



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS +

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA QUE EVITE LA
PROLIFERACIÓN DE BACTERIAS DEL GÉNERO PSEUDOMONAS EN
QUESO FRESCO +

AUTOR

Pablo Alejandro Burbano Escobar

AÑO

2018



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA QUE EVITE LA PROLIFERACIÓN
DE BACTERIAS DEL GÉNERO *PSEUDOMONAS* EN QUESO FRESCO

Trabajo de titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniero Agroindustrial y de Alimentos

Profesor guía
MSc. José Ignacio Ortín

Autor
Pablo Alejandro Burbano Escobar

Año
2018

DECLARACIÓN PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Desarrollo de una metodología que evite la proliferación de bacterias del género *Pseudomonas* en queso fresco, a través de reuniones periódicas con el estudiante Pablo Alejandro Burbano Escobar, en el semestre 2018-1, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

José Ignacio Ortín
Master en Gestión de la Seguridad Alimentaria
CC: 1754826517

DECLARACIÓN PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Desarrollo de una metodología que evite la proliferación de bacterias del género *Pseudomonas* en queso fresco, del estudiante Pablo Alejandro Burbano Escobar, en el semestre 2018-1, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

María Raquel Meléndez Jácome
Master en Protección Vegetal y Fitofarmacia
CC: 1709384067

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Pablo Alejandro Burbano Escobar

CC: 1715436927

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por su fidelidad y por haberme dado su fuerza día a día para no bajar los brazos y culminar esta prueba importante de mi vida.

A toda mi familia, gracias por nunca dejar de apoyarme, por sus consejos y paciencia durante todo este tiempo.

A Silvi, por ser mi compañera y ayudarme a seguir siempre adelante.

DEDICATORIA

A Jesús, mi Señor...Gracias por
su amor y su misericordia...

RESUMEN

El queso fresco es un alimento derivado de la leche muy consumido y demandado en el Ecuador por poseer características nutricionales y sensoriales agradables para el consumidor. Sin embargo, la presencia de factores causantes del deterioro de sus propiedades, siendo el más común la proliferación de microorganismos, influyen directamente en la calidad del producto final obtenido. El objetivo principal de este trabajo es analizar el efecto de la combinación de EDTA y nisina contra la proliferación de bacterias del género *Pseudomonas* en el queso. Tres concentraciones diferentes de nisina con una concentración estándar de EDTA se utilizaron en la elaboración de queso fresco, el cual fue inoculado con una cepa de *Pseudomonas fluorescens* y almacenado en condiciones regulares de refrigeración. Para observar el desarrollo de las bacterias y el efecto que tienen estos aditivos ante éstas, se tomaron muestras del alimento en diferentes días de su periodo de vida útil y se hizo un recuento de colonias en placa, para determinar el grado de contaminación. Los resultados obtenidos en el estudio, mostraron que existe un menor crecimiento de la bacteria en quesos con ambos aditivos, en comparación a los que no tenían. La acción inhibitoria de la nisina contra bacterias Gram negativas como las *Pseudomonas*, se debe a la presencia de EDTA. Este aditivo tiene la capacidad de atrapar sales necesarias para la membrana externa de estos microorganismos, que los vuelve resistentes al ataque de conservantes como la nisina. Los resultados indican que a dosis mayores de nisina, mejor es el efecto inhibitorio contra *Pseudomonas*; en este caso la concentración más alta utilizada de 75 mg/l de EDTA con 100 mg/l de nisina fue la que mejores resultados evidenció.

ABSTRACT

Fresh cheese is a food derived from milk that is very consumed and demanded in Ecuador because it has pleasant nutritional and sensory characteristics for the consumer. However, the presence of factors that cause deterioration of their properties, the most common being the proliferation of microorganisms, directly influence the quality of the final product obtained. The main objective of this work is to analyze the effect of the combination of EDTA and nisin against the proliferation of bacteria of the genus *Pseudomonas* in cheese. Three different concentrations of nisin with a standard concentration of EDTA were used in the preparation of fresh cheese, which was inoculated with a strain of *Pseudomonas fluorescens* and stored under regular refrigeration conditions. To observe the development of the bacteria and the effect that these additives have on them, samples of the food were taken on different days of their useful life and a plaque colonies count was made to determine the degree of contamination. The results obtained in the study showed that there is less growth of the bacteria in cheeses with both additives, in comparison to those that did not.

The inhibitory action of nisin against Gram-negative bacteria such as *Pseudomonas* is due to the presence of EDTA. This additive has the ability to trap necessary salts for the outer membrane of these microorganisms, which makes them resistant to the attack of preservatives such as nisin. The results indicate that at higher doses of nisin, the inhibitory effect against *Pseudomonas* is better; in this case, the highest concentration used of 75 mg / l of EDTA with 100 mg / l of nisin was the one that showed the best results.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	2
2.1 Objetivo General	2
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3. Marco Teórico	3
3.1 Generalidades de la leche para producción de quesos	3
3.2 Productos obtenidos a partir de la fermentación de la leche....	4
3.2.1 Proceso de elaboración del queso fresco.....	4
3.3 Microbiología de la leche.....	7
3.3.1 Origen de la flora microbiana de leche cruda	8
3.3.2 Factores que influyen en el deterioro de la leche	9
3.3.3 Calidad microbiológica de la leche	10
3.3.4 Postpasteurización	13
3.3.5 Bacterias Psicrótrofas	13
3.3.6 Enzimas degradadoras de la leche	15
3.3.7 Pseudomonas spp.	15
3.3.8 Biofilms	16
3.3.9 Factores que inciden en el desarrollo de biofilms	17
3.4 Antimicrobianos naturales.....	18
3.4.1 Bacteriocinas comerciales utilizadas en la industria de alimentos ...	19
4. Materiales y métodos.....	22
4.1 Ubicación del experimento.....	22
4.2 Materiales	22
4.2.1 Material biológico	22
4.2.2 Materiales y equipos	22
4.2.3 Insumos	22
4.2.4 Reactivos	22

4.2.3 Aditivos	23
4.3 Métodos	23
4.3.1 Estadístico	23
4.3.2 Manejo Experimental	24
4.3.2.1 Elaboración de Quesos	24
4.3.2.2 Inoculación de Quesos	26
4.3.2.3 Evaluación y recuento microbiano de queso fresco.....	27
5. Resultados y Discusión	27
5.1 Evaluación <i>in vitro</i> de las combinaciones de nisina + EDTA sobre el crecimiento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en el queso fresco.....	28
5.1.2 Evaluación de tratamientos mediante el recuento microbiano de <i>Pseudomoma fluorescens</i> Día 5	28
5.1.3 Evaluación de tratamientos mediante el recuento microbiano de <i>Pseudomoma fluorescens</i> Día 9	29
5.1.4 Evaluación de tratamientos mediante el recuento microbiano de <i>Pseudomoma fluorescens</i> Día 12	31
6. Conclusiones y Recomendaciones	35
6.1 Conclusiones	35
6.2 Recomendaciones.....	36
REFERENCIAS	37
ANEXOS	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tipos de pasteurización.....	6
Tabla 2. Cantidad de microorganismos presentes en fuentes de contacto con la leche	9
Tabla 3. Requisitos microbiológicos de la leche cruda	11
Tabla 4. Límites máximos de contaminantes	12
Tabla 5. Cantidades de nisina permitidas en productos lácteos	20
Tabla 6. Cantidades de EDTA permitidas en alimentos	21
Tabla 7. Tratamientos del diseño experimental	24
Tabla 8. Análisis de varianza de las combinaciones de nisina + EDTA para la inhibición de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en el queso fresco día 5 (con transformación de variable)	28
Tabla 9. Análisis de varianza de las combinaciones de nisina + EDTA para la inhibición de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en el queso fresco día 9.....	30
Tabla 10. Análisis de varianza de las combinaciones de nisina + EDTA para la inhibición de <i>Pseudomonas fluorescens</i> en el queso fresco día 12	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso para la obtención de queso fresco	25
Figura 2. Comparación entre tratamientos según el crecimiento de bacterias de la especie <i>Pseudomonas fluorescens</i> Día 5.....	29
Figura 3. Comparación entre tratamientos según el crecimiento de bacterias de la especie <i>Pseudomonas fluorescens</i> Día 9.....	30
Figura 4. Comparación entre tratamientos según el crecimiento de bacterias de la especie <i>Pseudomonas fluorescens</i> Día 12.....	32
Figura 5. Características visuales del queso fresco (día 5).	33
Figura 6. Características visuales del queso fresco (día 9)	34
Figura 7. Características visuales del queso fresco (día 12).	34

1. Introducción

Las causas que provocan la afectación del producto final en quesos pueden ser de varios orígenes; a pesar de esto, expertos en la industria láctea han podido comprobar que la más frecuente y común es la presencia de microorganismos indeseables a lo largo del proceso de producción. Varios de estos organismos están especialmente relacionados al género de bacterias *Pseudomonas* (Conrado, Millán, Lupiola, Quintana y SanJuan, 2015).

Las *Pseudomonas* son bacterias no esporuladas que pertenecen a la familia *Pseudomonaceae*. Estos microorganismos son de forma alargada y están clasificados como aerobios estrictos, porque necesitan de la presencia de oxígeno para poder desarrollarse en algún alimento o medio de cultivo. Otras de sus características son la de no formar esporas expuestas al medio ambiente y tener una fuerte acción oxidante (Conrado, C, et al., 2015).

La contaminación del queso se produce originalmente a partir de la leche, dado que las *Pseudomonas* son considerados microorganismos psicrótrofos; se desarrollan bien a temperaturas de refrigeración, siendo su presencia mayor en leches almacenadas por un largo tiempo. La leche se contamina por factores ambientales y puede producirse a partir del equipo de ordeño, tanques de almacenamiento, maquinaria y edificaciones de producción, por efecto de una mala desinfección y lavado o por una incorrecta manipulación de la leche (Conrado, C., et al.,2015).

Por otro lado, estas bacterias pueden desarrollarse en varios medios naturales como el agua y la tierra. Un ejemplo, es el agua utilizada para realizar los procesos de limpieza, la cual puede ser no confiable cuando se desconoce su origen. Por esta razón es necesario su control y análisis, principalmente en queserías ubicadas en zonas rurales, donde la accesibilidad al agua potable es limitada (Karama, Sechi, Lulietto, Novelli y Mattei, 2014).

Algunas especies de *Pseudomonas* son causantes también de la aparición de biofilms que se fijan en las tuberías por donde se transporta la leche o el agua utilizada en cada uno de los procesos. Esto facilita que éstas sobrevivan a procesos de limpieza y desinfección, realizados en la producción industrial (Karama et al., 2014).

Es pues de vital importancia evitar en todo sentido la propagación bacteriana, implementando todo el tiempo medidas preventivas y correctivas que garanticen las condiciones de higiene en todos los procesos de producción, lo que asegurará la salud del consumidor, con buenos productos libres de patógenos (Karama et al., 2014).

En el Ecuador actualmente existe la problemática de la presencia de bacterias de género *Pseudomonas* en varios productos de la industria de quesos (queso fresco y queso mozzarella) que causan alteraciones organolépticas no deseables, alertando de esta manera a los consumidores en el momento de adquirirlos. Hay un total desconocimiento para solucionar o minimizar este tipo de inconvenientes, lo que afecta a la imagen de su marca frente a los clientes. Con la siguiente investigación se busca analizar la eficacia de un método de conservación, que combine dos aditivos alimentarios permitidos en la industria de alimentos como el EDTA y nisina, los cuales puedan ser utilizados en queso fresco, evitando que la proliferación de bacterias de este género afecte a la calidad final del producto.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Desarrollar una metodología aplicable en quesos frescos que ayude a contrarrestar la proliferación de bacterias del género *Pseudomonas* causantes de la afectación de la vida útil del producto.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Analizar la evolución del recuento microbiano en queso fresco contaminado con *Pseudomonas*, a lo largo de su periodo de vida útil.
- ✓ Determinar la eficacia de un método de conservación mediante la combinación de dos aditivos de uso alimentario permitidos, durante la vida útil del producto.

3. Marco Teórico

3.1 Generalidades de la leche para producción de quesos

La leche es un alimento proveniente de las glándulas mamarias de mamíferos hembras que sirve de alimento para sus crías. Está compuesta por grasas, proteínas, azúcares, vitaminas y minerales, agua y también de otras sustancias que se encuentran en menores proporciones (Badui, 2006).

La leche antes de ser procesada, está expuesta a deteriorarse por enzimas y ataque de microorganismos. Estos últimos, pueden reproducirse por millones en periodos muy cortos de tiempo y estropearla en su totalidad (Badui, 2006).

Varios han sido los procedimientos que se han desarrollado para alargar el periodo de vida útil de la leche y de esta manera mejorar su utilización y seguridad. La leche es utilizada en la elaboración de una gran variedad de productos como queso, mantequillas, yogurts y otros subproductos que sirven como ingredientes de otros alimentos (Robinson y Wilbey, 2012).

Los productos lácteos que se consumen en el Ecuador son manufacturados principalmente del ganado bovino. Derivados lácteos provenientes de otros animales son poco significativos en la ganadería comercial del país. Según datos del Centro de la Industria Láctea (CIL), los litros de leche procesados a diario se

encuentran alrededor de los 5,8 millones; de los cuales más de una tercera parte es destinada a la elaboración de queso (Orozco, 2015).

Muchas de las empresas que se encuentran en el país consideran a la producción de quesos como la principal actividad de la industria láctea abarcando un 80% de su producción diaria. Las ventas en este tipo de industria han crecido en los últimos años pasando desde el 2005 hasta el 2014 de los USD 71,4 a los 243,1 millones de dólares. Esto se debe a la preferencia que tiene el consumidor en sus hábitos de alimentación por tradición y precio del producto (Orozco, 2015).

3.2 Productos obtenidos a partir de la fermentación de la leche

Del proceso de fermentación de la leche se derivan dos productos principales de gran consumo: el queso y el yogurt. El queso es el producto que se obtiene a partir de la coagulación de la caseína de la leche cruda o pasteurizada por acción del cuajo y el desprendimiento de suero (INEN, 2012). La concentración de proteína, grasa y otros componentes determinan la consistencia semisólida del producto (Robinson y Wilbey, 2012).

3.2.1 Proceso de elaboración del queso fresco

No existe un proceso estandarizado para la elaboración de queso, se utilizan muchas variantes en los insumos y procedimientos para su fabricación. El queso se puede obtener utilizando métodos muy simples como los artesanales o aquellos más complejos que se hacen a partir de la separación de los componentes de la leche. Aumentando o disminuyendo los procesos y requerimientos necesarios del queso y su tecnología en empresas que se dedican a este oficio, el procedimiento general utilizado para obtenerlos está expuesto por (Robinson y Wilbey, 2012).

El primer paso consiste en la recepción y pruebas de calidad de la leche que son de tipo químico, físico y microbiológico. Entre las principales pruebas se encuentran:

- ✓ Prueba de mastitis: con el test de prueba de california se determina si esta se debe rechazar al dar positivo en los resultados (INTI, 2011).
- ✓ Prueba de alcohol: la leche y alcohol al 70% son mezclados en dosis iguales. La mezcla de las dos sustancias sin la precipitación de la caseína determina que la leche está en buenas condiciones para ser utilizada (INTI, 2011).
- ✓ Prueba punto crioscópico: esta prueba es muy confiable ya que determina con exactitud, la cantidad de agua añadida a la leche. Verifica el punto de congelación de la leche y valores normales están entre 0. 53 – 0. 55° Hover (INTI, 2011).

Al recibir la leche que cumple con todos los parámetros de calidad, ésta es filtrada y almacenada a temperaturas inferiores a los 10°C y bajo buenas condiciones de higiene, previamente al proceso de pasteurización (INTI, 2011). Mantener la leche a bajas temperaturas es muy importante porque reduce el crecimiento bacteriano y los ácidos grasos libres. Además, ayuda a mantener sus condiciones organolépticas en buen estado para posteriormente obtener un queso de calidad (INTI, 2011).

Luego se realiza el proceso de pasteurización que consiste en hacer que la leche alcanza los 72°C por un periodo de tiempo de 15 segundos. Esto se realiza en un pasteurizador continuo de placas. Al elevar la temperatura se asegura que los microorganismos patógenos mueran. Sobre todo bacterias termo sensibles como coliformes sean eliminadas. Algunas bacterias lácticas termófilas como los esporulados (*Clostridium Butyricum*, *Tyrobutyricum* y *Sporogenes*), provenientes de los ensilados que sirven de alimento para las vacas, sobreviven en un porcentaje entre el 0.5 al 1% dependiendo de la intensidad de la pasteurización. (INTI, 2011). En la tabla 1 se observa los tipos de pasteurización existentes.

Tabla 1.

Tipos de Pasteurización

Pasteurización	Temperatura	Tiempo
VAT o lenta	63 °C	30 minutos
HTST (High Temperature Short Time)	72 °C	15 segundos
UHT (Ultra High Temperature)	130 °C – 150 °C	2 – 4 segundos

Tomado de: (INTI, 2011).

El calcio que se encuentra de forma natural es degradado por las altas temperaturas manejadas en el proceso de pasteurización, siendo este muy importante para el rendimiento y consistencia de la leche. Esta pérdida es resuelta con la adición de cloruro de calcio líquido en la leche, a una temperatura de la leche de 40°C y con una mezcla totalmente distribuida (INTI, 2011).

Una vez pasteurizada la leche y agregado el cloruro de calcio, a una temperatura entre los 38-40°C se procede a coagularla. El coagulante que se añade es cuajo líquido a base de quimosina para lograr una coagulación lenta enzimática. Se distribuye el cuajo en toda la leche aproximadamente un minuto para luego dejarla en reposo 30 minutos hasta lograr una buena coagulación (INTI, 2011).

Una vez que la caseína de la leche haya coagulado, se procede a hacer cortes de ésta. Se observa que la leche adquiere una apariencia muy similar a la de un flan. Luego de 10 minutos nuevamente se realizan cortes para romper la cuajada y obtener granos más pequeños logrando así desprender el suero. Luego se eleva la temperatura hasta los 39-40°C realizando movimientos circulares de la mezcla; añadir la sal yodada libre de impurezas para el salado del queso. El suero sobrante se lo desecha (INTI, 2011).

El queso se procede rápidamente a colocar manualmente en moldes bajo estrictas condiciones de higiene. Debido a que tiene una gran cantidad de agua se procede a prensarlo; esto ayuda a que tenga una mayor consistencia, eliminar el exceso de agua de la cuajada y obtener cortes más lisos del producto (INTI, 2011).

Entre el moldeo y prensado el tiempo no debe exceder los 30 minutos ya que de esta manera se disminuyen los riesgos de crecimiento microbiano y contaminación por tiempo y manipulación; esto es determinante en el tiempo de vida útil del queso dentro del empaque (INTI, 2011). Se debe colocar el producto en empaques estériles para evitar su deterioro (INTI, 2011).

El almacenamiento debe ser el adecuado en cuartos fríos que se encuentren a temperaturas entre 4-6°C para luego distribuirlo; para esto es indispensable mantener la cadena de frío todo el tiempo. Teniendo en cuenta todos estos aspectos, la vida útil del producto es de 12 días aproximadamente (INTI, 2011).

3.3 Microbiología de la leche

La leche por naturaleza, es un medio dónde los microorganismos se adaptan y crecen fácilmente, además de que su calidad microbiológica varía enormemente. Las vías de contaminación pueden venir por los animales enfermos, el mal manejo de la materia prima o de los equipos y utensilios utilizados en la producción y almacenamiento. La leche se produce a temperaturas que van desde los grados bajo cero, en donde es necesario protegerla del congelamiento, hasta temperaturas sobre los 25°C, donde se la debe mantener bajo refrigeración. Por todas estas razones, productos lácteos elaborados aparentemente, bajo buenas condiciones sanitarias y almacenados a temperaturas correctas de refrigeración, pueden tener sabores extraños, alcanzar bajos rendimientos y producir infecciones al consumidor por alimentos en mal estado (Robinson y Wilbey, 2012).

3.3.1 Origen de la flora microbiana de leche cruda

La leche es producida de forma estéril en la glándula mamaria. Sin embargo, cuando ésta es extraída del ordeño y tiene contacto con las ubres del animal, el riesgo de contaminación por microorganismos o células somáticas es alto.

Estos también pueden introducirse en la leche, al momento de ser procesada, si no existen precauciones de higiene (Torres, 2013). Se consignan algunas fuentes de contaminación:

- ✓ Microorganismos provenientes del animal: se encuentran en los conductos galactóforos y en las ubres, incluso cuando el animal está en buen estado de salud. Estos son principalmente bacterias ácido lácticas y micrococos (Gram positivos).

- ✓ Microorganismos procedentes de otras fuentes: pueden provenir de equipos de ordeño y almacenamiento (bacterias ácido lácticas, micrococos (Gram positivos), *Pseudomonas*, *Alcalígenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* (Gram negativos) y levaduras). También del suelo, agua, aire y piensos (*Streptomyces*, *Pseudomonas*).

Es indispensable la utilización de agua potable para el lavado y limpieza de equipos y utensilios. Para que no exista presencia de coliformes, es necesario realizar un control periódico del agua (Heer, 2007).

Heer (2007) menciona, que los microorganismos que con frecuencia contaminan el agua son del género *Pseudomonas*. Si ésta es utilizada en los procesos de lavado y en el enjuague de equipos y utensilios, estos se contaminan y por ende la leche se ve afectada también. Una de las soluciones a este problema, es el tratamiento del agua por cloración.

Tabla 2.

Cantidad de microorganismos presentes en fuentes de contacto con la leche

Fuente	UFC/ml
Aire	100 – 1500
Ubre	300 – 4000
Pezones	500 – 15000
Ubre (infecciones)	300 – 25000
Equipos y utensilios	Desde miles hasta millones ufc/ml

Tomado de: (Heer, 2007).

3.3.2 Factores que influyen en el deterioro de la leche

La calidad microbiológica, los requisitos de procesamiento, la contaminación post pasteurización y las condiciones de almacenamiento, son factores que influyen en el tiempo de vida útil de la leche (Alais, 1985). El proceso térmico al cual es sometida la leche, no garantiza su total esterilidad. Es por esta razón que la refrigeración se la debe hacer de forma inmediata para evitar la multiplicación bacteriana y su desarrollo a mayor velocidad (Potter, 1999).

Para que la durabilidad en la obtención de la leche y otros productos lácteos sea mayor, es necesario cumplir con requisitos que ayuden a llevar de buena manera los procesos, la higiene y el control de temperatura del alimento, desde su producción y hasta la llegada al consumidor. De esta manera se evita el ataque de microorganismos psicrótrofos como *Pseudomonas* y tipos de *Bacillus* que dañan el producto final (Ramírez, 2012).

Los cambios que se observan en leche y productos lácteos almacenados son:

- ✓ Acidez, proteólisis e hidrólisis de grasa por desarrollo microbiano

- ✓ Deterioro de grasa y proteínas causadas por enzimas propias de la leche o enzimas de bacterias extracelulares
- ✓ Cambio fisicoquímico a gelificación causado por los factores mencionados anteriormente

La leche pasteurizada es deteriorada principalmente por: crecimiento microbiano, debido a temperatura de almacenamiento; gravedad de contaminación; capacidad de crecimiento de la bacteria involucrada; cantidad de esporas de *Bacillus cereus* de la leche antes del proceso térmico y actividad de sustancias que inhiben el crecimiento (Ramírez, 2012).

Barbano (2006) menciona que, si la leche cruda tiene un conteo microbiano menor a 25.000 ufc/ml, no se deteriora su vida útil. La presencia de lipasas y proteasas originadas en animales con número considerable de células somáticas, afecta la calidad de la leche ya pasteurizada.

Debido a que la pasteurización no elimina totalmente las toxinas, esporas y enzimas presentes en la leche cruda, todo el proceso que se realiza antes y después del tratamiento térmico debe ser controlado. De igual manera la temperatura a la que se almacena la leche tratada, ya que puede ser un punto crítico de contaminación (Souza, 2005).

3.3.3 Calidad microbiológica de la leche

La leche de buena calidad es aquella que cumple con todos los requerimientos exigidos, ya sea para su consumo directo o para usarla en la obtención de productos lácteos. Esta calidad es determinada por su composición y la higiene que posee, lo que incide en la salud del consumidor y las propiedades nutricionales de la leche (Muñoz, 2004).

Según (ITG-ILL, 2004), los criterios que debe cumplir una leche de buena calidad son los siguientes:

- ✓ El contenido de microorganismos saprófitos
- ✓ Ausencia o bajos valores de microorganismos patógenos. Aquellos presentes por mastitis, también son incluidos.
- ✓ Ausencia de residuos y contaminantes o valores menores a los niveles permitidos

En cuanto a la calidad, existen tres tipos de leche cruda: calidad higiénica (cantidad de bacterias aerobias mesófilas, contenido de células somáticas y residuos de sustancias no deseables en la leche); calidad físico-química (proteína, grasa, lactosa, nivel de acidez, agua añadida) y calidad sensorial. A pesar de esto es necesario que las plantas en la industria láctea, cumplan con mayores exigencias. Con respecto a la calidad, el parámetro de mayor importancia es el microbiológico al cual se refiere Muñoz (2004), como recuento microbiano. Los requisitos microbiológicos de leche cruda y límites máximos de contaminantes, exigidos por la INEN, se observan a continuación en las tablas 3 y 4 respectivamente.

Tabla 3.

Requisitos microbiológicos de la leche cruda

Requisito	Límite máximo
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos (UFC/cm³)	1,5 x 10 ⁶
Recuento de células somáticas (unidades/cm³)	7,0 x 10 ⁵

Tomado de: (INEN 9, 2015).

Tabla 4.

Límites máximos de contaminantes

Requisito	Unidad	Límite máximo
Plomo	mg/kg	0.02
Aflatoxinas	µg/kg	0.5

Tomado de: (INEN 9, 2015).

Estudios anteriores han demostrado, que el efecto de la presencia de un número elevado de células somáticas en leche cruda, durante su periodo de vida útil de 21 días, genera cambios organolépticos, como sabor amargo y rancidez. Es lo opuesto a una leche que se encuentra en buen estado, por recuentos menores de células somáticas existentes. (Ma et al., 2000).

Se mantiene un recuento de microorganismos menores a 10^5 ufc/ml· si la leche es almacenada a una temperatura de 4°C y si el ordeño previo se realiza bajo estrictas condiciones de higiene. La contaminación inicial es un factor muy importante a cuidar en el proceso (Carrillo, González, Schobitz y Molina, 2004).

Alais (1985) menciona que, el proceso de pasteurización reduce a lo más mínimo posible, el nivel de bacterias saprofitas presentes en la leche, aunque no las reduce todas.

De igual manera, tiempos largos de almacenamiento a bajas temperaturas (en refrigeración), tienen como consecuencia, variaciones en las cantidades de los diferentes tipos de microorganismos colonizadores de la leche, predominando la presencia de flora psicrótrofa, formada generalmente por bacterias Gram negativas, las cuales producen enzimas que resisten al calor y que son capaces de degradar grasas y proteínas (Agüero, Pedraza y Godoy, 1987)

3.3.4 Postpasteurización

Los cambios en la leche pasteurizada refrigerada, se deben a diferentes factores de contaminación ocurridos después de realizar el tratamiento térmico. Esto es principalmente, porque al momento de realizar el proceso no se toma en cuenta todas las medidas de asepsia e higiene necesarias y porque cierto nivel de contaminación, muchas veces es imposible evitarlo, especialmente aquel que se genera por la presencia de bacterias psicrótrofas como *Pseudomonas*, *Bacillus*, las cuales son responsables de deteriorar el producto final (Gebre-Egziabher, Humbert y Blankenagel, 1980).

Según Valbuena et al. (2007), luego de realizar una pasteurización adecuada, la contaminación de la leche por microorganismos puede ocurrir de forma directa o indirecta. Se da por equipos mal lavados, mal manejo y contacto de los operarios o por caída de gotas formadas por condensación, lo que resulta un producto malo para el consumidor.

Es importante que durante el transporte y almacenamiento se manejen temperaturas adecuadas, ya que de este factor depende el tiempo de durabilidad de la leche y productos derivados. Alais (1985) por otro lado menciona que puede existir un posible proceso de recontaminación, donde la flora bacteriana que se presenta, es la psicrótrofa no esporulada, principalmente *Pseudomonas*; láctica como *Streptococcus* y psicrótrofa esporulada como *Bacillus cereus* y *Bacillus licheniformes*. Si las temperaturas de conservación son mayores a los 12°C, bacterias termodúricas son las responsables de las alteraciones ocurridas en la leche pasteurizada (Valbuena et al, 2007).

3.3.5 Bacterias Psicrótrofas

En la industria, la refrigeración sirve como un método de conservación de la leche. Las bajas temperaturas utilizadas ayudan a que bacterias mesófilas no

puedan crecer y la deterioren. Sin embargo, este proceso aumenta el desarrollo selectivo de bacterias psicrótrofas (Souza, 2005). La composición bioquímica y el alto contenido de agua que la leche tiene, sirven como sustrato para que se desarrollen. Estos microorganismos tienen una influencia negativa, ya que causan alteraciones que afectan a la calidad de los productos (Robinson y Wilbey, 2012).

La producción de leche cuando es realizada bajo buenas prácticas sanitarias, determina que las bacterias que están en las ubres y otras superficies del proceso (género *Micrococcaceae*), predominan en comparación a las psicrótrofas que están presentes en un 10% de total de la flora bacteriana. Al no ser las condiciones sanitarias de producción las adecuadas, la presencia de bacterias psicrótrofas se eleva y en la leche alcanza un 75% (Robinson y Wilbey, 2012).

El rápido enfriamiento y refrigeración de la leche ayudan a que no se acidifique ni se corte por presencia de bacterias lácticas; sin embargo, favorecen al desarrollo de bacterias psicrótrofas que son capaces de crecer a temperaturas de almacenamiento menores a 7°C. Estos microorganismos provienen del suelo, agua o forrajes. Las bacterias psicrótrofas generan con mucha frecuencia, a temperaturas bajas, proteasas y lipasas termoresistentes (Samarzija et al., 2012).

Las lipasas y proteasas son enzimas extracelulares resistentes a procesos térmicos como la pasteurización; incluso utilizando métodos más severos como UHT para inactivarlas, algunas son capaces de resistir a estos métodos más severos (Samarzija et al., 2012).

3.3.6 Enzimas degradadoras de la leche

La calidad microbiológica inicial de la leche, influye directamente en su tiempo de vida útil y en la de subproductos. Mientras más alto sea el nivel de contaminación, mayor será la cantidad de proteasas y lipasas resistentes al calor que degraden el alimento (Barbano, 2006).

Los recuentos altos de bacterias psicrotróficas producen estas enzimas, encargadas de degradar a la leche después de ser sometida a procesos térmicos. Las proteasas hidrolizan la proteína como resultado de la desestabilización de micelas de caseína, para liberar péptidos que producen en la leche sabores amargos, gelificación y bajos rendimientos (Gebre-Egziabher, Humbert y Blankenagel, 1980). En el caso de las lipasas, los ácidos grasos causados por la hidrólisis de triacilgliceroles, generan cambios organolépticos como malos olores y sabores jabonosos (Andrewes et al., 2007).

Varios géneros de bacterias gram positivas y negativas, se han aislado de leche y productos derivados almacenados en frío, siendo el más frecuente *Pseudomonas* de las cuales predominan *Pseudomonas fluorescens*, otras especies incluyen *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas Aeruginosa* (Martins, Pinto, Rocha, Araujo y Vanetti, 2006).

3.3.7 *Pseudomonas* spp.

Las bacterias de género *Pseudomonas* pertenecen al Dominio Bacteria, Filo Proterobacteria, Clase Gammaproteobacteria, Orden Pseudomonadales, Familia Pseudomonadaceae. Son Gram negativas bacilares, no formadoras de esporas, con flagelos polares, aerobias estrictas y positivas a pruebas de catalasa y oxidasa (Torres, 2013).

Éstas crecen con facilidad en agua y suelo. Su metabolismo es muy versátil gracias a que poseen plásmidos y trasposones que codifican enzimas para

degradar sustratos que ayudan al reciclado biológico de materia orgánica. Además, son microorganismos que facilitan la adhesión celular y formación de biopelículas, debido a que sintetizan exopolisacáridos. Por su capacidad de crecer en cualquier sustrato, hace que sean fuentes frecuentes de contaminación de la leche, los materiales y equipos de producción mal lavados y desinfectados. En comparación con otras bacterias psicrótroficas, las *Pseudomonas* se caracterizan por generarse en periodos cortos de tiempo (< 4 h), lo que implica que la contaminación con una célula microbiana puede llevar a números mayores a 10^6 ufc/gr o ml en leche o productos lácteos almacenados a 4°C, después de 8 días (Samarzija et al., 2012).

Las *Pseudomonas* son bacterias degradadoras, debido a la producción de enzimas extracelulares. La temperatura óptima de crecimiento de estos microorganismos psicrótrofos está entre 25-30°C, pero pueden crecer a temperaturas bajas entre -5 y 5°C. *Pseudomonas fluorescens* es la especie más común y potencialmente alterante en leche y productos lácteos (Deeth, Khusniati, Datta y Wallace, 2002).

3.3.8 Biofilms

Una característica importante de bacterias *Pseudomonas fluorescens* relacionada con la leche y los productos lácteos, es la habilidad de formar exopolisacáridos y lipopéptidos. Estos componentes forman metabolitos que permiten a los microorganismos psicrótrofos adherirse a superficies sólidas sobre las cuales pueden formar biofilms (Watnick y Kolter, 2000).

Los biofilms son estructuras heterogéneas complejas de microorganismos que crecen en superficies. Esto se debe a que, las células bacterianas al momento de adherirse a estos lugares, junto con la mezcla de agua, producen sustancias poliméricas extracelulares (EPS) para formar pastas o geles muy adhesivos (Branda, Vik, Friedman y Kolter, 2005). Garrett, et al. (2008), afirma que los

principales requisitos para que un biofilm se forme, son la presencia de microorganismos y la disponibilidad de sustrato. Si hay la ausencia de uno de éstos, los biofilms no pueden formarse.

Las EPS favorecen a los microorganismos que forman los biofilms, debido a que los protegen contra agentes microbianos; ayudan a evitar su deshidratación, porque favorecen el aprovechamiento de agua y ayudan a capturar los nutrientes que permiten su supervivencia (Carpentier y Cerf, 1993).

Todas estas circunstancias ayudan a desarrollar capacidades para su supervivencia, convirtiéndose en un problema para la industria láctea, debido a que se vuelven resistentes a la mayoría de procesos de higiene y saneamiento realizados. Los microorganismos que proliferan en maquinaria o el medio ambiente, son persistentes en la planta y sirven de reservorios de patógenos para que la leche o cualquier producto lácteo pueda contaminarse antes, durante o después del procesado (Moretro y Langsrud, 2004).

3.3.9 Factores que inciden en el desarrollo de biofilms

Una de las principales limitaciones al momento de realizar procesos de desinfección y limpieza, es el difícil acceso a lugares como grietas, zonas ciegas, ranuras y zonas corroídas. Si estos son lugares de reservorio de microorganismos para formar biofilms, la limpieza convencional realizada nunca será suficiente (Serra, 2003).

Por otro lado, la frecuencia de limpieza y los químicos utilizados, afecta el material con el que están hechos maquinaria, tuberías y utensilios utilizados en el procesamiento. Estudios anteriores han demostrado que la limpieza de una superficie inalterable como lo es el acero inoxidable, cambia sus propiedades (Sinde y Carballo, 2000).

El desgaste que llegan a tener las superficies utilizadas en el procesamiento de algunos alimentos, hace que se formen irregularidades y esto ayuda para que microorganismos y materia orgánica se alojen. Para esto es necesario una limpieza exhaustiva, tomando en cuenta un equilibrio entre la frecuencia y el mantenimiento necesario a instrumentos (Serra, 2003).

Algo a tomar muy en cuenta también es cómo se realizan las prácticas de saneamiento. La limpieza con chorros de agua o a presión, ayuda a desprender biofilms, pero al mismo tiempo los fragmenta y dispersa en gotas de aerosoles que son generados. Estas gotas permanecen suspendidas en el aire por un tiempo determinado para luego reintroducirse en equipos y zonas de la planta recién lavados y desinfectados. Esta particularidad de los aerosoles, redistribuye a biofilms de zonas esperadas de crecimiento a otras donde son menos accesibles y vigiladas; de esta forma las fuentes de contaminación por biofilms persisten y el problema no es erradicado (San José y Orgaz, 2010).

3.4 Antimicrobianos naturales

Beristain-Bauza et al. (2012), señala que en la actualidad existe una tendencia por parte de los consumidores a adquirir alimentos naturales o que hayan sido mínimamente procesados sin utilizar preservantes sintéticos. Los alimentos procesados no son bien vistos, ya que ofrecen un bajo aporte nutricional y los aditivos sintéticos utilizados para su elaboración son peligrosos para la salud. Debido a esto, existe la necesidad de crear alimentos con agentes antimicrobianos naturales que sean inocuos, que cumplan con parámetros de calidad y seguridad exigidas por las normativas y que tengan un efecto inhibitorio contra microorganismos.

Una alternativa, es el producto originado de los metabolitos secundarios de bacterias ácido lácticas que se conoce con el nombre de bacteriocinas. Según Beristain-Bauza et al. (2012), éstas son de origen proteico y tienen un efecto inhibitorio contra microorganismos patógenos o alterantes presentes en

alimentos; además de no ser tóxicas para el organismo, debido a la presencia de proteasas en el intestino que las degradan con facilidad.

El efecto de bacteriocinas es efectivo contra el crecimiento de bacterias Gram positivas (Jack, Tagg y Ray, 2011). Según Tatini et al. (1991), las bacterias Gram negativas tienen menores exigencias nutritivas y son menos sensibles a agentes bactericidas en comparación con Gram positivas. Las bacterias Gram negativas, al estar formadas por una membrana externa de lipopolisacáridos, son resistentes a estos inhibidores microbianos (Chung y Yousef, 2005). Sin embargo, estudios realizados han demostrado que la combinación de bacteriocinas con agentes quelantes como el EDTA, evita el desarrollo de bacterias Gram negativas (Rodgers, 2001).

3.4.1 Bacteriocinas comerciales utilizadas en la industria de alimentos

Nisina

La nisina es un péptido que está conformado por 34 aminoácidos, proveniente de la bacteria *Lactococcus lactis*. Es la primera bacteriocina reconocida por la FAO en el año 1969 como un preservativo de alimentos; sin embargo, en los años 80 la FDA (Food and Drug Administration) aprobó su uso como aditivo en la industria alimentaria. Es la bacteriocina más comercial y su uso es permitido para alargar la vida útil de productos lácteos pasteurizados, evitando el crecimiento de *Clostridium botulinum* y *Listeria monocytogenes*. Una de las principales características de la nisina es la de conservar su poder antimicrobiano ante tratamientos térmicos aplicados en la elaboración de algunos alimentos (Beristain-Bauza et al., 2012).

Con el desarrollo de nuevas tecnologías en la industria alimentaria y la demanda de consumidores por alimentos naturales, las bacteriocinas como la nisina han sido reconocidas como una fuente potencial de bioconservadores para alimentos. La efectividad de la aplicación de una bacteriocina puede ser determinada por sus propiedades como la estabilidad a temperaturas, pH y

espectro de acción son algunas de las más importantes. Existen otros factores que influyen también en la actividad de las bacteriocinas como su solubilidad, unión de éstas a los componentes que conforman el alimento, inactivación por proteasas y cambios en la pared o membrana celular de los microorganismos como respuesta a factores ambientales (Ingredientes y Aditivos, 2017).

La autorización del uso de bacteriocinas está en función de los alimentos en los que se va a utilizar y el propósito en los mismos. Los principales estudios toxicológicos reportados sobre bacteriocinas hasta el momento, han sido exclusivamente para la aprobación del uso de nisina como bioconservador en la industria de alimentos. Estas investigaciones han determinado que la dosis segura de nisina para el consumo humano es de 2,9 mg/día (Ingredientes y Aditivos, 2017).

En la tabla 5 se presentan los productos lácteos en los cuáles está permitido su uso y las dosis máximas, según la norma técnica ecuatoriana vigente (NTE-INEN CODEX 192-2016).

Tabla 5.

Cantidades de nisina permitidas en productos lácteos

Alimento	Dosis máxima de producto puro (mg/kg)
Nata (crema) cuajada (natural)	10
Queso madurado	12.5
Productos análogos de queso	12.5
Queso de proteínas del suero	12.5

Adaptado de: (INEN CODEX 192, 2016, p.215).

Etilen Diamino Tetra Acetato (EDTA)

El EDTA es un ingrediente que se utiliza mucho en la industria de alimentos por actuar como antioxidante, conservante y secuestrador de metales. Estas características ayudan a los alimentos a prevenir su deterioro de reacciones bioquímicas como oxidación, enranciamiento por presencia de lípidos y cambios de coloración (Ingripedia, 2017). Su capacidad secuestrante ayuda a formar complejos químicos quelados con iones metálicos, los cuales permiten atrapar iones presentes en el alimento, evitando que se estropee. En la industria se utiliza para la elaboración de condimentos y conservas, aderezos y vinagre, vitaminas, suplementos alimenticios, salsas, productos de mar, bebidas, entre otros (Ingripedia, 2017).

A continuación, en la tabla 4 se muestran las dosis máximas permitidas de algunos alimentos según la norma técnica ecuatoriana vigente (NTE-INEN CODEX 192-2016).

Tabla 6.

Cantidades de EDTA permitidas en alimentos

Alimento	Dosis máxima (mg/kg)
Productos destilados, cerveza y bebidas de malta	25
Margarina, pescados o mariscos congelados, salsas	75
Especias, condimentos, hierbas	70
Café, té, infusiones	35
Confituras, mermeladas y jaleas	130

Adaptado de: (INEN CODEX 192, 2016, p.163)

4. Materiales y métodos

4.1 Ubicación del experimento

El estudio se realizó en los laboratorios de microbiología pertenecientes a la Facultad de Ingenierías y Ciencias Agropecuarias (FICA) de la Universidad de las Américas sede Queri, Quito – Ecuador, ubicados en la calle José Queri y Avenida de los Granados 170513.

4.2 Materiales

4.2.1 Material biológico

- Cepa aislada de *Pseudomonas fluorescens* en agar King B

4.2.2 Materiales y equipos

- Ollas de acero inoxidable de 10 litros
- Tubos de ensayo
- Cajas petri plásticas
- Vaso de precipitación 250 ml.
- Matraz Erlenmeyer 250 ml.
- Micropipetas 1000 y 100 µl con puntas estériles
- Asa de vidrio
- Sistema de perlas para almacenar cultivos de bacterias CRYOBANK
- Cámara de refrigeración 6°C
- Ultracongelador marca FASTER modelo 86NV39
- Autoclave marca TUTTNAUER modelo 3870E
- Agitador magnético marca BOECO modelo MMS 3000
- Microscopio binocular marca OLYMPUS
- Cámara de bioseguridad marca FASTER modelo SAFEFAST CLASSIC 09
- Incubadora marca MEMMERT modelo INB-500 25°C
- Contador de colonias marca BOECO modelo CC-1

4.2.3 Insumos

- Leche cruda

4.2.4 Reactivos

- Sistema de identificación bioquímico Microgen ID Gn A+B-ID System marca BIOPRODUCTS
- Caldo tripticasa de soya marca OXOID

- Agar selectivo para aislamiento de *Pseudomonas* marca DIFCO
- Agar nutritivo marca DIFCO
- Solución salina
- Cristal violeta
- Solución de lugol
- Alcohol acetona
- Safranina
- Peróxido de hidrógeno al 3%
- Tiras reactivas para oxidasa CULTIMED

4.2.3 Aditivos

- Nisina 50% de pureza marca SIVEELE
- EDTA marca ARCOFARMA
- Sorbato de potasio
- Cloruro de calcio
- Cuajo

4.3 Métodos

4.3.1 Estadístico

Para determinar qué combinación de nisina + EDTA utilizada, fue diferente con respecto al crecimiento normal de *Pseudomonas fluorescens* en el queso fresco, se utilizó un análisis de varianza proponiendo las siguientes hipótesis:

H₀ = No existe diferencia en la cantidad de *Pseudomonas fluorescens* en los tratamientos (**Hipótesis Nula**).

H_a = Existe diferencia en la cantidad de *Pseudomonas fluorescens* en los tratamientos (**Hipótesis Alternativa**)

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA). Los factores de esta investigación son: tratamientos (combinaciones nisina + EDTA) y control (sin aditivos). El experimento involucra cuatro tratamientos cada uno con tres repeticiones, siendo en total 36 unidades experimentales.

Tabla 7.

Tratamientos del diseño experimental

Tratamiento 1	Nisina 25 mg/l + EDTA 75 mg/l
Tratamiento 2	Nisina 50 mg/l + EDTA 75 mg/l
Tratamiento 3	Nisina 100 mg/l + EDTA 75 mg/l
Tratamiento 4	Sin aditivos

La unidad experimental fueron quesos frescos inoculados. Se evaluó como variable el recuento de unidades formadoras de colonia de *Pseudomona fluorescens* en el queso por medio de un conteo en placa los días 5, 9 y 12.

De encontrar diferencias significativas, mediante un análisis estadístico, se realizó comparaciones de medias aplicando la prueba de Tukey con un grado de confianza del 95%. Los análisis se los hicieron con el programa Infostat versión libre. Para los datos obtenidos del día 5, se realizó una transformación de la variable utilizando la siguiente fórmula:

$$\sqrt{a + 10} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde:

a= número de unidades formadoras de colonia (ufc/g)

4.3.2 Manejo Experimental

4.3.2.1 Elaboración de Quesos

Para la obtención de queso fresco, se siguió el método propuesto por (INTI, 2011) y se elaboraron tres grupos diferentes. Cada grupo tenía quesos sin aditivos y quesos con la combinación de ambos aditivos. Los aditivos utilizados fueron nisina marca SIVEELE de 50% de pureza y EDTA marca ARCOFARMA.

La nisina fue utilizada en tres cantidades diferentes: 25 mg/l de leche, permitida por la INEN CODEX 192-2016, y 50 y 100 mg/l de leche, ubicadas sobre los límites permitidos, en función de la pureza arriba señalada y considerando la necesidad de realizar procesos de investigación comparativa. En el caso del EDTA, a pesar de que es un aditivo que no se utiliza para la elaboración de productos lácteos, se lo aplicó en una dosis de 75 mg/l de leche para observar los efectos de reacción de la nisina. A continuación, se observa el diagrama de flujo con los principales procesos realizados para la obtención de queso fresco

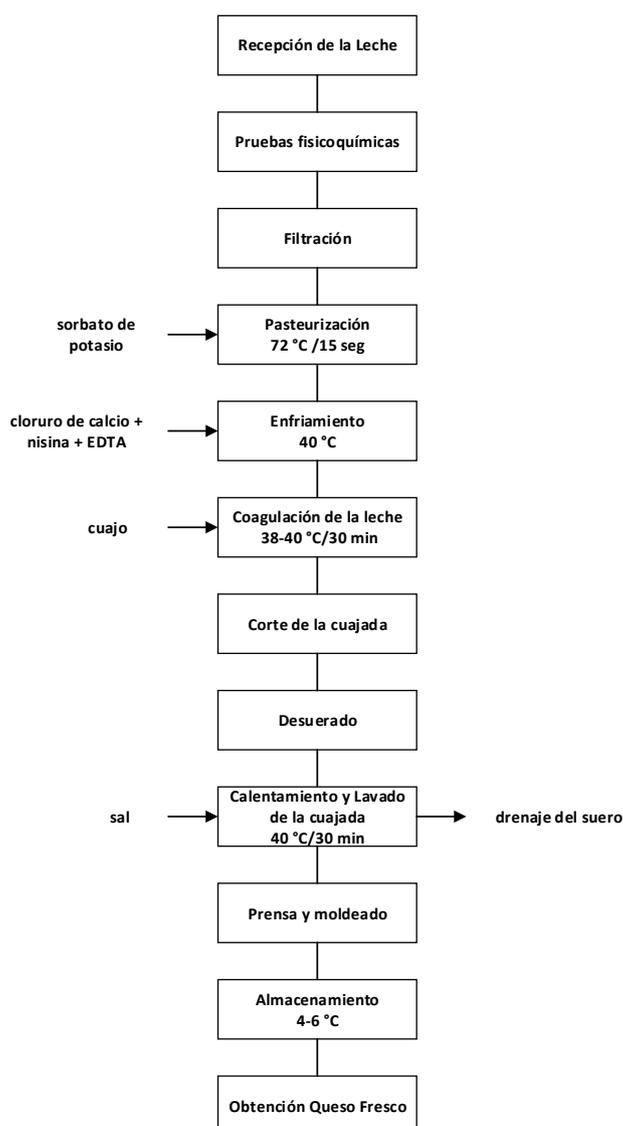


Figura 1. Proceso para la obtención de queso fresco

4.3.2.2 Inoculación de Quesos

4.3.2.2.1 Identificación bacteriana

Se adquirió de un banco de microorganismos de los laboratorios Diserlab, una cepa aislada de *Pseudomonas fluorescens* sembrada en agar King B. La confirmación Gram negativa de la bacteria se obtuvo por medio de pruebas bioquímicas realizadas de oxidasa-catalasa positiva y tinción gram, siguiendo los protocolos indicados por (Fernández, García, Sáez y Valdezate, 2010) e (ITW Reagents, 2017), respectivamente. Además, se hizo una prueba de identificación del tipo de especie, utilizando el sistema de identificación bioquímico Microgen ID Gn A+B-ID System marca BIOPRODUCTS.

4.3.2.2.2 Preparación del inóculo bacteriano e inoculación de quesos tratados

Previamente se preservó la bacteria obtenida utilizando el método CRYOBANK y almacenándola en un ultracongelador marca FASTER modelo 86NV39, a una temperatura de -80°C . A partir de esta conservación, se realizaron aislamientos en agar nutritivo para obtener colonias separadas del microorganismo, en un periodo de incubación de 24 horas a 25°C . Una de estas colonias fue transferida a un matraz Erlenmeyer con 30 ml de caldo tripticasa de soya esterilizado y se incubó a 25°C durante 24 horas. A partir de este inóculo, se realizó diluciones seriadas, sembrando 1 ml. por duplicado de cada una de éstas en placa. La dilución que presentó un recuento entre 50 y 100 ufc/ml fue la concentración establecida para inocular los quesos (Malajovich, 2017). Este procedimiento fue repetido tres veces.

Posteriormente, utilizando un atomizador y en condiciones estériles, todos los quesos con aditivos (nisina + EDTA) y sin aditivos (control) fueron inoculados por aspersión y almacenados a una temperatura de refrigeración de 6°C , durante 12 días.

4.3.2.3 Evaluación y recuento microbiano de queso fresco

Para el análisis microbiológico de quesos, se utilizó el método de recuento de colonias en placa, descrito en la “Norma Técnica Ecuatoriana de microbiología de los alimentos para consumo humano y animal, NTE INEN ISO 4833” (INEN I. , 2014). Este recuento de microorganismos se lo realizó en los días 5, 9 y 12 del periodo de vida útil del queso fresco. En condiciones estériles, utilizando una cabina de bioseguridad marca FASTER modelo SAFEFAST CLASSIC 09, se tomaron muestras de 10 g de cada queso para homogeneizarlas con 90 ml. de solución salina por 2 minutos a baja velocidad en un agitador magnético marca BOECO modelo MMS 3000. A partir de estos homogenatos, se realizaron diluciones correspondientes hasta 10^{-5} . La siembra por duplicado de 100 μ l de cada dilución obtenida, se la realizó en un medio exclusivo para crecimiento de *Pseudomonas*, previamente esterilizado en un autoclave de marca TUTTNAUER modelo 3870E. Cada placa fue colocada en una incubadora marca MEMMERT modelo INB-500 a 25°C durante 24 horas, para observar el crecimiento de microorganismos.

El conteo de unidades formadoras de colonia se hizo por medio de un contador de colonias marca BOECO modelo CC-1. Las placas consideradas para la toma de datos fueron aquellas que presentaron un recuento entre 30 y 300 ufc. Placas con un crecimiento mayor o inferior a este rango de colonias, fueron descartadas. (Camacho, Serrano y Ortegón, 2009).

5. Resultados y Discusión

A continuación, se muestran los resultados estadísticos obtenidos del proceso de medición para cada uno de los tratamientos de estudio. Para llevar a cabo este análisis se debe aclarar, que son cuatro tratamientos de los cuales uno es de control y los tres restantes fueron las combinaciones de EDTA con nisina.

5.1 Evaluación *in vitro* de las combinaciones de nisina + EDTA sobre el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en el queso fresco

5.1.2 Evaluación de tratamientos mediante el recuento microbiano de *Pseudomonas fluorescens* Día 5

En el análisis de cada uno de los tratamientos (Tabla 8) en el día 5, se observó que existen diferencias significativas, por lo que fue necesario realizar una comparación más profunda de las medias. Los resultados (figura 2) reflejan que T3 (nisina 100 mg/l + EDTA 75 mg/l) presentó menor recuento de microorganismos ($0,00 \pm 0,00$ ufc/g), seguido por T2 ($12333,33 \pm 2516,61$) y T1 ($2800,00 \pm 2000$ ufc/g). Este último tiene valores más cercanos al tratamiento control.

Tabla 8.

Análisis de varianza de las combinaciones de nisina + EDTA para la inhibición de Pseudomonas fluorescens en el queso fresco día 5 (con transformación de variable)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F
Total	11	59064,80		
Tratamientos	3	58718,87	19572,96	452,65*
Error experimental	8	345,93	43,24	
CV%	5,69			

Nota 1: *: Significativo, NS: No significativo

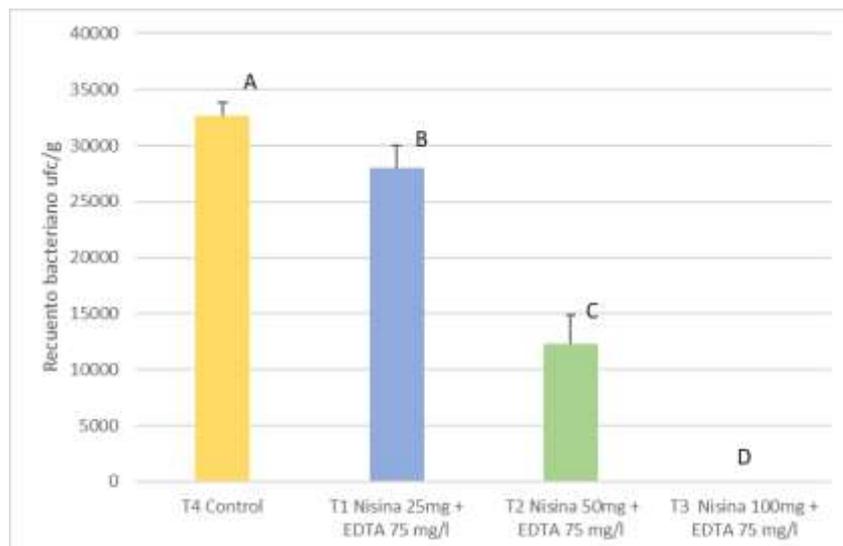


Figura 2. Comparación entre tratamientos según el crecimiento de bacterias de la especie *Pseudomonas fluorescens* Día 5

De acuerdo con la figura 2, la nisina y el EDTA son efectivas para reducir la proliferación de las bacterias en el queso fresco. Esto confirma lo expuesto en estudios anteriores de Stevens et al. (1991) donde la disminución de poblaciones de microorganismos Gram negativos por nisina, se facilitan por la presencia de EDTA. Bacteriocinas como la nisina, no pueden actuar contra Gram negativas, debido a que la capa de fosfolípidos y lipoproteínas que cubren a la membrana, utiliza sales como el magnesio para volverse más resistente y estable.

5.1.3 Evaluación de tratamientos mediante el recuento microbiano de *Pseudomoma fluorescens* Día 9

En la tabla 9 se observa que existen diferencias significativas entre las medias de crecimiento de los microorganismos de *Pseudomonas fluorescens* con respecto a cada combinación de los aditivos de nisina y EDTA. De acuerdo con los resultados de la figura 3, Tratamiento 3 ($16666,7 \pm 2082$ ufc/g) mantuvo un promedio de microorganismos muy por debajo del tratamiento 2 ($27333,33 \pm 1527,53$) y del tratamiento 1 ($46666,67 \pm 1527,53$). La presencia de los

microorganismos fue mayor cuando el queso fresco no tenía los aditivos en el tratamiento control ($64333,33 \pm 3055,05$).

Tabla 9.

Análisis de varianza de las combinaciones de nisina + EDTA para la inhibición de Pseudomonas fluorescens en el queso fresco día 9

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F
Total	11	4042250000,00		
Tratamientos	3	4005583333,33	1335194444,44	291,32*
Error experimental	8	36666666,67	4583333,33	
CV%	5,52			

Nota: *: Significativo, NS: No significativo

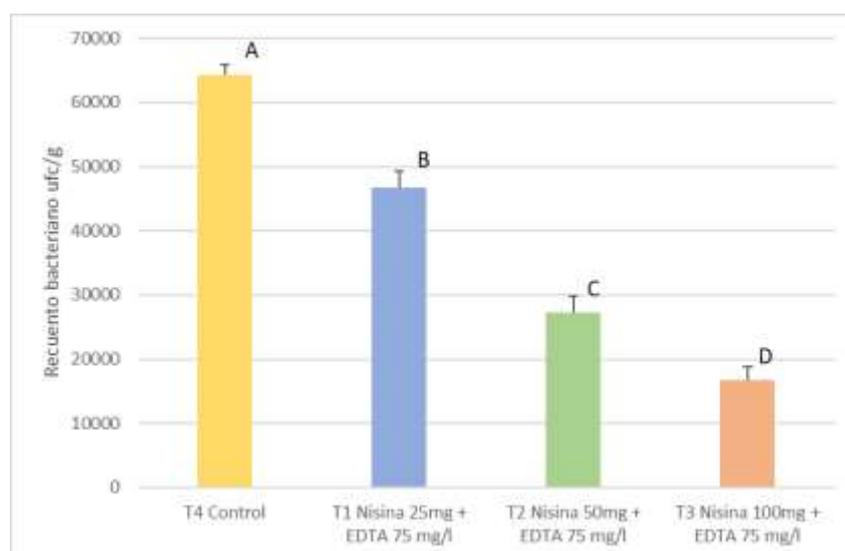


Figura 3. Comparación entre tratamientos según el crecimiento de bacterias de la especie Pseudomonas fluorescens Día 9

En lo que respecta a la nisina, al aumentar la cantidad de este aditivo, se disminuye la proliferación de las bacterias. Esto se comprueba con el bajo recuento microbiano que presenta el tratamiento 3 con nisina 100 mg/l + EDTA

75 mg/l, siendo el más efectivo para disminuir la proliferación de *Pseudomonas fluorescens* en el queso fresco. Los quesos con menor cantidad de nisina, es decir 25 mg/l, que en realidad son los 12,5 mg/l permitidos por la INEN CODEX 192-16 (generalmente la nisina se expende a una pureza del 50%) y 50 mg/l, presentan un crecimiento mayor. Se cita el estudio realizado por Stevens et al. (1991), en el cual se comprobó que, a mayores concentraciones de esta bacteriocina (nisina), mayor era la magnitud de inactivación de crecimiento de Gram negativas.

5.1.4 Evaluación de tratamientos mediante el recuento microbiano de *Pseudomoma fluorescens* Día 12

En el siguiente análisis de varianza (Tabla 10), se estableció un coeficiente de variación (error de muestreo) de 3,36%. Además, se observa diferencias significativas entre tratamientos. De acuerdo a la figura 4, al tomar como referencia al tratamiento control, el comportamiento del T1 nisina 25 mg/l + EDTA 75 mg/l ($76000 \pm 2645,75$) es muy parecido, aunque en este último la proliferación de las bacterias es menor a los 12 días. Con respecto a T2 nisina 50 mg/l + EDTA 75 mg/l ($64333,33 \pm 256,16$), se observa una disminución en los valores de las medias de ufc/g en comparación con el testigo y el tratamiento 1, lo que indica que su efectividad es mayor. Por su parte T3 nisina 100 mg/l + EDTA 75 mg/l ($29333,33 \pm 2081,67$) se observa que, durante los 12 días mantuvo la mayor diferencia en retardar el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* en comparación al control, tratamiento 1 y tratamiento 2, con valores más bajos.

Tabla 10.

Análisis de varianza de las combinaciones de nisina + EDTA para la inhibición de Pseudomonas fluorescens en el queso fresco día 12

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F
Total	11	7139000000,00		
Tratamientos	3	7099000000,00	2366333333,33	473,27*
Error experimental	8	40000000,00	5000000,00	
CV%	3,36			

Nota: *: Significativo, NS: No significativo

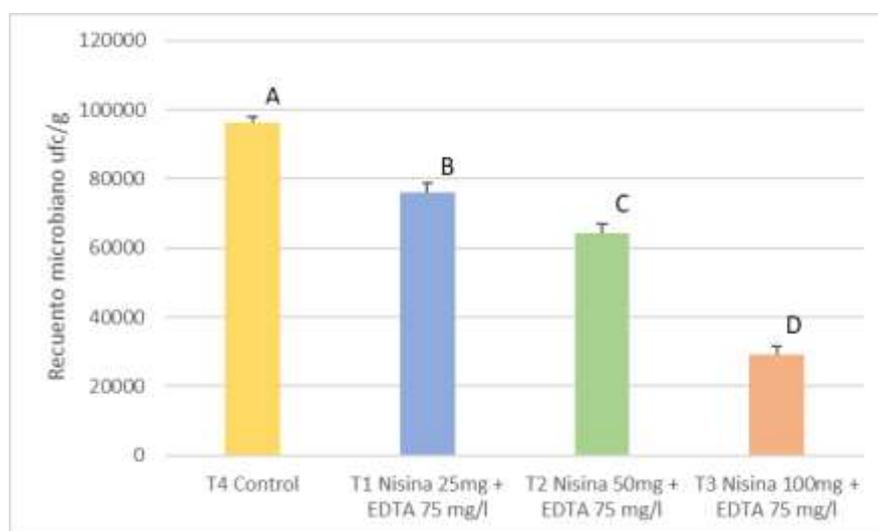


Figura 4. Comparación entre tratamientos según el crecimiento de bacterias de la especie Pseudomonas fluorescens Día 12

En los tres tratamientos, la cantidad de 75 mg/l de EDTA ayudó a la efectividad de la nisina contra *Pseudomonas fluorescens*. Esto se puede comparar con un estudio realizado por Delves-Broughton (1993), donde se evaluó la interacción de la nisina con diferentes concentraciones del quelante. El autor concluyó que, a concentraciones menores a 100 mg, es cuando la nisina presenta mayor inhibición frente a microorganismos Gram negativos.

Además, para la cantidad de EDTA utilizada se optó por una dosis baja, ya que en lácteos no hay ninguna experiencia previa de su aplicación, debido a que su utilización aparentemente no presenta ventaja en este tipo de productos y no es un aditivo contemplado por la INEN CODEX 192-16. En este estudio se analiza precisamente la importancia que este aditivo pueda tener y por medio de la realización de más investigaciones, contemplar una posible reforma de la INEN CODEX 192-16 que permita ampliar los procesos de investigación.

Por otro lado, los quesos frescos que tuvieron cantidad de microorganismos por encima de $6,8 \times 10^4$ ufc/g en el día 12, especialmente con el control y tratamiento 1, presentaron cambios en sus cualidades organolépticas. González et al. (2007) señala que, al aumentar el nivel de recuento de bacterias psicrótrofas, la vida útil del producto disminuye y derivados lácteos que presentan recuentos microbianos de *Pseudomonas* mayores a 7×10^4 ufc/g, tienen más cambios en sus características sensoriales.

Como se observa en las figuras 5, 6 y 7 los quesos presentaron daños como: consistencia blanda, formación de mucosidad, mal olor y aparición de pigmentos azules en la superficie.



Figura 5. Características visuales del queso fresco (día 5).



Figura 6. Características visuales del queso fresco (día 9)



Figura 7. Características visuales del queso fresco (día 12).

6. Conclusiones y Recomendaciones

6.1 Conclusiones

La nisina inhibe el crecimiento de bacterias del género *Pseudomonas* en el queso fresco, cuando esta es combinada con un agente quelante como el EDTA. Los resultados del recuento en placa de unidades formadoras de colonia a los 12 días fueron T3 nisina 100 mg/l + EDTA 75 mg/l ($29333,3 \pm 2081,7$ ufc/g), T2 nisina 50 mg/l + EDTA 75 mg/l ($64333,3 \pm 2516,6$ ufc/g), T1 nisina 25 mg/l + EDTA 75 mg/l ($76000 \pm 2645,7$ ufc/g) y T4 sin aditivos ($96333,3 \pm 1527,5$ ufc/g), siendo el tratamiento control el que mayor recuento microbiano presentó.

La utilización de la concentración de nisina con EDTA, permitida por la INEN-CODEX 192-16 (12,5 mg/l), retarda parcialmente el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens*. pero no es suficiente para evitar que afecten las cualidades organolépticas del queso fresco, durante su tiempo de vida útil.

Las concentraciones de 50 y 100 mg/l de nisina, fuera de la norma INEN CODEX 192-16, retardan aún más el crecimiento de las *Pseudomonas*, pero no es posible utilizarlas al momento porque sobrepasan los límites permitidos.

La concentración de 75 mg/l de EDTA mejora la acción de la nisina para retardar la proliferación de *Pseudomonas fluorescens* en el queso fresco.

La contaminación en el queso fresco por microorganismos de *Pseudomonas fluorescens* afectan las cualidades organolépticas del producto, produciendo malos olores, textura pegajosa con consistencia blanda y aparición de pigmentos azules en su superficie, que lo hace no apto para el consumo.

Conforme transcurren los días de vida útil del queso fresco, los microorganismos siguen creciendo a pesar de que la nisina + EDTA están presentes.

6.2 Recomendaciones

Realizar nuevas investigaciones para analizar la acción de EDTA + nisina sobre otro tipo de microorganismos, que afectan la calidad de los alimentos y de esta forma tener más pruebas valederas de su uso.

Utilizar concentraciones de EDTA diferentes que permitan determinar si la nisina pueda aumentar su poder inhibitorio en dosis más bajas permitidas por la INEN CODEX 192-16 contra bacterias del género *Pseudomonas*

Efectuar el análisis para el uso de otros agentes quelantes, como el ácido cítrico o fosfatos, que junto con la nisina puedan cumplir la misma función que el EDTA, obteniendo mejores resultados de inhibición de crecimiento de bacterias Gram negativas en queso fresco.

Se recomienda realizar un nuevo estudio del tema con un número mayor de repeticiones para evaluar de mejor manera el efecto que tienen estos aditivos sobre los microorganismos Gram negativos en queso fresco y lograr mayor precisión en los resultados.

REFERENCIAS

- Agüero H., Pedraza C., Godoy, S. (1987). Calidad higiénica del agua y su relación con el contenido microbiano de la leche. Recuperado el 3 de octubre de 2017 de http://www.chileanjar.cl/files/V47I2A08_es.pdf
- Alais C. (1985). *Ciencia de la leche*. Principios de técnica lechera. Barcelona-España: Editorial Reverté.
- Andrewes, P., Broome, A., Hill, B., Holland, R., Mills, O. y Newstead, D. (2007). *Detection of lipase in skim and whole milk powders using triheptanoin as a substrate*. *International Dairy Journal* 17. 587-595.
- Badui, S. (2006). Química de los alimentos. Recuperado el 10 de octubre de 2017 de <https://deymerg.files.wordpress.com/2013/07/quimica-de-los-alimentos1.pdf>
- Barbano, D., Ma, Y. y Santos, M. (2006). *Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life*. Recuperado el 10 de octubre de 2017 de <http://qualileite.org/pdf/Artigos-cientificos-publicados-em-periodicos/2006-2007/8.pdf>
- Beristain-Bauza, S., Palou, E. y López, A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en alimentos. Recuperado el 12 de octubre de 2017 de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-62Beristain-Bauza-et-al-2012.pdf>
- Branda, S., Vik, A., Friedman, L. y Kolter, R. (2005). *Biofilms: the matrix revisited*. Recuperado el 1 de noviembre de 2017 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X04002604>
- Camacho, A., Serrano, B. y Ortegón, A. (2009). Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos. Recuperado el 29 de agosto de 2017 de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa_6527.pdf
- Carpentier, B. y Cerf, O. (1993). *Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry*. Recuperado el 20 de octubre de 2017 de

http://www.academia.edu/14911813/Biofilms_and_their_consequences_with_particular_reference_to_hygiene_in_the_food_industry

- Carrillo, B., González, M., Schobitz, R., Molina, L. y Brito, C. (2004). Niveles de contaminación microbiológica en equipos de recepción y almacenamiento de leche, en centros de acopio de la provincia de Valdivia. Recuperado el 6 de octubre de 2017 de <http://mingaonline.uach.cl/pdf/agrosur/v32n2/art05.pdf>
- Chung, H. y Yousef, A. (2005). *Lactobacillus curvatus* produces a bacteriocin like agent active against gram negative pathogenic bacteria. Recuperado el 12 de octubre de 2017 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1745-4565.2005.00557.x/full>
- Conrado, C., Millán, R., Lupiola, P., Quintana, C. y SanJuan, E. (2015). *Blue pigment in fresh cheese produced by Pseudomonas fluorescens*. Recuperado el 12 de agosto de 2017 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515000444>
- Deeth, H., Khusniati, T., Datta, N. y Wallace, R. (2002). *Spoilage patterns of skim and whole milks*. Recuperado el 6 de octubre de 2017 de <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-dairy-research/article/spoilage-patterns-of-skim-and-whole-milks/0AFCBD03B38207DD38AF81DCD9ABE3FF>
- Delves- Broughton J. (1993). *The use of edta to enhance the efficacy of nisin towards gram negative bacteria*. Recuperado el 25 de octubre de 2017 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/096483059390042Z>
- Fernández, A., García, C., Sáez, J. y Valdezate, S. (2010). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Recuperado el 25 de agosto de 2017 de https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientos_microbiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf
- Garrett, T., Bhakoo, M. y Zhang, Z. (2008). *Bacterial adhesion and biofilms on surfaces*. Recuperado el 12 de octubre de 2017 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1002007108002049>

- Gebre-Egziabher, A., Humbert, E. y Blankenagel, G. (1980). *Hydrolysis of milk proteins by microbial enzymes*. Recuperado el 25 de octubre de 2017 de <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-43.9.709?code=fopr-site>
- González, S., López, N, Novoa, C. y Restrepo, L. (2007). Influencia de la bacteria *pseudomona fluorescens* en la leche, sobre las características sensoriales del queso doble crema. Recuperado el 23 de noviembre de 2017 de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/remvez/article/viewFile/10697/14257>
- Heer G. (2007). *Microbiología de la leche*. Recuperado el 5 de octubre de 2017 de <http://www.fcv.unl.edu.ar/archivos/grado/catedras/tecnologialeche/informacion/microbiologia.pdf>
- INEN (2012). Norma general para quesos frescos no madurados. Recuperado el 15 de octubre de 2017 de <https://archive.org/stream/ec.nte.1528.2012#page/n1/mode/2up>
- INEN (2015). Norma técnica ecuatoriana de leche cruda. Recuperado el 12 de octubre de 2017 de http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/07/nte_inen_009_6r.pdf
- INEN (2014). Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Recuperado el 20 de octubre de 2017 de <http://apps.normalizacion.gob.ec/descarga/>
- INEN (2016). Norma general para los aditivos alimentarios NTE INEN CODEX 192-2016. Recuperado el 25 de agosto de 2017 de <http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/ACTUALIZACION/04112014/192-CODEX-UNIDO.pdf>
- Ingredientes y Aditivos. Nisina un conservante alimenticio natural. Recuperado el 17 de octubre de 2017 de http://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201610/2016100943561001477573436.pdf.

- Ingripedia. Edta disódico. Recuperado el 5 de noviembre de 2017 de <http://hablemosclaro.org/ingripedia/edta-disodico/#1502295071259-27370acc-ff9b>
- INTI. (2011). Lácteos: queso artesanal y ricotta. Recuperado el 20 de agosto de 2017 de <https://www.inti.gob.ar/lacteos/pdf/Cuadernillo-QuesoArtesanalyRicotta-2.pdf>
- ITG-ILL. (2004). El empleo responsable de medicamentos en explotaciones ganaderas. . Recuperado el 30 de septiembre de 2017 de http://www.mapama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/Empleo_responsable_de_medicamentos_en_explotaciones_ganaderas._Legislacion_C3%B3n%2C_riesgos_y_m%C3%A9todos_anal%C3%ADticos._ITG_ganadero._tcm7-159587.pdf
- ITW Reagents. Tinción de gram-hucker. Recuperado el 18 de octubre de 2017 de https://www.itwreagents.com/itwreagents_files/ce_ivd_instructions/CEIVD11/es_ES.pdf.
- Jack, R., Tagg, R. y Ray, B. (2011). *Bacteriocins of gram-positive bacteria*. Recuperado el 16 de octubre de <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.319.2766&rep=rep1&type=pdf>
- Karama, M., Sechi, P., Lulietto, M., Novelli, S. y Mattei, S. (2014). *Evolution under different storage conditions of anomalous blue coloration of mozzarella cheese intentionally contaminated with a pigment-producing strain of Pseudomonas fluorescens*. Recuperado el 20 de octubre de 2017 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030214006092>
- Malajovich, M. (2017). Guías de actividades biotecnología: enseñanza y divulgación. Recuperado el 10 de octubre de 2017 de https://bteduc.com/guias_es/87_El_numero_de_bacterias.pdf.
- Martins, M., Pinto, C., Rocha, R., Araujo, E. y Vanetti, M. (2006). *Genetic diversity of gram negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk*. Recuperado el 10 de octubre de 2017 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160506003011>

- Ma, J.; Ryan, C.; Barbano, D.; Galton, D.; Rudan, M.; Boor, K. (2000). *Effects of somatic cell count on quality and shelf life of pasteurized fluid milk*. Recuperado el 15 de octubre de 2017 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030200748739>
- Moretro, T., Langsrud, S. (2004). *Listeria monocytogenes: biofilm formation and persistence in food processing environments*. *Biofilms Vol.1*, 107-121.
- Muñoz, S. (2004). Perfil microbiológico de la leche de estanque de tres centros de acopio lecheros (CAL) de la Provincia de Valdivia. Recuperado el 20 de octubre de 2017 de <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2004/fam971p/pdf/fam971p-TH.1.pdf>
- Orozco, M. (2015). Un tercio de la producción láctea se dedica al queso. Recuperado el 6 de octubre de 2017 de <http://www.revistalideres.ec/lideres/ecuador-produccion-lactea-queso.html>
- Potter, N. (1999). *Ciencia de los alimentos*. Zaragoza-España: Editorial Acribia S.A., p. 667
- Ramírez, C. (2012). Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. Recuperado el 15 de octubre de 2017 de <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-62Ramirez-Lopez-et-al-2012.pdf>
- Robinson, R. y Wilbey, R. (2002). *Fabricación de queso*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Rodgers, S. (2001). *Preserving non fermented refrigerated foods with microbial cultures-a review*. Recuperado el 12 de octubre de 2017 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224401000930>
- Samarzija, D., Zamberlin, S., Pogacic, T. (2012). *Pshychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality*. Recuperado el 25 de octubre de 2017 de <https://hrcak.srce.hr/file/124020>
- San José, C. y Orgaz, B. (2010). Las biopelículas microbianas, un búnker de uso habitual. Recuperado el 10 de octubre de 2017 de <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/view/1110/1127>.

- Serra, G. (2003). Estudio del biofilm: formación y consecuencias. Recuperado el 18 de noviembre de 2017 de http://www.adiveter.com/ftp_public/A1070308.pdf
- Sinde, E. y Carballo, J. (2000). *Attachment of salmonella spp. and listeria monocytogenes to stainless Steel, rubber and polytetrafluoretethylene: the influence of free energy and the effect of comercial sanitizers*. Recuperado el 12 de noviembre de 2017 de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002000903393>
- Souza, R. (2005). Condiciones microbiológicas y evaluación de la pasteurización en muestras de leches comercializadas en el municipio de Piracicaba. Recuperado el 30 de octubre de 2017 de www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/.../tde.../RicardoOliveira.pdf
- Stevens, K., Sheldon, B., Klapes, A. y Klaenhammer, T. (1991). *Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other Gram-negative bacteria*. Recuperado el 25 de octubre de 2017 de <http://aem.asm.org/content/57/12/3613.full.pdf+html>
- Tatini, S., Mekala, P., El-Habaz, A y Griffiths, M (1991). *Rapid detection of psychrotrophic bacteria in manufacturing grade raw milks*. Recuperado el 1 de noviembre de 2017 de <http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-54.11.861?code=fopr-site>
- Torres, L. (2013). Estrategias de identificación de genes de proteasas en una cepa de Pseudomona fluorescens alterante de la leche. Recuperado el 21 de octubre de 2017 de http://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/10651/18230/6/TFM_Lidia%20Rodrigo%20Torres.pdf
- Valbuena, E., Castro, G., Lima, K., Acosta, W., Briñez, W. y Tovar, A. (2004). Calidad microbiológica de las principales marcas de leche pasteurizada distribuidas en la ciudad de Maracaibo, Venezuela. Recuperado el 10 de octubre de 2017 de <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/28016/2/art8.pdf>

Watnick, P. y Kolter, R. (2000). *Biofilm, City of Microbes*. Recuperado el 22 de octubre de 2017 de <http://jb.asm.org/content/182/10/2675.full.pdf+html>

ANEXOS

Anexo 1. Elaboración de Queso Fresco



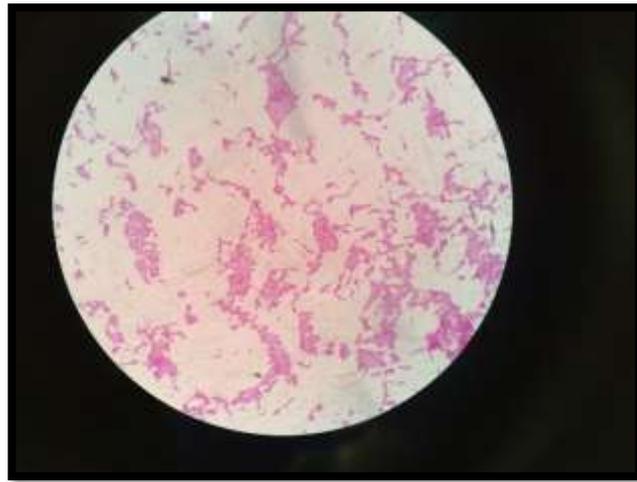
Anexo 2. Uso del Sistema de Identificación Microgen ID



Anexo 3. Pruebas Bioquímicas Oxidasa y Catalasa Positivas

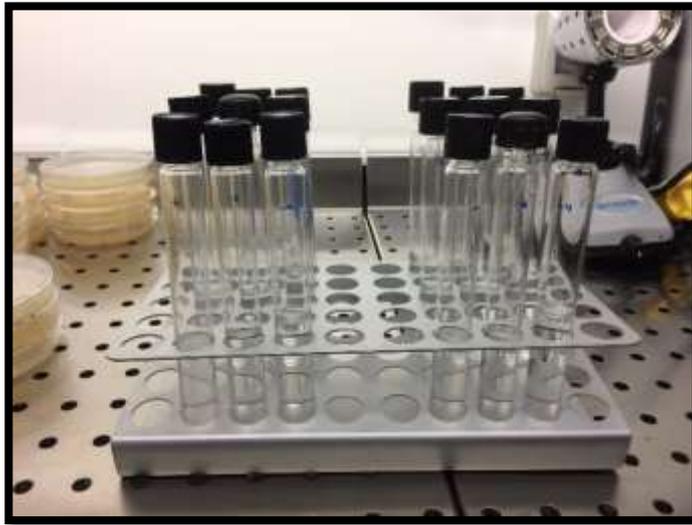


Anexo 4. Prueba Tinción Bacilos Gram Negativos

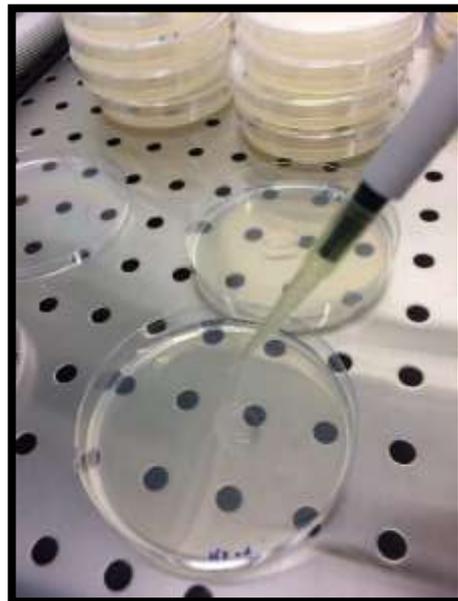


Anexo 5. Toma de Muestras de Queso

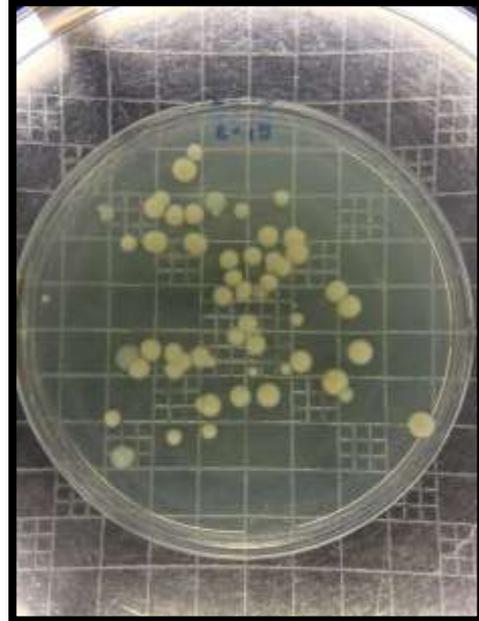
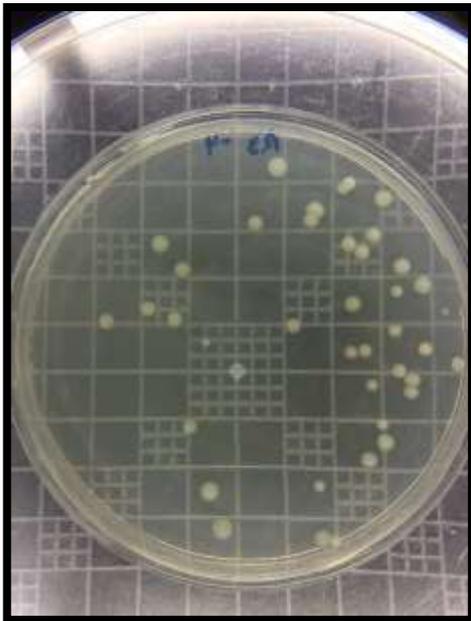
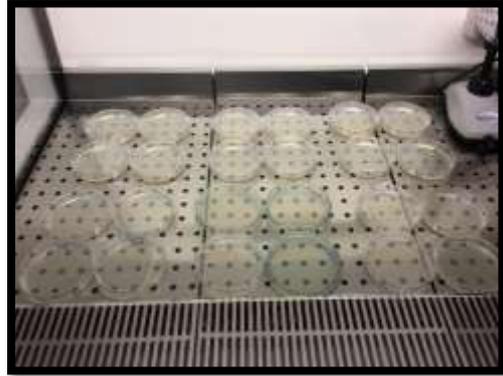
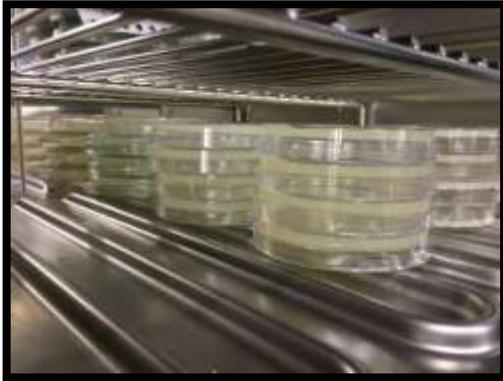




Anexo 6. Inoculación de muestra y siembra en placa



Anexo 7. Incubación y recuento de colonias



Anexo 8. Aditivos utilizados



Anexo 9. Ficha Técnica Nisina



Technical Sheet Niseen®-S

TECHNICAL SHEET Think natural.® Niseen®-S

Think natural.® Niseen®-S

Natural antimicrobial - Material no. SBR101

Description

Nisin, the active ingredient in Niseen®-S, is a natural protective ingredient consists of several closely related polypeptides used to prevent spoilage and extend shelf life of various foods by inhibiting Gram-positive spoilage and pathogens.

Functional uses

Natural antimicrobial preservative, against Gram-positive bacteria. It is effective in a variety of applications, including processed cheese and cheese spreads, blended cheese, club cheese, direct acidified fresh cheese, natural ripened cheese; cream products; dairy and fat based desserts, yoghurt, flavoured milk and milk drinks; fruit and vegetable preparations; dips and snacks; pasteurised liquid egg products; slices and toppings; canned food; processed meats and fermentation products such as beer.

Key benefits

- Natural and non-animal source
- Effectively inhibit Gram-positive bacteria, and controls pathogens, such as Clostridium botulinum, Listeria monocytogenes, and Bacillus cereus
- Extends shelf life
- Reduces processing time and lower processing temperature
- Effective over a wide range of pH values (3-8)
- Secures desired food flavors
- Improves cost efficiency due to the low dosage rate used
- Meets consumer demands for food protected with natural antibacterial by fully or partially replacing synthetic additives

Usage levels

The recommended dosage of Niseen®-S is in the range 25-500 mg per kg or litre of food. The actual dosage depends on the nature of the product for which it is intended.

Directions for use

Niseen®-S should be added to heat processed foods by through dispersion in the food substrate prior to the heating process. Niseen®-S can be added directly to the food as a dry powder or as a pre-suspension in water or milk. In certain processing situations there may be potential for adding Niseen®-S by other methods, such as dipping or after a fermentation process, e.g. stirred yoghurt. Advice should be sought for these more specialised food application areas.

The information contained herein is provided in good faith and, to the best of our knowledge, is true and correct. It may be subject to change without further notice. This information is offered solely for your consideration and verification. Siveele B.V.

Minervum 7113 | 4817 ZN Breda | The Netherlands
T +31(0)76 571 02 22 | F +31(0)76 571 37 88
info@siveele.nl | www.siveele.nl

Chamber of Commerce 20169798
VAT 822228142801
Rabobank 1222 58 150
IBAN NL23RABO0122258150
BIC RABONL2U



Think natural.[®] Niseen[®]-S

Natural antimicrobial - Material no. SBR101

Composition	Specifications*
Nisin (E 234)	Min. 1,000 IU/mg
Sodium chloride	Min. 50%
Physical/chemical properties	Specifications*
Appearance at 20°C	Powder
Colour	Off-white to light tan
pH of 10% solution	3,3 - 3,8
Loss on drying	Max. 3%
Arsenic	Max. 1 mg/kg
Lead	Max. 1 mg/kg
Mercury	Max. 1 mg/kg
Microbiological properties	Specifications*
Total plate count	Max. 10 cfu/g
Salmonella in 25 g	Absent
Coliform bacteria	Max. 30 MPN/100g
E.coli in 25 g	Absent
Nutritional data	
Energy	200 kJ/100 g
Protein	5 g/100 g
Carbohydrate	6,5 g/100 g
Fat	0,3 g/100 g
Ash	87 g/100 g
Moisture	1,2 g/100 g
Total sodium	32,5 g/100 g

The information contained herein is provided in good faith and, to the best of our knowledge, is true and correct. It may be subject to change without further notice. This information is offered solely for your consideration and verification. Siveele B.V.

2 van 4

Minervum 7113 | 4817 ZN Breda | The Netherlands
T +31(0)76 571 02 22 | F +31(0)76 571 37 88
info@siveele.nl | www.siveele.nl

Chamber of Commerce 20169798
VAT 822228142B01
Rabobank 1222 58150
IBAN NL23RABO0122258150
BIC RABONL2U



Think natural.® Niseen®-S

Natural antimicrobial - Material no. SBR101

Allergens

According to EU Directive 2000/13/EC amended by Directive 2007/68/EC

	PRESENCE Yes/No	COMMENTS
Cereals containing gluten (wheat, rye, barley, oats, spelt, kamut or their hybridised strains) and products thereof	NO	Barley source used as raw material fermentation nutrient.
Crustaceans and products thereof	NO	
Eggs and products thereof	NO	
Fish and products thereof	NO	
Peanuts and products thereof	NO	
Soybeans and products thereof	NO	
Milk and products thereof (including lactose)	NO	
Nuts i. e. almond (<i>Amygdalus communis</i> L.), hazelnut (<i>Corylus avellana</i>), walnut (<i>Juglans regia</i>), cashew (<i>Anacardium occidentale</i>), pecan nut [<i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch], Brazil nut (<i>Bertholletia excelsa</i>), pistachio nut (<i>Pistacia vera</i>), macadamia nut and Queensland nut (<i>Macadamia ternifolia</i>) and products thereof	NO	
Celery and products thereof	NO	
Mustard and products thereof	NO	
Sesame seeds and products thereof	NO	
Sulphur dioxide and sulphites at concentrations of more than 10 mg/Kg or 10 mg/litre expressed as SO ₂	NO	
Lupin and products thereof	NO	
Molluscs and products thereof	NO	

The information contained herein is provided in good faith and, to the best of our knowledge, is true and correct. It may be subject to change without further notice. This information is offered solely for your consideration and verification. Siveele B.V.

Minervum 7113 | 4817 ZN Breda | The Netherlands
T +31(0)76 571 02 22 | F +31(0)76 571 37 88
info@siveele.nl | www.siveele.nl

Chamber of Commerce 20169298
VAT 822228142B01
Rabobank 1222.58.150
IBAN NL23RABO0122258150
BIC RABONL2U



Think natural.® Niseen®-S

Natural antimicrobial - Material no. SBR101

GMO status

According to regulations EC no. 1829/2003 and 1830/2003: The raw materials and processing aids used in the production of this product do not contain or consist of GMOs, and are not produced from GMOs.

Storage

Product should be stored in cool (<25°C) and dry conditions (<65% RH). When opened, store between 4-25°C in original package in dry conditions, away from direct sunlight.

Shelf life

24 months from date of production when stored according to recommendations.

Packaging

10 kg per carton / 20 x 500 gram jars

Legal status

The active ingredients Nisin in Niseen®-S is food grade and complies with Commission Regulation (EU) No 231/2012 (9 March 2012). Nisin complies with purity characteristics set forth by EU regulations, US FDA Code, FAO/WHO and Food Chemical Codex. The regulations governing the use of Nisin vary considerably in the countries in which it is currently approved. Local food and/or feed regulations should always be consulted concerning the status of this product, as legislation regarding its use in food or feed may vary from country to country.

Safety and handling

A Material Safety Data Sheet (MSDS) is available on request.

Country of origin

The Netherlands

The information contained herein is provided in good faith and, to the best of our knowledge, is true and correct. It may be subject to change without further notice. This information is offered solely for your consideration and verification. Siveele B.V.

Minervum 7113 | 4817 ZN Breda | The Netherlands
T +31(0)76 571 02 22 | F +31(0)76 571 37 88
info@siveele.nl | www.siveele.nl

Chamber of Commerce 20169798
VAT 822228142B01
Rabobank 1222 58150
IBAN NL23RABO0122258150
BIC RABONL2U

4 van 4

Anexo 10. Ficha Técnica EDTA (grado alimentario)

FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA

EDTA SAL DISODICA

Sinónimos:	Edetato disódico. Etilendiaminotetraacetato disódico. Edatamil disódico. Tetracemato disódico. Versenato disódico.
Formula Molecular:	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$
Peso Molecular:	372,24
Datos Físico-Químicos:	Polvo cristalino, blanco o casi blanco. Soluble en agua, prácticamente insoluble en etanol al 96%. Punto de fusión: 252°C (descompone).
Propiedades y usos:	<p>El EDTA y sus sales se utilizan principalmente como agentes quelantes de iones divalentes o trivalentes en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria.</p> <p>Se absorbe muy poco a nivel gastrointestinal. Forma un complejo estable y soluble con el calcio, fácilmente excretado por el riñón.</p> <p>También se utilizan como antioxidantes, solos o como sinérgicos de otros antioxidantes, por secuestrar trazas de iones metálicos (como cobre, hierro, manganeso...), que pueden catalizar reacciones de oxidación.</p> <p>La sal disódica se utiliza por vía intravenosa en el tratamiento de emergencia de la hipercalcemia y en el control de arritmias cardíacas inducidas por digitálicos.</p> <p>También se ha usado en la terapia de opacidades calcificadas de la córnea y de quemaduras por cal del ojo, bien tópicamente después de eliminar el área epitelial o por iontoforesis.</p> <p>El edetato disódico se emplea también en irrigaciones para el tratamiento de lesiones oculares por cloruro de cinc, aunque puede ser ineficaz si no se trata durante los 2 primeros minutos.</p> <p>Así mismo se emplea en preparados para la limpieza de lentes de contacto.</p>
Dosificación:	<p>-Agente quelante y sinérgico de antioxidantes: 0,005 – 0,1%.</p> <p>-Hipercalcemia y control de arritmias por digitálicos: en adultos a la dosis de 50 mg/kg/día por vía intravenosa lenta, hasta un máximo de 3 g/día; en niños a la dosis de 40 - 70 mg/kg/día.</p> <p>El inyectable debe ser diluido en 500 ml de suero fisiológico o una solución glucosada al 3%, perfundido preferentemente entre 4 - 6 horas.</p> <p>-Opacidades de córnea y quemaduras oculares por cal: soluciones al 0,35 – 1,85%.</p> <p>-Limpieza lentes contacto: concentraciones de 0,005 – 0,1%.</p>
Efectos secundarios:	<p>El uso de la sal disódica como hipocalcémico está limitado, a pesar de ser muy eficaz, debido a las complicaciones nefrotóxicas que puede ocasionar (necrosis tubular renal).</p> <p>Pueden aparecer también náuseas y calambres.</p>

FICHAS DE INFORMACIÓN TÉCNICA

Cuando se administra por infusión intravenosa puede provocar tromboflebitis y dolor en el punto de inyección.

Por inhalación produce broncoconstricción.

Otras reacciones adversas incluyen fiebre, malestar, dolor de cabeza, mialgia, respuestas parecidas a la histamina como estornudos, congestión nasal y lagrimeo, erupciones cutáneas, hipotensión transitoria y alteraciones en el electrocardiograma.

Pueden provocar hipocalcemia cuando se administran por infusión intravenosa muy rápida, o en soluciones demasiado concentradas, causando tetania, convulsiones, parada respiratoria y arritmias cardíacas.

Contraindicaciones:	Insuficiencia renal.
Precauciones:	Debe usarse con precaución en pacientes con tuberculosis, insuficiencia cardíaca, o historial de convulsiones. Es necesario el control de las concentraciones de electrolitos en plasma, en particular del ión calcio.
Interacciones:	Puede disminuir el efecto antimicrobiano de algunos conservantes como cloroxilenol y timerosal.
Incompatibilidades:	Agentes oxidantes fuertes, bases fuertes, cationes metálicos polivalentes como cobre y níquel.
Conservación:	En envases bien cerrados. PROTEGER DE LA LUZ.

