005). De acuerdo a Taranto, (2005), el queso garantiza una adecuada viabilidad de las bacterias durante su periodo de conservación hasta el consumo, y la matriz de caseína protege a las células de los jugos digestivos. Como ya se ha visto anteriormente, aunque después del fundido del queso Oaxaca con *L. plantarum* encapsulado obtenemos concentraciones de 6.37 ± 0.17 Log UFC/g al día 1 de elaboración, lo cual establece el queso Oaxaca como un alimento funcional probiótico (Anal y Singh, 2006). La flora intestinal en el humano guarda una estrecha relación con la salud del hospedero. Es posible manipular la flora intestinal para asegurar los beneficios sobre la salud humana por medio de las bacterias probióticas, las cuales son bacterias viables encapsuladas incorporadas en el queso Oaxaca y deben ser capaces de alcanzar el intestino delgado y colon, en concentraciones adecuadas; es por eso que al queso Oaxaca que contenían a *L. plantarum* libres y encapsulados después del proceso de fundido, se sometieron a pruebas de sales biliares y acidez (Figura 8.9), en cuanto a sales biliares hay efecto significativo entre los microorganismos libres de 4.6 ± 0.34 tuvo una reducción a 3.36 ± 0.44 Log UFC/g, en comparación con el que fue encapsulado que disminuyó de 6.37 ± 0.17 a 6.10 ± 0.11 Log UFC/g, y en condiciones acidas se presentó el mismo comportamiento, obteniéndose la mayor concentración en el queso con el probiótico encapsulado (6.14 ± 0.15 Log UFC/g) en comparación con el libre (3.60 ± 0.43 Log UFC/g). Presentándose las concentraciones adecuadas en el queso,

como es el caso del queso Oaxaca con el probiótico encapsulado (8.31 ± 0.43 Log UFC/g) en la emulsión $W_{Ag}/O/W_{GA17\%+GM66\%+MD17\%}$ y al ser ingeridos utilizando el queso como vector de transporte, se va a obtener como consecuencia de su crecimiento y actividad metabólica, un aporte al hospedero de una serie de beneficios que van desde la disminución de la intolerancia a la lactosa y la disminución en la duración de varios tipos de diarreas, hasta un efecto inmunopromotor y prevención en el desarrollo de cáncer de colon (Escalante, 2001).

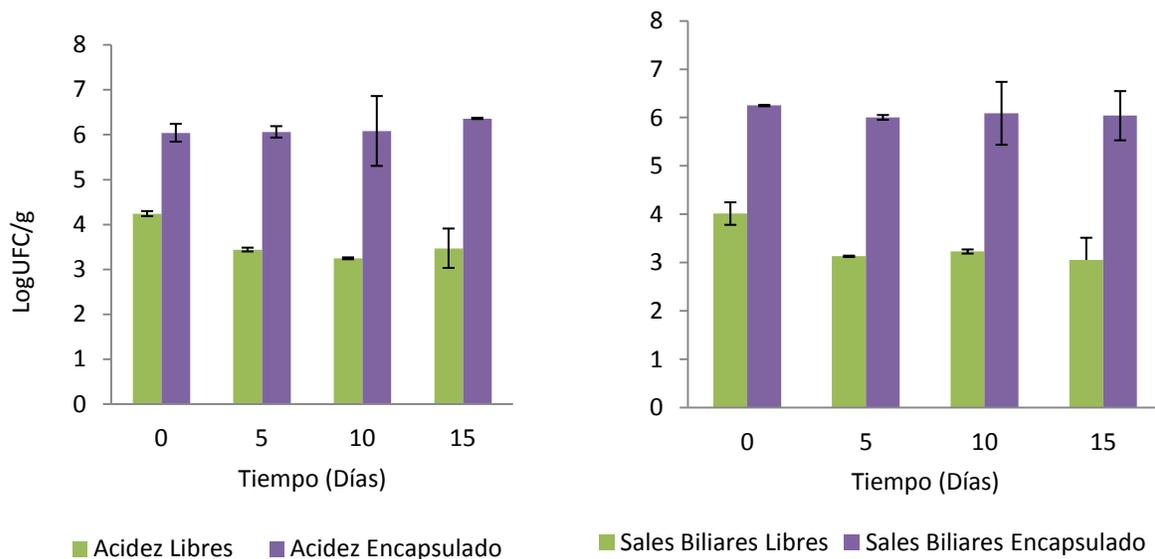


Figura 8.9. Sobrevivencia de *L. plantarum* en acidez pH 2.3 (Izquierda) y en sales biliares (derecha), encapsulada en una emulsión doble $W_{Ag}/O/W_{GA17+GM66+MD17}$ y libre, aplicados en queso Oaxaca y después de ser sometido el queso a un proceso de fundido.

Komenan y col. (2011), encapsuló tres cepas de *L. plantarum* (Lp299v, Lp159 y Lp800). La formación de gotas consistía en un proceso de dos pasos basado en la gelificación de alginato en presencia de una solución de cloruro de calcio y la inmersión de las gotas en una solución de proteínas nativas de suero. Las gotas sin recubrimiento de proteínas en condiciones gastrointestinales simuladas (pH 1.8 a 3 y en sales biliares), mostraron concentraciones de 2.19 ± 0.09 , 1.89 ± 0.09 y 1.65 ± 0.10 log ufc/g. De una cuenta inicial de 10.04 ± 0.01 log

ufc/gr. para Lp299v, 10.12 ± 0.04 para Lp159 y 10.03 ± 0.01 para Lp 800, la concentración microbiológica en las gotas recubiertas de proteínas después de 60 min de exposición fue de 7.76 ± 0.12 , 6.67 ± 0.04 y 5.81 ± 0.25 log ufc/gr. respectivamente. Brush, (2011), encontró una reducción que va de 8.9 a 5.2 Log UFC/mL, de *L. plantarum* encapsulado en gotas de alginato de sodio sometidas a jugos gástricos simulados en un periodo de 120 min. En comparación con este estudio donde se encapsulo a *L. plantarum* en emulsiones múltiples, se obtuvieron concentraciones de bacterias probióticas mayores en condiciones gastrointestinal simuladas, aun después de haber sido sometidas a procesos térmicos, en cotejo con el método utilizado por Komenan y col. (2011).

8.4.4. Análisis fisicoquímicos.

El queso es un sistema complejo, multifacético, multicomponente coloidal, cuya microestructura surge de un balance de las interacciones moleculares cooperativas y competitivas entre sus componentes químicos y da al queso estas propiedades características (Lobato-Calleros y col., 2008). El queso Oaxaca es un queso de gran aprecio para los consumidores de distintos estratos sociales en varios estados del país. Se conoce con otras denominaciones, como quesillo (por ejemplo en Chiapas), queso de hebra y queso de bola. Es un queso fresco, cuya vida de anaquel puede situarse hasta en unas dos semanas, dependiendo del empaque y de las condiciones de conservación en refrigeración (Villega, 2009). Cualquier cambio en la composición dará lugar a diferentes arreglos estructurales y diferentes características de textura (Lobato-Calleros y col., 2008).

El Oaxaca es un queso fresco cuyo contenido de humedad es relativamente elevado, cercano a 50% en peso. En cuanto a su composición bromatológica básica, es difícil fijarla con precisión ya que existen múltiples factores que la afectan, por ejemplo, el grado de descremado de la leche, la acidez original y la maduración de esta, la variación estacional de sus componentes (como de caseína y grasa), entre otros. Estos factores no solamente influyen en la

composición del producto sino también en su rendimiento, el cual se sitúa entre 9 y 10 kilogramos por 100 litros de leche (Villega, 2009).

En el Cuadro 8.4 se observan las propiedades fisicoquímicas obtenidas para las 4 formulaciones de queso. En cuanto al contenido de proteína solo hubo un cambio significativo entre el tratamiento del Queso Oaxaca con microorganismos libres ($20.35 \pm 0.31\%$) y el queso Oaxaca Control (contenía solo la emulsión sin probiótico) ($21.62 \pm 0.31\%$). Los valores obtenidos, de acuerdo a Villegas (2007) y Franco, (2005), las 4 formulaciones del queso Oaxaca se encuentran dentro del rango establecido para quesos de pasta hilada que es de aproximadamente de $21.2 \pm 1.5\%$ en contenido de proteína. El contenido de humedad presentó diferencia significativa entre el queso Oaxaca testigo (elaborado tradicionalmente) ($51.86 \pm 0.31\%$) con respecto a los otros 3 tratamientos (Queso con probiótico libre $49.44 \pm 0.32\%$, queso control $48.97 \pm 0.25\%$ y queso con emulsión con probiótico encapsulado 48.51 ± 0.32), en cuanto al contenido de cenizas no se obtuvo efecto significativo entre los tratamientos de los quesos, teniendo resultados para el queso testigo de $3.32 \pm 0.13\%$, queso con microorganismos libres $2.90 \pm 0.12\%$, queso control $3.04 \pm 0.16\%$ y queso con emulsión con microorganismo $2.98 \pm 0.15\%$. Franco (2005), reporta que el contenido de humedad y cenizas para el queso Oaxaca es de 51.5 ± 3.8 y 3.6 ± 0.4 respectivamente, estando los tratamientos realizados dentro de estos parámetros establecidos por este autor.

Con respecto a la grasa Franco (2005), reporta valores de $21 \pm 3.1\%$ para queso Oaxaca, entre los tratamientos de queso, no hay efecto significativo entre ellos y se encuentran dentro de los valores establecidos para este queso, lo cual nos indica que el aceite que se utilizó para la formulación de las emulsiones no interfiere con el contenido de grasa del queso. En cuanto al pH, el tratamiento de queso con el microorganismo libre y probiótico encapsulado presentaron el pH mayor (5.07 ± 0.13 y 5.12 ± 0.07) en comparación con el queso testigo y el queso control (4.98 ± 0.03 y 4.99 ± 0.05), en comparación con lo reportado por Franco, (2005), este reporto un pH de 5.1 ± 0.3 para el queso Oaxaca, todos los tratamientos se encuentran dentro de lo establecido.

Cuadro 8.4. Composición fisicoquímica de los tratamientos de queso Oaxaca en un periodo de almacenamiento de 15 días.

Día	Tratamiento (Quesos)	% Proteína	% Humedad	% Cenizas	% Grasa	pH
0	Testigo	21.74 ^{abA}	54.42 ^{bC}	2.12 ^{aA}	19.75 ^{aA}	4.93 ^{aA}
	Libres	20.82 ^{aA}	53.63 ^{abC}	1.35 ^{aA}	22.50 ^{abA}	5.29 ^{abA}
	Control	22.22 ^{bA}	51.49 ^{aC}	1.50 ^{aA}	21.00 ^{aA}	4.99 ^{aA}
	Encapsulados	19.83 ^{abA}	51.36 ^{aC}	1.41 ^{aA}	21.00 ^{bA}	5.20 ^{bA}
5	Testigo	20.99 ^{abA}	51.24 ^{bAB}	2.91 ^{aB}	19.00 ^{aA}	5.02 ^{aA}
	Libres	19.43 ^{aA}	48.13 ^{abAB}	3.08 ^{aB}	22.75 ^{abA}	5.02 ^{abA}
	Control	21.96 ^{bA}	48.05 ^{aAB}	2.76 ^{aB}	21.50 ^{aA}	4.98 ^{aA}
	Encapsulados	21.69 ^{abA}	46.35 ^{aAB}	2.53 ^{aB}	20.00 ^{bA}	5.11 ^{bA}
10	Testigo	22.28 ^{abA}	49.45 ^{bA}	5.39 ^{aC}	21.50 ^{aAB}	5.01 ^{aA}
	Libres	20.58 ^{aA}	47.74 ^{abA}	4.55 ^{aC}	22.50 ^{abAB}	4.99 ^{abA}
	Control	21.57 ^{bA}	46.21 ^{aA}	5.48 ^{aC}	22.50 ^{aAB}	5.00 ^{aA}
	Encapsulados	21.02 ^{abA}	45.65 ^{aA}	5.26 ^{aC}	21.50 ^{bAB}	5.10 ^{bA}
15	Testigo	20.12 ^{abA}	52.35 ^{bBC}	2.83 ^{aB}	24.00 ^{aB}	5.03 ^{aA}
	Libres	20.58 ^{aA}	48.26 ^{abBC}	2.64 ^{aB}	21.50 ^{abB}	5.01 ^{abA}
	Control	20.71 ^{bA}	50.13 ^{aBC}	2.41 ^{aB}	24.50 ^{aB}	4.99 ^{aA}
	Encapsulados	20.30 ^{abA}	50.70 ^{aBC}	2.76 ^{aB}	24.50 ^{bB}	5.09 ^{bA}

Testigo; queso elaborado tradicionalmente, Libres; queso con microorganismos libres, Control; queso con emulsión múltiple sin microorganismo encapsulado y Encapsulado; queso con múltiple con microorganismo encapsulado. Superíndice con diferente letra minúscula en la misma columna indican diferencias significativas con respecto al tratamiento. Superíndice con diferente letra mayúscula en la misma columna indican diferencias significativas con respecto a 15 días de almacenamiento.

Ong (2009), agregó 6 tipos de bacterias probióticas, en la elaboración de 6 quesos Cheddar probióticos. El contenido de humedad, sal, grasa y contenido de proteína de los quesos frescos (al día 1) entre los lotes realizados no fueron estadísticamente diferentes. Los resultados encontrados en este estudio, la adición de microorganismos probióticos no afectó las variables principales composicionales del queso Cheddar, durante un periodo de almacenamiento de 24 semanas. Lo cual nos comprueba que aun cuando el probiótico se adicione libre, este no afecta las características fisicoquímicas del queso, tanto para el queso Cheddar como para el queso Oaxaca.

Gardiner y col. (2002), encapsularon a *L. paracasei* por medio de la técnica de secado por aspersion como ingrediente funcional para incorporar esta cepa como un complemento durante la elaboración del queso Cheddar, en donde observaron que la adicción del probiótico encapsulado por secado por aspersion, no afectó las características fisicoquímicas del queso Cheddar.

Özer y col. (2009), encapsularon en una emulsion primaria a *B. bifidum* BB-12 y *L. acidophilus* LA-5 y lo agregaron en un queso blanco en salmuera, donde observaron que la adicción del encapsulado no afectó las propiedades físicas y químicas de los quesos.

Bergamini y col. (2005), agregaron microorganismo probióticos libres a la elaboración de un queso semi-madurado Argentino, donde encontró que los queso controles y experimentales no mostraron diferencias significativas en cuanto al contenido de materia grasa, extracto seco y contenido de proteína para las pruebas donde se utilizaron *L. acidophilus* y *L. paracasei* subsp. *paracasei*. La adicción de un probiótico encapsulado en secado por aspersion así como la adicción de emulsiones múltiples en queso Oaxaca, muestran que la adicción de estas cepas no afecta directamente en la composición de los quesos.

8.4.5. Microestructura y textura del queso Oaxaca.

La textura es una característica importante desde el punto de vista de los consumidores y va a estar determinada por la calidad y funcionalidad de los ingredientes seleccionados para su elaboración (Fagan y col., 2007). El parámetro de extensibilidad en el queso Oaxaca, evalúa la tensión que sufre el queso, simulando el estiramiento o rasgado que sufre durante la manipulación en el consumo, por lo tanto los quesos recién elaborados (queso fresco por ser suave y flexible) requieren de menor fuerza para someterlas a una tensión y provocar con ello un estiramiento, por lo que se obtienen mayores distancias de extensibilidad; en contraste los quesos almacenados (consistencia dura por la pérdida de agua) se vuelven rígidos y menos flexibles, por lo tanto necesitan una

mayor fuerza para provocar un estiramiento y presentan menores distancias de extensibilidad (Román, 2006). En la figura 8.10, se muestran los resultados obtenidos para la extensibilidad en el queso Oaxaca, se observa una diferencia significativa ($P > 0.05$) entre el queso Oaxaca testigo (11.34 ± 0.2 mm), con respecto a los tratamientos de queso Oaxaca con probiótico libre 19.96 ± 0.45 mm, queso Oaxaca control (con emulsión sin probiótico) 20.07 ± 0.8 mm y para el queso Oaxaca que contenía a *L. plantarum* encapsulado en la emulsión múltiple 20.47 ± 0.65 mm, indicando que la adición de la emulsión múltiple y de *L. plantarum* afectó significativamente las características de textura del queso Oaxaca, con respecto al testigo.

Al transcurrir el periodo de tiempo de almacenamiento, se esperaría que los quesos fueran disminuyendo su elasticidad, ya que de acuerdo a Sameh-Awah (2006), menciona que el periodo de almacenamiento aumenta la dureza del queso, el cual va a actuar como un plastificante en la matriz proteica, haciendo menos elástico y más susceptible a la fractura, lo observado con respecto a los tratamientos del queso Oaxaca al transcurrir 15 días de almacenamiento no se observó una disminución en la extensibilidad, manteniéndose constante, pero siempre siendo mayor estadísticamente con respecto al queso Oaxaca testigo, esto podría deberse a la adición de compuestos biopoliméricos (utilizados en la formulación de la emulsión múltiple como: goma de mezquite, goma arábica y maltodextrina) a la matriz proteica del queso incrementa la absorción de agua y evita la pérdida de humedad durante el proceso de almacenamiento con lo que se obtienen quesos suaves y flexibles (Fagan y col., 2007). De acuerdo a Jiménez-Alvarado y col. (2009), la retención de agua y de grasa produce una textura más blanda y con características sensoriales de mayor aceptación.

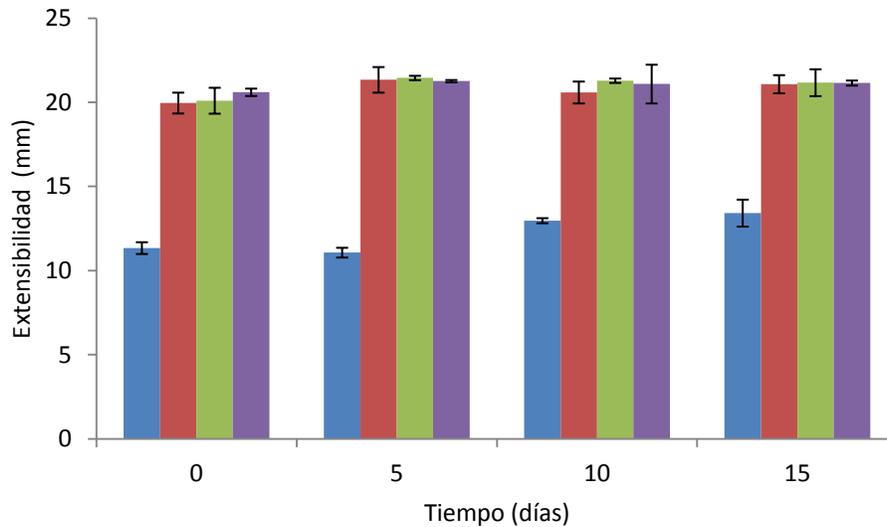


Figura 8.10. Efecto de la adicción de *L. plantarum* encapsulado en una emulsión múltiple sobre la extensibilidad de los quesos, donde: (■); Queso Testigo (elaborado artesanalmente), (■); Queso con *L. plantarum* libre, (■); Queso Control (solo con emulsión sin *L. plantarum*) y (■); Queso con emulsión múltiple con *L. plantarum* encapsulado, almacenado por 15 días.

Zisu y col. (2007), analizaron los cambios que podría tener el queso mozzarella por la producción de exopolisacáridos producidos por *Streptococcus thermophilus*, en lo referente a la prueba de extensibilidad, el queso mozzarella, solo después de 90 días de almacenamiento, observaron una reducción en la extensibilidad, pero este cambio no fue significativo. Los valores obtenidos para este queso mozzarella acidificado con ácido cítrico presentó datos de extensibilidad de 18.25 mm al día 7 y de 18.33 mm al día 14, que es el tiempo aproximado de vida de anaquel del queso Oaxaca. Debido a que el proceso de elaboración del queso mozzarella es similar el proceso de elaboración del queso Oaxaca, (donde uno de los factores más importantes que determinan la estructura y característica del queso, son las propiedades de estiramiento y de fusión), y éste se considera como un queso de pasta hilada, podemos comparar los datos de extensibilidad con éste queso, observando que para el queso Oaxaca se obtienen valores de extensibilidad mayores a lo reportado para el queso mozzarella, debido

a la inclusión de las emulsiones múltiples que alterna la extensibilidad del queso pero no de manera perjudicial.

El queso Oaxaca es caracterizado por tener una textura fibrosa única, excelentes propiedades de fusión, sabor suave y presentación de madeja (Morales-Celaya y col., 2012). La microestructura de los quesos fue monitoreada a los 15 días de haber realizado el queso, para determinar los efectos que podría causar la adición tanto de la emulsión múltiple como de *L. plantarum* libre, en los arreglos de la matriz estructural, como son las estructuras de proteínas y de grasa, las cuales son los responsables de la textura y funcionalidad del queso (Morales-Celaya y col., 2012). Las micrografías electrónicas del queso muestran diferentes disposiciones de arreglos de microestructura de acuerdo al tipo del tratamiento del queso que se estudia (queso testigo, queso con *L. plantarum* libre, queso control y queso con *L. plantarum* encapsulado en la emulsión múltiple usado en su elaboración).

La microestructura del queso Oaxaca testigo (Figura 8.11) consistió de red tridimensional, con una estructura que se caracteriza por presentar hebras de caseína relativamente largas y delgadas que están alineadas a lo largo de la dirección de estiramiento que sufrió el queso. De acuerdo a Morales-Celaya (2012), en micrografías que se realizaron para el queso Oaxaca se observan entre líneas paralelas de las caseínas la producción de canales, en los cuales se contenía al suero de leche y numerosos espacios pequeños de forma predominantemente esférica, los cuales con atribuidos a la grasa de la leche. En la figura 8.11, puede observarse la estructura de un glóbulo de grasa integrado a la matriz proteínica del queso Oaxaca testigo.

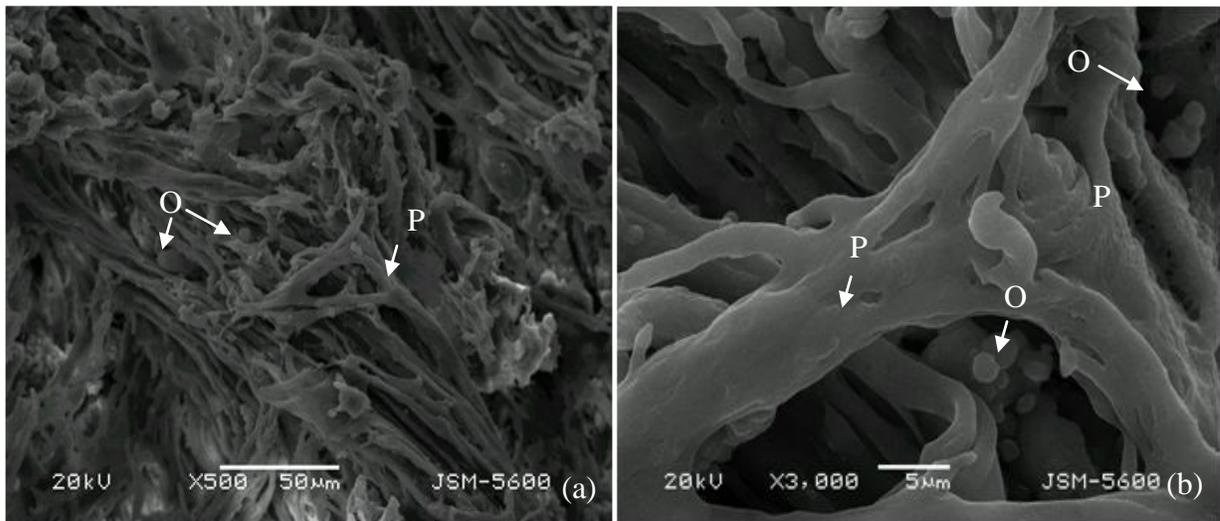


Figura 8.11. Micrografía electrónica de barrido del queso Oaxaca testigo (elaborado tradicionalmente), en la que puede apreciarse la formación de una red tridimensional de las caseínas alineadas a lo largo de la dirección de estiramiento que sufrió el queso Oaxaca en el proceso de malaxado (P); la presencia de un glóbulo graso de grasa láctea (O) embebido en la red de proteína: a) Magnificación 500 x, barra de escala = 50 µm y b) 3 000 x, barra de escala = 5 µm.

La microestructura del queso Oaxaca con *L. plantarum* libre (Figura 8.12) fue distinta a aquella del queso Oaxaca testigo. En la microestructura del queso Oaxaca con *L. plantarum* libre puede observarse a magnificaciones de 500 x y 3 000 x (Figura 8.12), observándose a *L. plantarum* libre entre la matriz proteica de caseína, la matriz proteica a diferencia del queso testigo, éste presentó una estructura tridimensional más estrecha, observándose menos espacio entre las hebras de caseína.

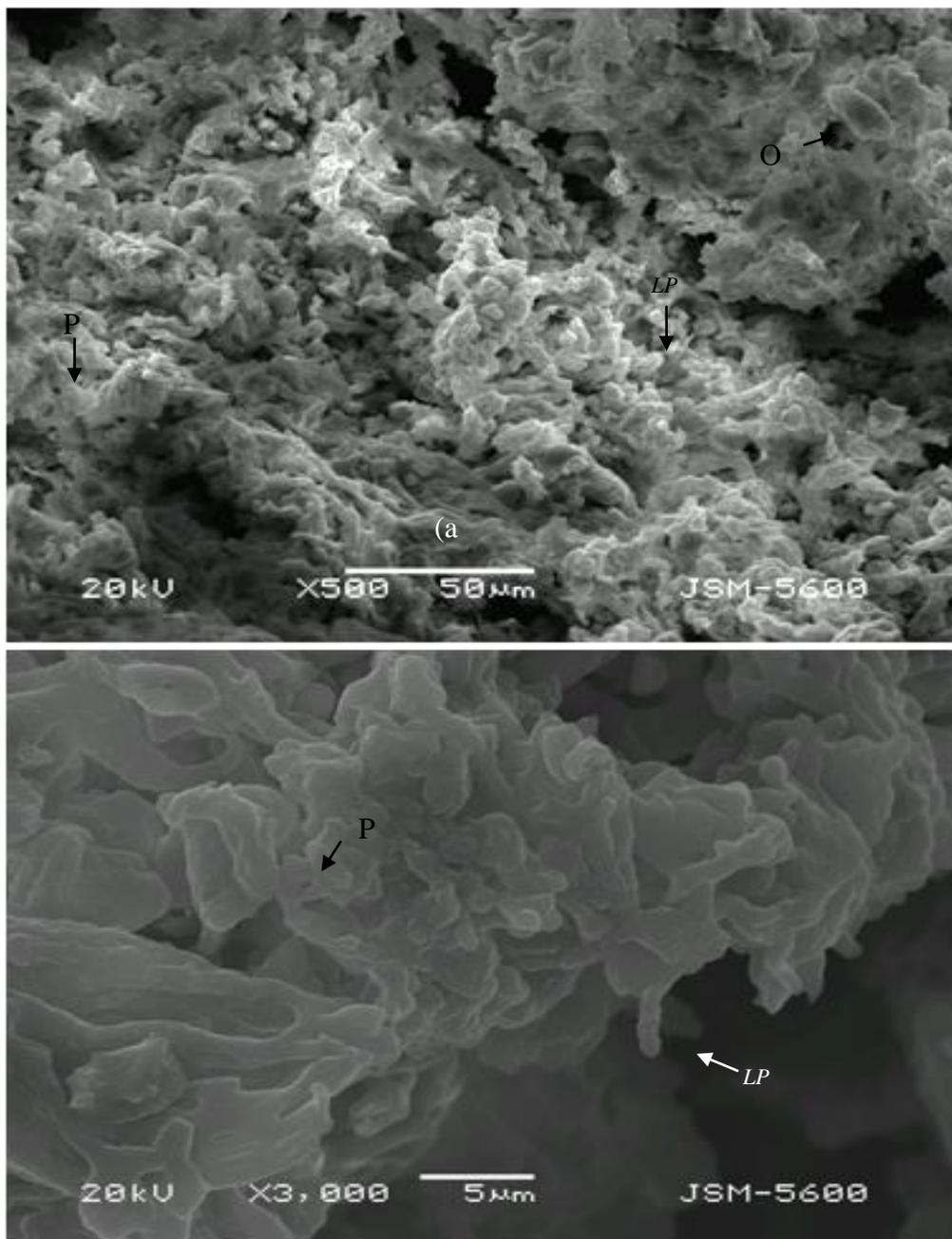


Figura 8.12. Micrografía electrónica de barrido del queso Oaxaca con *L. plantarum* libre, en la que puede apreciarse la formación de una red tridimensional de las caseínas de longitud corta y desordenada (P); la presencia de un glóbulo graso de grasa láctea (O) embebido en la red de proteína, y la presencia de *L. plantarum* (LP): a) Magnificación 500 x, barra de escala = 50 μm y b) 3 000 x, barra de escala = 5 μm.

En la figura 8.13 se aprecian las micrografías del queso control, el cual contenía solo la emulsión múltiple sin *L. plantarum*, presentando al igual que el queso elaborado con *L. plantarum* libre, una estructura tridimensional similar, con las hebras de caseína de longitud corta y desordenadas. Se observa (Figura 8.13) la inclusión de las emulsiones múltiples en la matriz proteínica, este tipo de inclusión de emulsiones es similar a las micrografías obtenidas por Lobato-Calleros y col. (2008), comparando a un queso fresco con una concentración elevada de grasa con respecto a un queso fresco reducido en grasa, esta reducción de grasa se realizó por medio de la sustitución de la materia grasa, por el contenido de grasa presente en una emulsión múltiple, conteniendo como fase acuosa aceite de canola y estabilizada por la adición de carboximetilcelulosa, dando resultado una alteración en el arreglo estructural y de textura para los quesos bajos en grasa.

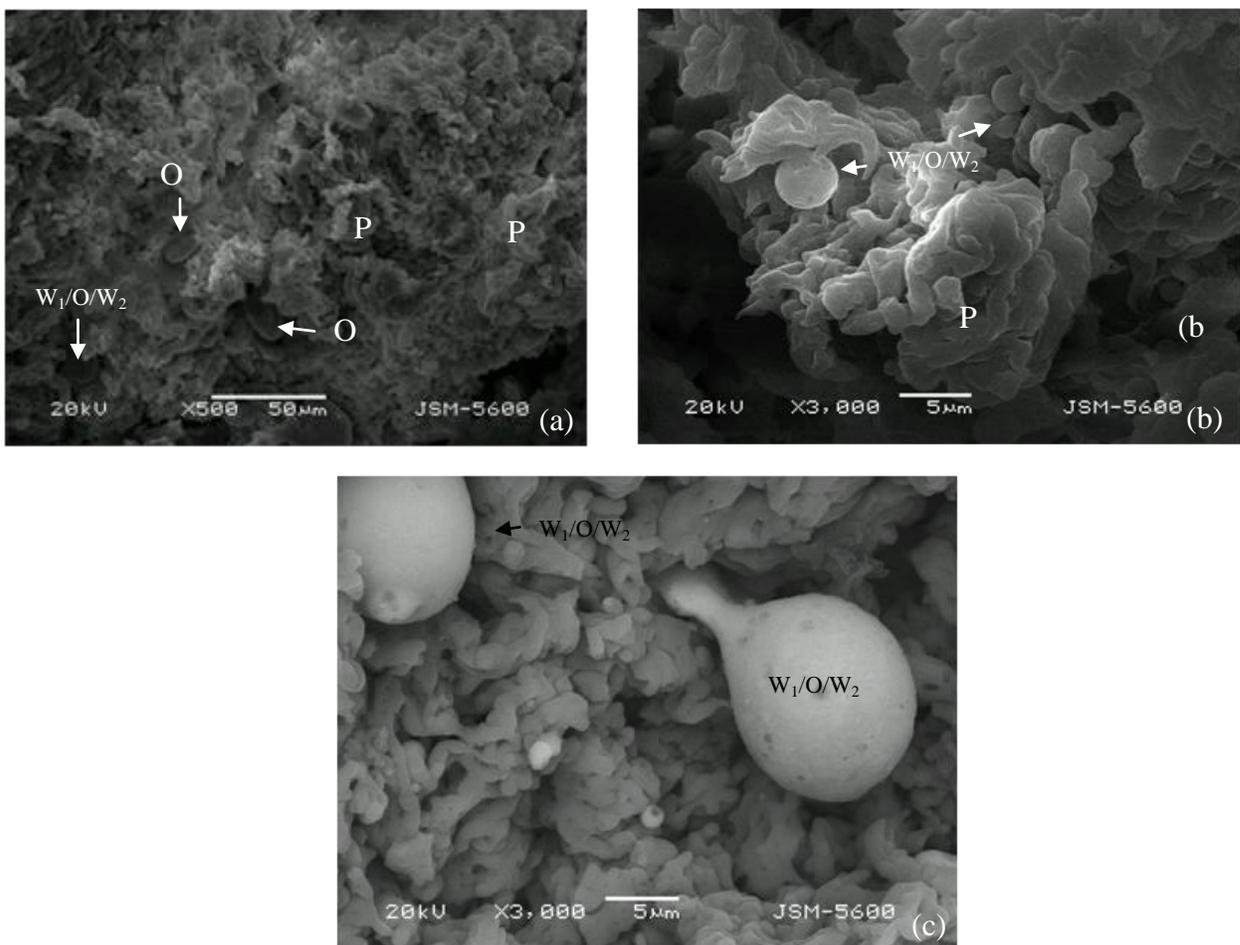


Figura 8.13. Micrografía electrónica de barrido del queso Oaxaca control (elaborado con la emulsión múltiple pero sin *L. plantarum*), en la que puede apreciarse la formación de una red tridimensional de las caseínas (P); la presencia de un glóbulo graso de grasa láctea (O) y la emulsión múltiple (W_1/WO_2) embebidos en la red de proteína: a) Magnificación 500 x, barra de escala = 50 μm , b) y c) 3 000 x, barra de escala = 5 μm .

Las micrografías obtenidas para el queso Oaxaca elaborado con la emulsión múltiple con *L. plantarum* encapsulado se presentan en la figura 8.14, teniendo las hebras de caseína más compactas, teniendo únicamente diferencia estadística con el testigo. En la figura 8.13 (c) obtenida del queso control y 8.14 (c) del queso Oaxaca elaborado con la emulsión múltiple con *L. plantarum* encapsulado, se observa que la emulsión está vinculada a la red de proteínas, de acuerdo a Lobato-Calleros y col. (2008), esto indica que las cadenas hidrófobas de los péptidos de la goma arábica y de mezquite podrían interactuar con los filamentos de la caseína de la matriz proteica.

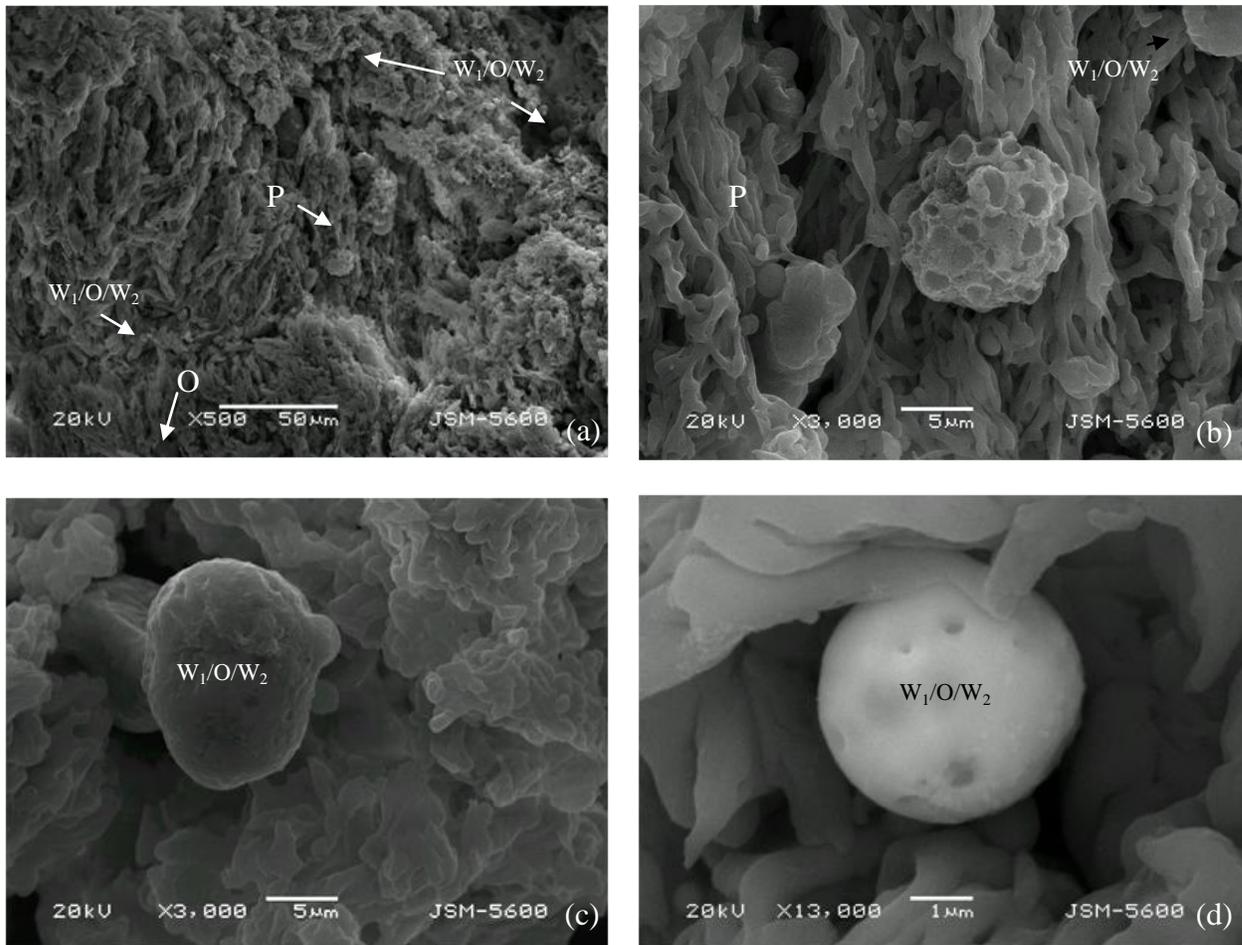


Figura 8.14. Micrografía electrónica de barrido del queso Oaxaca elaborado con la emulsión múltiple con *L. plantarum* encapsulado, en la que puede apreciarse la formación de una red tridimensional de las caseínas (P); la presencia de un glóbulo graso de grasa láctea (O) y la emulsión múltiple (W_1/WO_2) embebidos en la red de proteína: a) Magnificación 500 x, barra de escala = 50 μm , b) y c) 3 000 x, barra de escala = 5 μm y d) 13 000 x, barra de escala= 1 μm .

Las micrográficas obtenidas para los tratamientos del queso Oaxaca con *L. plantarum* libre, queso Oaxaca control y queso Oaxaca con *L. plantarum* encapsulado en la emulsión múltiple, presentan una red tridimensional de caseína más compacta (las hebras de caseína se ven más cerradas) en comparación con el queso Oaxaca testigo, que éste al presentar la estructura de caseínas más abierta, nos indica que de acuerdo a los resultados de textura, por esta razón

podría presentar una menor extensibilidad y por lo tanto es diferente estadísticamente a los tratamiento del queso Oaxaca con *L. plantarum* libre, queso Oaxaca control y queso Oaxaca con *L. plantarum* encapsulado en la emulsión múltiple, que presentan una extensibilidad mayor por tener una estructura de caseína compacta. De acuerdo a Lobato-Calleros (2008), la adicción de una emulsión múltiple emula mejores características de textura y muestra una diferencia marcada en la microestructura.

Conclusiones

En este trabajo la metodología y los criterios generales para el logro de una encapsulación eficiente, mejorando la protección de un microorganismo probiótico en una emulsión múltiple agua-en-aceite-en-agua ($W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$) estabilizada con biopolímeros fue establecido. Así mismo, la estabilidad de la emulsión a diferentes rangos de temperatura y tiempos cumple con su objetivo, además de proteger la viabilidad de *L. plantarum*: (1); en el proceso de elaboración del queso Oaxaca, el malaxado a 75 °C/10 min, obteniendo una viabilidad en el queso final de 8.15 ± 0.17 Log UFC/g, siendo mayor que para el queso con *L. plantarum* libres 6.80 ± 0.08 Log UFC/g, y (2) protegiendo al probiótico en el proceso de fundido del queso para su consumo (6.37 ± 0.17 Log UFC/g), asegurando concentraciones suficientes para su actividad en el organismo. La adición de la emulsión múltiple en la elaboración del queso Oaxaca no afectó las características fisicoquímicas del queso y la concentración final que se obtuvo aún después del proceso de malaxado en la elaboración del queso, fue mayor en el cual se encapsuló a *L. plantarum* que en el queso donde se encontraba libre.

En la simulación gastrointestinal, la emulsión cumplió su objetivo, obteniendo una viabilidad mayor en *L. plantarum* encapsulado en la emulsión $W_{Ag}/O/W_{GM66\%+MD17\%+GA17\%}$ en comparación con el que se encontraba libre (sales biliares 6.10 ± 0.11 Log UFC/g para *L. plantarum* encapsulado y de 3.36 ± 0.44 Log UFC/g para el probiótico libre. Para acidez, 6.14 ± 0.15 Log UFC/g para el encapsulado y 3.60 ± 0.43 Log UFC/g para el libre).

La adición de la emulsión múltiple con *L. plantarum* encapsulado no altero las características de textura (extensibilidad), con relación al queso Oaxaca Testigo.

7. Referencias.

- Anal Singh, H. (2006). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*.
- Aranberri I. Binks, B; Fletcher, P. (2006). Elaboración y caracterización de emulsions estabilizadas por polimeros y agents tesnsoactivos. *Revista Iberoamericana de polímeros*. Volumen 7 (3). Pp. 211 – 231).
- Agudelo C; Ortega, R; Hoyos, J. (2010). Determinación de parámetros cinéticos de dos inoculos lácticos: *Lactobacillus plantarum* A6 y bacterias ácido lácticas de yogurt. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. Volumen 8. No. 2. Pp. 8 – 16.
- Amiet C. C.; Benoit, J.P.; Gadille, P.; Richard, J. (1998). Preparation of *rhizobacteria*-containing polymer microparticles using a complex coacervation method. *Colloids and Surfaces*. 144, 179 – 190.
- AOAC, Official Methods of Analysis. (1997). Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC, Official Methods of Analysis. (2004). Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC, Official Methods of Analysis. (1975). Arlington, VA: Association of Official Analytical Chemists.
- Bain I. (2004). Elaboración de quesos artesanales con leche de oveja. *INTA Chubut*. Pp. 208 – 211.
- Bergamini C.V., Hynes E.R., Quiberoni A., Suarez V. B., Zalazar C. A. (2005). Probiotic bacteria as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. *Food Res. Int.* 38, 597 – 604.

- Brinques G. B.; Záchia A. M. A. (2010). Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal food Engineering*. 103, 123 – 128.
- Brush G; Záchia, M. (2011). Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering*. 103, 123 – 128.
- Burgain J.; Gaiani, C.; Linder, M.; Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*. 104, 467 – 483.
- Buriti C. A., Rocha J. S., Saad M. I. (2005). Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implication for textural and sensorial properties during storage. *Int. Dairy J.* 15, 1279 – 1288.
- Capela P.; Hay, T. K. C.; Shah, N. P. (2005). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*. 39, 203 – 211.
- Chandan R. C. (1999). Enhancing Market Value of Milk by Adding Cultures. *Journal Dairy Science*. 82, 2245 – 2256.
- Chen K. N.; Chen, M. J.; Lin, C. W. (2005). Optimal combination of the encapsulating materials for probiotic microcapsules and its experimental verification (R1). *Journal Food Engineering*. 76, 313 – 320.
- Chian W.; Chi, H. H.; Chun, C. (2002). Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *Food Microbiology*. 83, 293 -301.
- Crittenden R.; Laitila, A., Forssell, P.; Matto, J.; Saarela, M. (2001). Adhesion of Bifidobacteria to Granular Starch and Its Implications in Probiotic Technologies. *American Society for Microbiology*. 67, (8), 3469 -3475.
- Dickinson E. (2010). Double emulsions stabilized by food biopolymers. *Food Biophysics*. 6, 1 -11.

- Dinakar P.; Mistry, V. V. (1994). Growth and Viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar Cheese. *Journal Dairy Science*. 77, 2854 – 2864.
- Dunne C., O'Mahony L., Murphy L., Thornton G., Morrissey D., O'Halloran S., Feeney M., Flynn S., Fitzgerald G., Daly C., Kiely B., O'Sullivan G., Shanahan F. y Collins K. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *American Society for Clinical Nutrition*. 73, 386 -92.
- Dureja H., Kaushik D. y Kumar J. (2003). Developments in nutraceuticals. *Indian Journal of Pharmacy* 35, 363-372.
- Escalante L. A. (2001). El potencial de la manipulación de la flora intestinal por medios dietéticos sobre la salud humana. *Enfermedades infecciosas y microbiología*. UNAM. México. 21, (3), 106 – 109.
- Fagan C.C., Everard C., O'Donnell C.P., Downey G., Sheehan E.M., Delahunty C.M., O'Callaghan D.J., Howard V. (2007). Prediction of processed cheese instrumental texture and meltability by mid-infrared spectroscopy coupled with chemometric tools. *Journal of Food Engineering*. 80, 1068-1077.
- Fennema O. R. (1993). *Química de los alimentos*. Editorial Acribia. España. Pp. 315 – 351.
- Flores M. A.; Mora, E. R.; Romero, A. L. (2004). Evaluación fisicoquímica del aguamiel de tres variedades de maguey pulquero (*Agave spp.*). Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala.
- Franco F. M. J. (2005). *Propiedades mecánicas y de textura del queso tipo Oaxaca, efecto del proceso de elaboración y del contenido graso*. Tesis. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de ciencias agropecuarias.
- Gardiner G. E., Ross R. P., Kelly P. M., Stanton C. *Microbiology of therapeutic milks*. En: R. K. Robinson (ed.), *Dairy microbiology Handbook*, 3a. ed. John Wiley & Sons Inc., Nueva York. (2002); pp. 431-478.

- Gartí N. (1997). Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications – review article-. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, 30, 222 – 235.
- González V. M. (2002). Tecnología para la elaboración de queso blanco, amarillo y yogurt. Secretaria Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación, SENACYT. República de Panamá
- Islas L. M .A. (2005). Propagación de nematodo bioinsecticida *Steinernema carpocapsae* en cultivo monoxenico sumergido usando medios que contienen aguamiel de maguey pulquero (*Agave spp*). Tesis Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias.
- Jiménez-Alvarado R; Beristain, C; Medina-Torres L.; Román-Guerrero A; Vernon-Carter E.J. (2009). Ferrous bisglycinate content and release in $W_1/O/W_2$ multiple emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes. *Food hydrocolloids*. 23, 2425 – 2433.
- Kiokias S., Dimakou C., & Oreopoulou V. (2007). Effect of heat treatment and droplet size on the oxidative stability of whey protein emulsions. *Food Chem*. 105, 94-100.
- Krasaekoopt W.; Bhandari, B.; Deeth, H. (2002). Evaluation of Encapsulation Techniques of Probiotics for Yoghurt. *International Dairy Journal*. 13, 3 – 13.
- Komenan G; Vandamme, T; Seri, F; Marchioni, E. (2011). In vitro effect of pH, salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. *International Dairy Journal*. 10, 1016.
- Lara L. R.; Rodríguez, H. M. E.; Totosaus, S. A.; Pérez C. M. L. (2009). Efecto de la encapsulación sobre la viabilidad de bacterias lácticas termotolerantes. *Academia Mexicana de Investigación y Docencia e Ingeniería Química, AMIDIQ*.

- León Victoria T., Totosaus A., Gurerrero I., Pérez Chabela M. (2006). Efecto de bacterias ácido lácticas termorresistentes en salchichas cocidas. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. Pp. 135 – 141.
- Lucas A.; Sodini, I.; Monneta, C.; Jolivetb, P.; Corrieua, G. (2003). Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. *International Dairy Journal*.14, 47 – 53.
- Lobato-Calleros C., Sosa-Pérez A., Rodríguez-Tafoya J., Sandoval-Castilla O., Pérez-Alonso C., Vernon-Carter E.J. (2008). Structural and textural characteristics of reduced-fat cheese-like products made from $W_1/O/W_2$ emulsions and skim milk. *Food Sci. Technol*. 41, 1847-1856.
- McClements D. J. (1999). *Food emulsions, principles, practice and techniques*. CRC. Washington, D. C. Pp. 2 -5; 84 – 95.
- Madene A.; Jacquot, M.; Scher, J.; Desobry, S. (2005). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *Journal of Food Science Technology*. 41, 1 – 21.
- Martinez G. (2002). Estudio de los cambios reologicos y morfologicos de emulsiones multiples del tipo agua-en-aceite-en-agua (W/O/W) en el tiempo. Tesis. México, D. F. Pp. 32 – 44.
- Martínez-Escamilla G. (2002). Estudio de los cambios reológicos y morfológicos de emulsiones múltiples del tipo agua-en-aceite-en-agua (W/O/W) en el tiempo. Tesis. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. México, D. F. pp. 32 – 44.
- Ong L., Shah N. P. (2009). Probiotic Cheddar cheese: Influence of ripening temperatures on survival o probiotic microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. *Food. Sci. Technol*. 42, 1260 – 1268.
- Özer B., Kirmaci H. A., Senel E., Atamer M., Hayaloglu A. (2009). Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. *Int. Dairy. J*. 19, 22-29.

- Palacio V. S. (2006). Caracterización microbiológica de diversos tipos de quesos elaborados en el valle de Tulancingo, Hgo. Tesis. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de ciencias agropecuarias
- Pacheco C. K. (2007). Inmovilización de *Lactobacillus delbrueckii* como vector probiótico. Tesis. Universidad politécnica del Estado de México
- Parvez S.; Malik, K. A.; Kang, S. Ah. And Kim, H. Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*. 100, 1171 – 1185.
- Pedroza I. R. (2002). Alimentos microencapsulados: Particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. Simposium Internacional de Nutrición Acuícola.
- Pimentel-González, D. J.; Campos-Montiel, R.G.; Lobato-Calleros, C.; Pedroza-Islas, R.; Vernon-Carter, E. J. (2009). Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*. 42, 292-297.
- Pérez-Alonso C., Cruz-Olivares J., Barrera-Pichardo J., Báez-González J., Vernon-Carter E. J. (2008). Energía de activación de mezclas de biopolímeros como criterio de selección para ser empleado como materiales de barrera en la microencapsulación por secado por aspersion de colorantes naturales. 27 Encuentro Nacional AMIDIQ. Ixtapa Zihuatanejo Gro. México. pp. ALI164 – ALI171.
- Pérez-Alonso C., Báez-González J.B., Beristain C.I., Vernon-Carter E.J., Vizcarra-Mendoza M.G: (2003). Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection for their use as wall material for spray-dried microcapsules. *Carbohydr. Polym.* 53, 197-203.
- Rodríguez–Cervantes, Saldaña-Valerio E., Regalado C., García-Almendárez B. E. (2011). Sobrevivencia de dos bacterias probióticas *Lactobacillus acidophilus*

- y *Bifidobacterium lactis* en dos tipos de quesos frescos deslactosados: Panela y Oaxaca. Departamento de investigación y posgrado en alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Rodríguez–Cervantes, Saldaña-Valerio E., Regalado C., García-Almendárez B. E. (2011). Sobrevivencia de dos bacterias probióticas *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium lactis* en dos tipos de quesos frescos deslactosados: Panela y Oaxaca. Tesis. Departamento de investigación y posgrado en Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Rodríguez-Huezo M. E., Pedroza-Islas. R., Prado-Barragan L. A., Beristain C. I., Vernon-Carter E. J. (2004). Microencapsulation by spray drying of multiple emulsions containing carotenoids. *Food Engineering and Physical Properties*. 45, 345-365.
- Rodríguez-Huezo. M. E., Durán-Lugo R., Prado-Barragán L. A., Cruz-Sosa F., Lobato-Calleros C., Alvarez-Ramírez L.A., Vernon-Carter E.J. (2007). Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. *Food Eng.* 40, 1299-1306
- Román Brito J.A. (2006). Determinación del perfil viscoelástico y de textura en tortillas de maíz adicionadas con goma xantana. Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politecnico Nacional. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Pp. 54-56.
- Saézn C.; Tapia, S.; Chávez, J.; Robert, P. (2008). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*. 114, 616 – 622.
- Salager J. L. (1999). Formulación, composición y fabricación de emulsiones para obtener las propiedades deseadas, estado del arte. Universidad de los Andes. Venezuela.

- Sameh Awad. (2006). Texture and flavor development in Ras cheese made from raw and pasteurized milk. *Food Chemistry*. 97, 394-400.
- Sandoval-Catilla C. O; Lobato- Calleros. C.; Gracia-Galindo. H. S.; Alvarez-Ramírez. J.; Vernon-Carter. E. J. (2009). Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped Lb. casei in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*. 43, 111 – 117.
- Saxelin M. (2002). LGG Summatim, el *Lactobacillus* GG y sus efectos en la salud. Valio. 2da Edición. Finlandia. Pp. 7-10.
- Scott. (1991). Fabricación de queso. España. Pp. 313 – 320.
- Shah N. P. (2000). Symposium: probiotic bacteria. Selective enumeration and survival in dairy foods. *Dairy Science*. 83, 894 – 907.
- Shima M.; Morita, Y.; Yamashitab, M.; Adachi. S. (2006). Protection of *Lactobacillus acidophilus* from the low pH of a model gastric juice by incorporation in a W/O/W emulsion. *Food Hydrocolloids*. 20, 1164 – 1169.
- Sherman P. 1968. *Emulsion Science*. Pergamon Press, London. Pp. 332-334.
- Spreer E. (1991). *Lactología Industrial*. Editorial Acribia. España. Pp. 299 – 334.
- Sosa-Fragoso J. 2004. Desarrollo de emulsiones múltiples W/O/W estables conteniendo colorantes hidro y lipo dispersables como precursores de microencapsulados. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa. México.
- Sultana K.; Godward, G.; Reynolds, N.; Arumugaswamy, R.; Peiris, P.; Kailasapathya, K. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Microbiology*. 62, 47 – 65.

- Taranto P. M.; Médici, M.; Front V. G. (2005). Alimentos funcionales probióticos. *Química Viva*, 1 -4.
- Teitelbaum J. E.;Walker, W. A. (2002). Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organism. *Annual Reviews Nutritional*. Pp. 107 – 138.
- Van Hekken D. L., Tunik M.H., Malin E.L., Holsinger V.H. (2007). Rheology and melt characterization of low-fat and full fat Mozzarella cheese made from microfluidized milk. *LWT*. 40, 89-90.
- Vasbinder A. J., Alting A. C., Visschers R. W., de Kruif C.G. (2003). Texture of acid milk gels: formation of disulfide cross-links during acidification. *Int. Dairy. J.* 13, 29-38.
- Villegas G. A. (2004). *Tecnología quesera*. Editorial Trillas. México. Pp. 172 – 225.
- Villegas G. A. (2009). Dos famosos quesos de pasta hilada (filata): el Oaxaca y el mozzarella. Universidad Autónoma de Chapingo. Tesis.
- Vinderola G., Capellini B., Villareal F., Suárez V., Quiberoni A., Reinheimer. (2008). Usefulness of a set of simple in vitro test for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *Food. Sci. Technol.* 41, 1678 – 1688.
- Vries M. C.; Vaughanb, E. E.; Kleerebezema, M.; Vos, W. M. (2005). *Lactobacillus plantarum*—survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*. 16, 1018 – 1028.
- Wen-Chian Lian, Hung-Chi Hsia, Cheng-Chun Chou. (2003). Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. *International Journal of Food Microbiology*. 86, 293-301.
- Yañez F. Y.; Salazar, J. A.; Chaires, M. L.; Jiménez, H. J.; Márquez, R. M.; Ramos, R. E. G. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y perspectiva vol 21. XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería*. México. Pp. 313 – 319.

- Zago M.; Fornasari, M. E.; Carminati, D.; Burns, P.; Suarez, P.; Vinderola, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. Food Microbiology. 1 – 8.
- Zisu B. and Shah N.P. (2007). Texture characteristics and pizza bake properties of low-fat Mozzarella cheese as influenced by pre-acidification with citric acid and use of encapsulated and ropy exopolysaccharide producing cultures. International Dairy Journal. 8, 985-997.

11. Anexos.



San José del Cabo, BCS, México. Del 01 al 04 de Mayo del 2012.

“LA INGENIERÍA QUÍMICA Y LA SUSTENTABILIDAD”

La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A.C. Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

a

Estrada-Fernández Ana Guadalupe, Ludeña-Urquizo Fanny, Rodríguez-Huezo Maria Eva, Campos-Montiel Rafael German, Quintero-Lira Aurora, Pimentel-González Diana Jaqueline.

Por la presentación del trabajo titulado:

“SOBREVIVENCIA DE UNA BACTERIA PROBIÓTICA ENCAPSULADA EN UNA EMULSIÓN DOBLE A DIFERENTES TEMPERATURAS DE PROCESAMIENTO”

Dr. Rubén González Núñez
PRESIDENTE AMIDIQ

Dr. Juan Gabriel Segovia Hernández
VICE-PRESIDENTE AMIDIQ

Dr. Jesús Alberto Ochoa Tapia
PRESIDENTE DEL COMITÉ TÉCNICO

AMIDIQ

Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, A.C.

ID:16721

11.1. Análisis Estadístico Factorial para emulsiones internas.

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: C1	5	4.115678	0.8231356	22.19	0.000000*	1.000000
B: C2	5	10.22673	2.045346	55.14	0.000000*	1.000000
AB	25	1.451196	5.804782E-02	1.56	0.054312	0.959069
S	144	5.34132	0.0370925			
Total (Adjusted)	179	21.13492				
Total	180					

* Term significant at alpha = 0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C3

Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=144 MSE=0.0370925 Critical Value=4.0849

Group	Count	Mean	Different From Groups
2	30	1.249333	6, 3, 4, 5, 1
6	30	1.432333	2, 1
3	30	1.449	2, 1
4	30	1.509333	2, 1
5	30	1.562667	2, 1
1	30	1.752	2, 6, 3, 4, 5

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C3

Term B: C2

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=144 MSE=0.0370925 Critical Value=4.0849

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	30	1.178333	6, 9, 12, 15
3	30	1.239333	6, 9, 12, 15
6	30	1.420667	1, 3, 9, 12, 15
9	30	1.589	1, 3, 6, 15
12	30	1.672667	1, 3, 6, 15
15	30	1.854667	1, 3, 6, 9, 12

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

11.2. Análisis Estadístico Factorial de formulación de emulsiones externas.

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: C1	5	199.7592	39.95184	30.91	0.000000*	1.000000
B: C2	5	100.3227	20.06454	15.52	0.000000*	1.000000
AB	25	38.96951	1.55878	1.21	0.243819	0.874661
S	144	186.1329	1.292589			
Total (Adjusted)	179	525.1843				
Total	180					

* Term significant at alpha = 0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C3

Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=144 MSE=1.292589 Critical Value=4.0849

Group	Count	Mean	Different From Groups
2	30	8.594	6, 1, 5
4	30	9.033667	6, 1, 5
3	30	9.439667	6, 1, 5
6	30	10.60067	2, 4, 3, 5
1	30	10.74333	2, 4, 3
5	30	11.58767	2, 4, 3, 6

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C3

Term B: C2

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=144 MSE=1.292589 Critical Value=4.0849

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	30	8.617333	3, 6, 9, 12, 15
3	30	9.633333	1, 12, 15
6	30	10.087	1, 15
9	30	10.13933	1, 15
12	30	10.52367	1, 3
15	30	10.99833	1, 3, 6, 9

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

11.3. Simulación de condiciones de procesamiento térmico para evaluar la estabilidad de la emulsión, así como la sobrevivencia de las bacterias encapsuladas

Analysis of Variance Table

Source	Sum of	Mean	Prob	Power		
Term	DF	Squares	Square	F-Ratio	Level	
A: C1	2	19.59276	9.796379	290.23	0.000000*	1.000000
B: C3	3	62.34258	20.78086	615.65	0.000000*	1.000000
AB	6	3.638808	0.6064681	17.97	0.000024*	0.999999
S	12	0.40505	3.375417E-02			
Total (Adjusted)	23	85.97919				
Total	24					

* Term significant at alpha = 0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C4

Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=12 MSE=3.375417E-02 Critical Value=3.7729

Group	Count	Mean	Different From Groups
3	8	6.32875	2, 1
2	8	8.1975	3
1	8	8.29	3

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C4

Term B: C3

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=12 MSE=3.375417E-02 Critical Value=4.1987

Group	Count	Mean	Different From Groups
20	6	6.03	15, 10, 0
15	6	6.62	20, 10, 0
10	6	7.533333	20, 15, 0
0	6	10.23833	20, 15, 10

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

11.4. Viabilidad de *L. plantarum* encapsulado en el proceso de elaboración del queso Oaxaca.

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: C1	1	4.923204	4.923204	38.71	0.000012*	0.999943
B: C2	3	38.93308	12.97769	102.03	0.000000*	1.000000
AB	3	1.804746	0.6015819	4.73	0.015098*	0.807184
S	16	2.035133	0.1271958			
Total (Adjusted)	23	47.69616				
Total	24					

* Term significant at alpha = 0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C3

Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=16 MSE=0.1271958 Critical Value=2.9980

Group	Count	Mean	Different From Groups
2	12	8.173333	1
1	12	9.079166	2

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C3

Term B: C2

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=16 MSE=0.1271958 Critical Value=4.0461

Group	Count	Mean	Different From Groups
4	6	7.483333	2, 1
3	6	7.786667	2, 1
2	6	8.496667	4, 3, 1
1	6	10.73833	4, 3, 2

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

11.5. Viabilidad de *L. plantarum* encapsulado en pruebas de fundido en queso Oaxaca.

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
(Alpha=0.05)						
A: C1	1	22.96806	22.96806	319.42	0.000000*	1.000000
B: C2	3	0.9349188	0.3116396	4.33	0.043160*	0.653322
AB	3	0.5258688	0.1752896	2.44	0.139500	0.405642
S	8	0.57525	7.190625E-02			
Total (Adjusted)	15	25.00409				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C3

Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=8 MSE=7.190625E-02 Critical Value=3.2612

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	8	3.92125	2
2	8	6.3175	1

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C3

Term B: C2

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=8 MSE=7.190625E-02 Critical Value=4.5288

Group	Count	Mean	Different From Groups
10	4	4.865	0
5	4	4.94	
15	4	5.19	
0	4	5.4825	10

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

11.6. Determinación de tolerancia de *L. plantarum* en acidez y sales biliares en emulsiones entrapadas en el queso Oaxaca, después del proceso de fundido.

Acidez

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
(Alpha=0.05)						
A: C1	1	25.73026	25.73026	174.53	0.000000*	1.000000
B: C2	3	0.5293688	0.1764562	1.20	0.356056	0.238043
S	11	1.621719	0.147429			
Total (Adjusted)	15	27.88134				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C3

Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=11 MSE=0.147429 Critical Value=3.1127

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	8	3.59875	2
2	8	6.135	1

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C3

Term B: C2

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=11 MSE=0.147429 Critical Value=4.2562

Group	Count	Mean	Different From Groups
10	4	4.6625	
5	4	4.75	
15	4	4.915	
0	4	5.14	

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Sales biliares

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
(Alpha=0.05)						
A: C1	1	21.033	21.033	310.84	0.000000*	1.000000
B: C2	4	2.58427	0.6460675	9.55	0.001909*	0.983834
AB	4	0.83277	0.2081925	3.08	0.068045	0.593549
S	10	0.67665	0.067665			
Total (Adjusted)	19	25.1267				

Total 20

* Term significant at alpha = 0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C3

Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=10 MSE=0.067665 Critical Value=3.1511

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	10	5.64	2
2	10	7.691	1

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C3

Term B: C2

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=10 MSE=0.067665 Critical Value=4.6543

Group	Count	Mean	Different From Groups
10	4	6.4325	0
1	4	6.435	0
15	4	6.4925	0
5	4	6.5925	0
0	4	7.375	10, 1, 15, 5

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

11.7. Análisis físico químicos

pH

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
(Alpha=0.05)						
A: C1	3	0.1005594	3.351979E-02	5.80	0.003742*	0.914143
B: C2	3	3.378437E-02	1.126146E-02	1.95	0.147484	0.441412
S	25	0.1444281	5.777125E-03			
Total (Adjusted)	31	0.2787719				
Total	32					

* Term significant at alpha = 0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C3

Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=25 MSE=5.777125E-03 Critical Value=3.8900

Group	Count	Mean	Different From Groups
3	8	4.9875	4
1	8	4.99375	4
2	8	5.07375	
4	8	5.12125	3, 1

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Grasa por el método de Gerber.**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: C1	3	8.9375	2.979167	1.09	0.370273	0.259146
B: C2	3	38.9375	12.97917	4.76	0.009241*	0.846860
S	25	68.125	2.725			
Total (Adjusted)	31	116				
Total	32					

* Term significant at alpha = 0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C3

Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=25 MSE=2.725 Critical Value=3.8900

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	8	21.0625	
4	8	21.75	
2	8	22.3125	
3	8	22.375	

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Contenido de Proteína**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
-------------	----	----------------	-------------	---------	------------	-------

(Alpha=0.05)

A: C1	3	7.712409	2.570803	3.33	0.035558*	0.686601
B: C2	3	3.884809	1.294936	1.68	0.196999	0.384940
S	25	19.28268	0.7713071			
Total (Adjusted)	31	30.8799				
Total	32					

* Term significant at alpha = 0.05

Response: C3

Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=25 MSE=0.7713071 Critical Value=3.8900

Group	Count	Mean	Different From Groups
2	8	20.35125	3
4	8	20.71	
1	8	21.285	
3	8	21.615	2

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Contenido de Cenizas

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: C1	3	0.7786594	0.2595531	1.76	0.180941	0.401660
B: C2	3	54.74234	18.24744	123.60	0.000000*	1.000000
S	25	3.690878	0.1476351			
Total (Adjusted)	31	59.21187				
Total	32					

* Term significant at alpha = 0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C3

Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=25 MSE=0.1476351 Critical Value=3.8900

Group	Count	Mean	Different From Groups
2	8	2.90375	
4	8	2.9775	
3	8	3.03875	
1	8	3.31625	

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Contenido de Humedad**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: C1	3	53.40031	17.8001	5.03	0.007282*	0.867480
B: C2	3	136.7975	45.59917	12.89	0.000028*	0.999264
S	25	88.46556	3.538623			
Total (Adjusted)	31	278.6634				
Total	32					

* Term significant at alpha = 0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C3

Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=25 MSE=3.538623 Critical Value=3.8900

Group	Count	Mean	Different From Groups
4	8	48.51375	1
3	8	48.96875	1
2	8	49.44	
1	8	51.86	4, 3

Notes:

This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.