

**ESTUDIO DEL EFECTO DE UNA PELÍCULA ANTIMICROBIANA EN LA VIDA ÚTIL
DEL QUESO COSTEÑO**

**ERIKA PATRICIA CORONADO RAMIREZ
REYNALDO ESPITIA PETRO**

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS
BERÁSTEGUI-CÓRDOBA-COLOMBIA**

2015

**ESTUDIO DEL EFECTO DE UNA PELÍCULA ANTIMICROBIANA EN LA VIDA ÚTIL
DEL QUESO COSTEÑO**

**ERIKA PATRICIA CORONADO RAMIREZ
REYNALDO ESPITIA PETRO**

Informe final presentado como requisito parcial para optar al título de INGENIERO DE
ALIMENTOS

Director: Margarita Arteaga Márquez, M.s.c. Ciencia y tecnología de la leche.

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS
BERÁSTEGUI-CÓRDOBA-COLOMBIA**

2015

PAGINA DE APROBACIÓN

Por medio de la presente doy la aprobación al trabajo de grado titulado **ESTUDIO DEL EFECTO DE UNA PELICULA ANTIMICROBIANA EN LA VIDA UTIL DEL QUESO COSTEÑO**, presentado por los estudiantes **ERIKA PATRICIA CORONADO RAMIREZ Y REYNALDO ESPITIA PETRO**, en cumplimiento del requerimiento parcial para optar al título de **INGENIERO DE ALIMENTOS**. Fue aprobado por la directora de trabajo de grado el día ____ del mes de _____ de 2015.

Margarita Rosa Arteaga Márquez
M.s.c. Ciencia y tecnología de la leche
Universidad de Córdoba

Nota de aceptación

Gabriel Vélez Hernandez
Firma del jurado

Linda Chams
Firma del jurado

Beatriz Alvarez Badel
Firma del jurado

Montería, 2015.

DEDICATORIA

*En primera instancia le dedico mi trabajo de grado a ti **DIOS** que me distes la oportunidad de vivir, luchar y regalarme una familia maravillosa, por mostrarme día a día con humildad, paciencia y sabiduría que todo es posible.*

Con cariño a mis padres Jorge E. Coronado y Elsa Ramírez quienes con su amor, apoyo y comprensión incondicional estuvieron siempre a lo largo de mi vida, por creer en mí; a ellos que siempre tuvieron una palabra de aliento en los momentos difíciles y que han sido un incentivo en mi vida.

A mis Hermanos James, Juan Camilo y Jorge por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho.

A mi novio Fabel Frank Calderón por siempre motivarme a dar lo mejor de mí y nunca desvanecer en mis metas y propósitos.

A todos gracias por estar siempre conmigo, Dios les bendiga.

Erika P. Coronado Ramírez

DEDICATORIA

A Dios, a la memoria de mi padre y a mi sobrina Isabella.

Reynaldo Espitia Petro

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios, quien nos brindó todos los medios necesarios para hacer realidad este sueño.

A nuestros familiares y amigos por su apoyo incondicional y consejos que nos hacen ser mejores personas cada día.

A Nuestra maestra de Procesos Lácteos Margarita Rosa Arteaga, por su dirección y paciencia en todo este proceso.

A la profesora Linda Chams por su constante atención y ofrecernos el laboratorio de investigaciones en microbiología de alimentos del programa de Bacteriología.

A nuestro profesor Gabriel Vélez por sus observaciones.

A nuestro amigo Cristian Bedoya por toda su comprensión y apoyo durante el desarrollo de este proyecto.

Al profesor Guillermo Martínez por su colaboración en el análisis estadístico de esta tesis.

*A la **UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA** por la formación impartida durante todos estos años.*

Erika & Reynaldo

RESUMEN

Se estudió del efecto de una película antimicrobiana en la vida útil del queso costeño a diferentes concentraciones de Cloruro de sodio (2.5 y 3%) y almacenados a temperatura ambiente (30 °C) y temperatura de refrigeración (12 °C), teniendo como principio activo Nisina (16 mg/100mL de solución), se realizaron análisis fisicoquímicos (Determinación del contenido de grasa y humedad (%), pH y acidez (% ácido láctico)) análisis microbiológicos (Recuento de mohos y levaduras, *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, Coliformes, *E. Coli*, y *Salmonella* (UFC/g)) y pruebas de análisis sensorial (Por Ordenamiento y preferencia) durante un periodo de tiempo de treinta días cada cinco días. Los quesos almacenados a 30 °C, se deterioraron por completo al quinto día. Los resultados muestran que la película antimicrobiana aumenta la vida útil del queso almacenado a 12 °C en 12 días respecto a lo establecido para quesos sin películas de la NTC 750 de 2009, para un total de 30 días, el comportamiento del pH respecto a los porcentajes de cloruro de sodio empleados es el mismo para los tratamientos en estudio; caso contrario, ocurre con la acidez (% Ácido láctico) donde se presentaron diferencias estadísticamente significativas en los días 15, 20, 25 y 30. Los tratamientos con películas y diferente concentración de cloruro de sodio fueron aceptados organolépticamente durante los 30 días por los panelistas, a diferencia del tratamiento control que a los 15 días de almacenamiento se detectó presencia de mohos y levadura. La condición que presenta una menor degradación del queso durante los 30 días fue la temperatura de refrigeración (12 °C), en cuanto a la concentración de cloruro de sodio se presentó un comportamiento similar para cada uno de los parámetros estudiados. Por último, en los quesos almacenados a 12 y 30 °C se aceleró el crecimiento de microorganismos tales como mohos y levaduras.

ABSTRACT

The effect of an antimicrobial film on the life of Costeño cheese at different concentrations of sodium chloride (2.5 to 3%) and stored at room temperature (30 °C) and refrigeration temperature (12 °C) was studied, with the Nisin active compound (16 mg/100 mL solution), Physicochemical analyzes were performed (Determination of fat and moisture (%), pH and acidity (% lactic acid)) microbiological analyzes (count of molds and yeasts, *Staphylococcus aureus* coagulase positive, Coliforms, *E. Coli* and *Salmonella* (CFU/g)) and sensory analysis tests (for attributes and hedonic scale) for a period of thirty days every five days. The cheese stored at 30 °C, completely deteriorated at the fifth day. The results show that the antimicrobial film increases the life of cheese stored at 12 °C in 12 days regarding provisions for cheese without movies NTC 750, 2009, for a total of 30 days, pH behavior as regards the percentages of sodium chloride used is the same for the treatments under study; Otherwise, occurs with acidity (% lactic Acid) where differences are presented in the days 15, 20, 25 and 30. Treatments with films and different concentration of sodium chloride were organoleptically accepted within 30 days by the panelists, unlike the control treatment after 15 days of storage will detect the presence of mold and yeast. The condition has a lower cheese degradation during 30 days was the cooling temperature (12 °C), as to the concentration of sodium chloride appeared similar for each of the parameters studied behavior. Finally, the cheese stored at 12 and 30 °C the growth of microorganisms such as yeasts and molds accelerated.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	17
2. OBJETIVO	20
2.1 Objetivo general	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 MARCO TEORICO	21
3.1 QUESO	21
3.1.1 Queso fresco	21
3.1.1.1 Características microbiológicas y fisicoquímicas	23
3.1.1.2 Periodo de vida útil de los quesos frescos	25
3.1.2 PROCESO DE ELABORACIÓN DEL QUESO	27
3.1.2.1 Recepción de la materia prima	28
3.1.2.2 Adición de Cloruro de calcio	29
3.1.2.3. Coagulación	30
3.1.2.4. Cortado de la cuajada	31
3.1.2.5. Desuerado	31
3.1.2.6. Salado	32
3.1.2.7. Moldeado	32
3.1.2.8 Prensado	32
3.2 BACTERIOCINAS	33
3.2.1 CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS	34
3.2.2 Nisina	34
3.2.2.1 Modo de acción de la Nisina	38
3.2.2.2 Migración de la Nisina	40
3.3 PELÍCULAS COMESTIBLES	41
3.4 VIDA ÚTIL	43
4.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	46
4.2 HIPOTESIS	46

4.3 POBLACIÓN O UNIVERSO DE ESTUDIO	46
4.4 LOCALIZACIÓN	46
4.5 VARIABLES	47
4.5.1 Variables independientes.....	47
4.5.2 Variables dependientes	47
4.5.2.1 Variables fisicoquímicas	47
4.5.2.2 Variables sensoriales	48
4.5.2.3 Variables microbiológicas.....	48
4.6 MATERIALES Y MÉTODOS	48
4.6.1 RECEPCIÓN Y ANÁLISIS DE CALIDAD A LA MATERIA PRIMA	48
4.6.2 PROCEDIMIENTO.....	48
4.6.2.1 Recepción de la materia prima	48
4.6.3 Tratamientos a diferentes concentraciones de sal (% p/p)	49
4.6.4 ELABORACIÓN DE LOS QUESOS.....	50
4.6.4.1 Materiales y equipos.....	50
4.6.5 ELABORACIÓN DE PELÍCULAS ANTIMICROBIANAS A BASE DE CARBOXIMETILCELULOSA (CMC) Y NISINA.....	51
4.6.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS DEL QUESO COSTEÑO CON PELÍCULA COMESTIBLE.....	52
4.6.7 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE LOS QUESOS	53
4.6.8 ANÁLISIS SENSORIAL	53
4.7 DISEÑO EXPERIMENTAL	54
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
5.1 Calidad de la materia prima.....	56
5.2 Análisis fisicoquímicos	58
5.2.1 pH	60
5.2.2 Acidez (% Ácido láctico).....	61
5.2.3 Contenido de materia grasa (%)	63
5.2.4 Contenido de humedad (%).....	65
5.3 Análisis microbiológicos.....	67

6. CONCLUSIONES	76
7. RECOMENDACIONES.....	77
8. BIBLIOGRAFÍA	78
9. ANEXOS.....	96

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Requisitos fisicoquímicos para el queso.	23
Tabla 2. Requisitos microbiológicos para el queso fresco.	24
Tabla 3. Clasificación de las bacteriocinas.	35
Tabla 4. Análisis de calidad de la materia prima.	49
Tabla 5. Análisis fisicoquímicos	52
Tabla 6. Media y desviación estándar de diferentes análisis fisicoquímicos reportados por el analizador de leche Biolac 60 [®] y conteo de células somáticas	56
Tabla 7 Valores medios y desviación estándar de diferentes análisis fisicoquímicos realizados al TC y T3 en el día cero y cinco.	59
Tabla 8. Contenido de materia grasa (%).	64
Tabla 9. Contenido de humedad (%)	66
Tabla 10 .Análisis microbiológico (Día cero y día 5 (Temperatura ambiente))	71

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura básica de la Nisina A. (ABU: Ácido amino butírico; DHA: Dehidroalanina; ALA-S-ALA: Dehidrobutirina (b-metildehidroalanina) y ABU-S-ALA: b- metil-lantionina.)	37
Figura 2. Mecanismo de acción de la Nisina	39
Figura 3. Aspecto de quesos almacenados a 12 °C al día 30	75

LISTA DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Comportamiento del pH. (Quesos almacenados a 12°C por un periodo de 30 días).	61
Gráfica 2. Comportamiento de la acidez titulable (%Ácido láctico). (Quesos almacenados a 12°C por un periodo de 30 días).	62
Grafica 3. Coliformes fecales (Quesos almacenados a 12 °C durante un periodo de 30 días)	67
Grafica 4. Staphylococcus aureus coagulasa positiva(Quesos almacenados a 12 °C durante un periodo de 30 días)	68
Grafica 5. Mohos y levaduras(Quesos almacenados a 12 °C durante un periodo de 30 días)	70

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Película comestible sobre queso costeño (Día 0)	78
Anexo B. Película del queso costeño (Día 20)	79
Anexo C. Formato evaluación sensorial (Prueba de ordenamiento)	80
Anexo D. Formato evaluación sensorial (Escala hedónica)	81
Anexo E. Análisis de varianza para pH a 12 °C	82
Anexo F. Análisis de varianza para Acidez a 12 °C	84
Anexo G. Prueba de comparación de medias de Duncan para Acidez (% Ácido láctico)	86
Anexo H. Análisis de varianza para contenido de materia grasa (%) y Humedad (%)	88
Anexo I. Análisis de varianza para contenido de materia grasa (%) y Humedad (%) a temperatura ambiente	89
Anexo J. Análisis de varianza para contenido de materia grasa (%) y Humedad (%) a 12°C	90
Anexo K. Prueba de comparación de medias de Duncan para contenido de materia grasa (%) y Humedad (%)	91
Anexo L. Análisis de varianza para evaluación sensorial Día Cero	92
Anexo LI. Análisis de varianza para evaluación sensorial Día 20	93
Anexo M Análisis de varianza para evaluación sensorial Día 25	94
Anexo N. Análisis de varianza para evaluación sensorial Día 30	95

1. INTRODUCCIÓN

El queso costeño es un producto autóctono de la Costa Atlántica, el cual se produce de forma artesanal, utilizando leche cruda como materia prima y elaborado bajo las mínimas condiciones higiénicas sanitarias, por lo que se considera un excelente medio para la proliferación de bacterias patógenas, como *Listeria monocytogenes*, que es el agente causal de la Listeriosis, una de las enfermedades más importantes, adquirida en el 99% de los casos por el consumo de alimentos contaminados (MinSalud 2013).

Según Gallegos et al. (2007), en Colombia el queso, debido a su composición, nutrientes, valores de actividad de agua y pH, está reconocido como un alimento de alto riesgo en salud pública al igual que en otros países. Estos mismos afirman que el queso costeño producido en los municipios de Cereté y Montería del departamento de Córdoba, frecuentemente están contaminados con *Listeria spp* y la presencia de *L. ivanovii* patógeno involucrado en algunos casos de infecciones oportunistas en humanos y *L. innocua*, microorganismo utilizado en muchas industrias de alimento como indicador del grado o calidad de sanitización. Demostrando así, que las condiciones de producción y expendio no son adecuadas y que el consumo de queso costeño no es seguro.

Un reporte dado por el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila), indica que en el 2009, se presentaron 899 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, de los cuales solo en el 56% se identificó el agente patógeno, correspondiendo el 18.4% a la presencia de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, encontrándose este, en alimentos (79%), muestras biológicas (12.7%) y superficies (8.5%); lo cual evidencia que la primera causa de brotes por este microorganismo en el territorio nacional es de origen alimentario. Siendo el queso uno de los alimentos involucrados. (Sivigila 2011a). Para el 2010 del Instituto Nacional de Salud reportó 147 (16.5%) brotes asociados al consumo de queso donde los microorganismos implicados fueron *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Proteus spp.*, *Bacillus cereus*, *Listeria. monocytogenes* y *Shigella spp.* (Sivigila 2011b)

La Resolución 2310 de 1986, en el capítulo VII- Art 49, declara lo siguiente: “No se permite la elaboración de queso fresco para consumo humano a partir de leche cruda, salvo en los casos en que por las condiciones especiales de ubicación, dificultades de transporte, sistema de producción y un volumen de producción menor de 500 litros/día, la autorice el Ministerio de Salud o su autoridad delegada”. Dando espacio lo anterior para la producción de queso utilizando leche cruda, por parte de los pequeños productores del departamento de Córdoba. Sin embargo, los mismos no cuentan con una autoridad delegada por el Ministerio de

salud, que controle tal problemática. Por lo tanto se hace necesario brindarles una alternativa para que continúen con su actividad, produciendo.

Se ha optado por la Nisina como una alternativa para disminuir la carga microbiana en diferentes variedades de queso, la Nisina es producida por ciertas cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y exhibe actividad antimicrobiana contra una amplia gama de esporas y bacterias Gram-positivas, incluyendo *Staphylococcus*. Por lo tanto se ha sugerido como un antimicrobiano natural para ser utilizado como un bioconservante en los alimentos, incluyendo productos lácteos, y se considera generalmente como seguro. Además, la Nisina es la única bacteriocina autorizados para su uso en la industria alimentaria y muchos estudios recientes han demostrado su efectividad (Pinto et al. 2011).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de una película antimicrobiana en la vida útil del queso costeño elaborado con diferentes concentraciones de NaCl y almacenados a diferentes temperaturas.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Determinar las propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales de queso durante un mes.
- ❖ Determinar la aceptación del producto en los consumidores, a través de métodos de análisis sensorial.
- ❖ Evaluar la eficiencia de la película antimicrobiana con respecto a la vida útil del queso costeño.
- ❖ Seleccionar la concentración de cloruro de sodio y temperatura de almacenamiento que proporcionen una menor degradación del queso costeño durante su vida útil.

3. MARCO TEORICO

3.1 QUESO

Es el producto obtenido por coagulación de leche, de la crema de leche, de la crema de suero, del suero de la mantequilla o de la mezcla de algunos o todos estos productos, por la acción del cuajo u otros coagulantes aprobados (Resolución 2310 de 1986).

3.1.1 Queso fresco

El Queso Fresco contiene una alta humedad, se produce principalmente en países de América Latina a partir de leche cruda (Lin et al. 2006; Moreno et al. 2007). Debido a que la leche utilizada para la elaboración del queso no es pasteurizada, la microflora bacteriana nativa de la leche cruda se encuentra presente en la elaboración del Queso Fresco (Renyé et al. 2008). Estas cepas de bacterias, al tiempo que imparten algunos sabores potencialmente importantes y efectos texturales generales a los quesos, no son adecuados para el consumo de acuerdo con las normas de EE.UU para la calidad de los alimentos. Debido a que estos quesos son tan húmedos y tienen un pH superior a 6,0 que soporta el crecimiento de un número de organismos de descomposición y bacterias patógenas, tales como *Listeria monocytogenes*, por lo que existe un interés significativo en el desarrollo de métodos para la producción de quesos que son

similares en sabor, textura y en general a las cualidades sensoriales, a partir de leche pasteurizada (Moreno et al. 2007).

En el proceso de elaboración del Queso Fresco se emplea la molienda antes del salado. Paul et al. (2012) estudiaron la influencia de varios tipos de molienda en la degradación de las proteínas, obteniendo como resultado que estas se degradan principalmente por la descomposición de β -caseína después de cuatro a ocho semanas de envejecimiento a 4 °C. Debido a que observaron muy poca degradación de las proteínas y no se utilizó cultivos iniciadores en la fabricación de queso, es esta proteólisis más probable debido a la eventual aparición de bacterias de descomposición. Esto demuestra que la molienda no es necesaria en la producción de queso fresco, y su incorporación como un paso en los procedimientos puede ser simplemente una vía adicional de contaminación mientras jugaba ningún papel esencial.

Estos quesos tienen un alto contenido de humedad, un sabor ligero, sin corteza, y una corta vida útil y requieren de refrigeración. Los quesos frescos se producen en depósitos de coagulación utilizando enzimas y/o ácidos. Una vez cuajada, el suero se drena, se muele, se le adiciona sal y el queso final se envasa en bolsas de plástico para la venta (Torres et al. 2012).

3.1.1.1 Características microbiológicas y fisicoquímicas

Según la NTC 750 de 2009 los requisitos microbiológicos y fisicoquímicos de diferentes designaciones de quesos son los que se describen en la tabla 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1. Requisitos fisicoquímicos para el queso.

Designación según su consistencia	Humedad sin materia grasa (HSMG), % m/m
Extraduro	<50,0
Duro	50-55
Firme/Semiduro	56-68
Blando	> 68
Designación según su contenido de Materia grasa	Materia grasa en extracto seco (GES), % m/m
Extragraso	≥ 60,0
Graso	≥45,0 - < 60,0
Semigraso	≥25,0 - < 45,0
Semidescremado	≥10,0 - <25,0
Descremado	< 10,0

Fuente: NTC 750 de 2009.

Tabla 2. Requisitos microbiológicos para el queso fresco.

REQUISITO	n	m	M	c
Exámenes de rutina:				
Recuento de coliformes, UFC/g.	5	1 000	5 000	2
Recuento de <i>E. coli</i> , UFC/g.	5	<10	--	0
Recuento de mohos y levaduras, UFC/g	5	100	500	2
Exámenes especiales:				
Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>				
coagulasa positiva, UFC/g	5	10	100	2
Detección de <i>Salmonella</i> /25 g	5	Ausente	-	0
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	5	Ausente	-	0

En donde:

n: número de muestras por examinar, m: índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad, M: índice máximo permisible para identificar nivel de calidad aceptable, c: número máximo de muestras permisibles con resultados entre m y M.

Fuente: NTC 750 de 2009.

3.1.1.2 Periodo de vida útil de los quesos frescos

De acuerdo con el capítulo XVIII, artículo 129 de la Resolución 2310 de 1986, el queso fresco, presentado en el empaque hermético refrigerado, tiene una duración sanitaria de hasta 18 días y el queso fresco, empacado al vacío refrigerado de 30 días. El queso fresco elaborado con leche cruda que por lo general se consume dentro de los 14 días haberlo producido (Renye et al. 2008; Paul et al. 2012).

El Queso Fresco, una variedad de queso hispana, está ganando popularidad en otros países como los USA. A menudo se come fresco, de ahí su nombre, pero a muchos consumidores y puntos de venta le gustaría la opción de refrigeración por un par de semanas. Para ello, las características de Queso Fresco deben ser investigadas en el tiempo a temperaturas de almacenamiento habituales (Pouillot et al. 2010).

Tunick et al (2012), analizaron el Queso Fresco, con leche pasteurizada y sin cultivo iniciador a lo largo de 8 semanas de almacenamiento a 4 y 10 ° C el queso era quebradizo y no se fundió, y los quesos elaborados en el laboratorio no podían distinguirse de una muestra comercial por un panel de consumidores. Estos autores afirman que la proteólisis y lipólisis se produjeron durante el almacenamiento, también se evidenció cambios en lactosa, pH, los perfiles de proteínas, y los compuestos volátiles, pero tuvo poco o ningún efecto sobre la textura, reología, fusión, o microestructura. Aunque los niveles de humedad se mantuvieron sin cambios a los 4 ° C, todas las muestras de quesos exhibieron

pérdida de suero durante el almacenamiento, y es probable que cierta cantidad de NaCl se disolviera en el suero de leche perdido. Los mismos concluyeron que los consumidores pueden almacenar Queso Fresco durante al menos 2 meses sin degradación significativa de la calidad.

Estudios realizados por Clark et al (2001) en los Estados Unidos demuestran que los consumidores tradicionales, tanto hispanos como los familiarizados con el queso fresco, prefirieron quesos con alto contenido de sal y pH bajo. Siendo el contenido de sal entre el 1,4 y 2,4% y un pH entre el 5,4 y el 6,1 los más aceptados por los consumidores evaluados. Su aceptación se basa en parte en su color (blanco brillante), la textura y estructura (Van Hekken y Farkye 2003).

Un cóctel de *Listeria monocytogenes* (ca. 3,0 log₁₀ UFC/g) de cinco cepas resistente a la rifampicina se introdujo como un contaminante post-pasteurización en queso fresco que se fabricó usando un procedimiento comercial. *Listeria monocytogenes* se inocularon en la cuajada antes de formar el bloque de queso y en rebanadas (52-66 g), individualmente envasado al vacío y se almacenó a 4 y 10 °C. El crecimiento se monitorizó durante un máximo de 35 días. La tasa de crecimiento y tiempo de generación fueron más rápidos a 10 ° C que a 4 ° C. Después de 20 días, la máxima densidad de población era de 7.80 ± 0.17 UFC/g, independientemente de la temperatura de almacenamiento. Estos resultados indican que la fabricación de Queso Fresco debe llevarse a cabo utilizando buenas prácticas de fabricación y en condiciones higiénicas, y que es necesaria para

prevenir la presencia y el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y el uso de antimicrobianos y/o intervenciones post-procesamiento (Leggett et al. 2012).

La Intoxicación alimentaria estafilocócica está vinculada con el consumo de productos lácteos (Ostyn et al. 2010; Schmid et al. 2009). Estudios realizados por Torres et al (2012) dieron a conocer la ausencia de estas toxinas en muestras de Queso Fresco analizadas, probablemente debido a la inhibición de su síntesis por el pH. Los patógenos también pudieron haber sido inhibidos por el pH ácido (la mayoría de las muestras tenían niveles de pH por encima de 5.0). Estos resultados muestran un posible efecto protector del pH en los quesos frescos elaborados con leche cruda, aunque se necesitan más estudios para confirmar que los niveles de pH por debajo de 5.0 contribuyen a la inhibición de patógenos en los quesos frescos.

3.1.2. PROCESO DE ELABORACIÓN DEL QUESO

El proceso por el que la leche se transforma en queso se desarrolla a lo largo de varias etapas que normalmente son: Recepción de la materia prima, adición de cloruro de calcio, cuajado, cortado de la cuajada, desuerado, salado, moldeado y prensado. Las propiedades de la leche de partida influyen directamente sobre todas ellas, de modo que la composición físico-química (pH, concentración de cationes divalentes calcio y magnesio y de aniones fosfato y citrato, concentración de grasa y proteínas, etc.) y todos los factores que influyen sobre ella (especie,

raza, periodo de lactación, estación del año, calidad microbiológica, recuento de células somáticas, etc.) han de ser tenidos muy en cuenta (Lurueña 2010).

3.1.2.1. Recepción de la materia prima

Para la elaboración del queso hay que utilizar leche de muy buena calidad tanto desde el punto de vista de su composición y carga microbiana como en relación a su aptitud para la fermentación y la coagulación. Si no se cumple estos requisitos se presentan muchos problemas en la fabricación y aparecen diversos defectos en el queso (Moreno y Ruiz 2007). Según Tornadijo et al. (1998) la leche es de calidad cuando reúne los siguientes requisitos:

- ❖ Ausencia absoluta de sustancias perjudiciales para la salud del consumidor, tales como sustancias extrañas y residuos de productos nocivos (pesticidas, medicamentos, toxinas microbianas, etc.).
- ❖ Capacidad de acidificación normal, es decir, ausencia de sustancias capaces de inhibir a la flora ácido láctica.
- ❖ Baja carga microbiana, como requisito previo para obtener productos con capacidad de conservación prolongada.
- ❖ Caracteres organolépticos normales.
- ❖ Escaso contenido celular, indicativo de una leche normal producida por una mama sin infecciones ni trastornos secretorios.
- ❖ Escaso o nulo número de gérmenes tecnológicamente indeseables, especialmente coliformes y esporulados butíricos.

- ❖ Composición química normal, indicativa de una buena aptitud para la transformación.

La acidez en la leche, después del ordeño se modifica especialmente, por la acción de bacterias lácticas, que transforman la lactosa en ácido láctico; esta acidez en la leche, se expresa en porcentaje de ácido láctico (Calderón et al. 2011). En Colombia, una leche fresca posee una acidez natural entre 0.13 a 0.18 % (Decreto 616, 2006).

Si la coagulación se hace a pH cercanos a la neutralidad, esta es lenta y la cuajada obtenida es flexible, elástica, compacta, impermeable y contiene poca agua, para desuerar se necesita acción mecánica por la nombrada impermeabilidad. Por el contrario, cuando mayor es la acidez la coagulación se hace más rápida por acción del cuajo, siendo más consistente la cuajada, pero esta queda más desmineralizada y el queso quedará menos plástico; el desuerado también es rápido (Paniagua 2008).

3.1.2.2. Adición de Cloruro de calcio

El contenido de CaCl_2 de la leche, tiene influencia sobre las propiedades de la coagulación, aumentado ligeramente su firmeza (Sbodio y Revelli 2012). La presencia de calcio, hace que mejore el desuerado, facilita la retención de las grasas y otros sólidos. Como es posible que se pierda en la pasteurización parte

del calcio libre (iónico), se agrega sales de calcio (especialmente cloruro de calcio o fosfato mono cálcico) para compensar en un porcentaje de 10 a 30 g por cada 100 L. de leche a 34 °C. (Paniagua 2008; Sbodio y Revelli 2012).

3.1.2.3. Coagulación

El primer paso en la elaboración de la mayoría de los quesos es la coagulación proteica, inducida mediante la acción combinada de enzimas proteolíticas y fermentos lácticos. Este proceso se divide fundamentalmente en dos fases: la fase primaria o enzimática y la fase secundaria o de agregación. La fase primaria corresponde a la hidrólisis específica de la k-caseína, localizada en la superficie de las micelas de caseína, por la acción de enzimas proteolíticas (quimosina principalmente). La acción enzimática produce una ruptura en el enlace proteico Fe105-Met106 de la k-caseína, generando dos péptidos con propiedades muy diferentes. El glicomacropéptido es un fragmento hidrofílico y soluble, formado por los residuos de aminoácidos 106 a 169. Este fragmento, que representa cerca del 4% de la caseína total, pasa a formar parte del lactosuero. El otro fragmento, formado por los residuos de aminoácidos 1 a 105 de la k-caseína, se denomina para-k-caseína, es altamente hidrofóbico y permanece enlazado a las micelas.

La segunda fase está representada por una reducción drástica de la carga eléctrica negativa de la superficie de las micelas, que posibilita su acercamiento y facilita la agregación de las mismas, en la que el calcio (Ca^{2+}) juega un papel importante como acelerador del proceso (Rovira 2013).

3.1.2.4. Cortado de la cuajada

Tiene por objeto aumentar la superficie de exudación y favorecer la salida del suero. Esta operación se realiza con liras. Este troceado tiene un límite, pues si es muy interno las partículas de coagulo quedan muy finas y retienen grandes cantidades de suero durante el prensado.

Las dimensiones del grano pueden variar entre 3 mm y 2.5 cm; este tamaño tiene mucha importancia en la velocidad de salida del suero. Los granos grandes retienen más humedad, por lo que conservan más lactosa y por lo tanto son más ácidos. Debe cuidarse su uniformidad del tamaño de los granos, pues de lo contrario el grueso no tendrá textura uniforme, con distribución desigual de humedad y acidez. Por otra parte, los granos grandes retienen más grasa que los granos pequeños. En general, para quesos blandos, el corte o trazado de los quesos será en granos grandes, mientras que para quesos semiduros y duros el grano deberá ser pequeño (Paniagua 2008).

3.1.2.5. Desuerado

En esta etapa se extrae una gran parte del lactosuero el cual contiene lactosa y sustancias nitrogenadas no coaguladas y una proporción variable de minerales. Fundamentalmente es la mayor o menor cantidad de suero que queda retenido en la cuajada lo que determina muchas de las características del queso dentro de ellas la dureza y textura. Por esta razón la operación de desuerado tiene una gran importancia en el proceso de fabricación y además, controlando esta etapa se

regula el extracto seco total exigido por la legislación para cada tipo de queso (González 2010).

3.1.2.6. Salado

El salado es una etapa posterior a la sinéresis, la cual se puede hacer en seco o por inmersión en salmuera. Lurueña (2010) sostiene que este proceso tiene las siguientes consecuencias:

- Completa el desuerado, ya que se produce un gradiente salino que genera un flujo de sal hacia el interior con flujo de agua hacia el exterior del queso,
- Reduce y/o evita las actividades enzimáticas y el desarrollo de microorganismos
- Aporta un gusto característico.

3.1.2.7. Moldeado

El moldeado tiene por prioridad lograr que los granos de cuajada se adhieran y formen piezas grandes. Existen varias formas y tamaños de los moldes, que son los que dan la apariencia final al queso (Paniagua 2008). Estos moldes pueden ser de madera, plástico o metal (González 2010).

3.1.2.8. Prensado

Esta etapa del proceso permite extraer el agua libre del queso y complementar así su desuerado. Evidentemente, no se aplica a todos los tipos de queso, sino sólo a los que tienen una estructura capaz de soportar una presión directa. Las condiciones del prensado como la intensidad, la progresión y el tiempo, deben

ajustarse en función de la naturaleza de los quesos que se vayan a fabricar (González 2010). Puede hacerse por la presión que ejerce su propia masa o bien aplicando fuerza externa. En cuanto al prensado por aplicación de fuerza externa se hace con prensas horizontales o verticales de palanca. Si la elaboración ha sido correcta, al iniciar el prensado el suero sale rápidamente y es transparente. De lo contrario, si el desuerado es lento la acidificación se hace excesiva o hay mucha desmineralización al final del prensado, por lo que la pasta se hace seca y poco flexible. La presión aplicada varía según el queso, siendo entre 4 a 40 veces el peso del queso. El tiempo de prensado también es variable desde 1 a 20 horas (Paniagua 2008).

3.2. BACTERIOCINAS

Se considera tradicionalmente a las bacteriocinas como péptidos biológicamente activos que tienen propiedades bactericidas contra otras especies estrechamente relacionadas con la cepa productora, sin embargo, recientemente este concepto se ha modificado ya que se han encontrado también acciones bactericidas contra cepas distanciadas filogenéticamente de la cepa productora. En el campo de la conservación de los alimentos, resulta interesante analizar el uso de las bacteriocinas como una alternativa para sustituir, al menos parcialmente, a los agentes químicos. (González et al. 2003). Las bacteriocinas han atraído la atención como sustituto potencial de compuestos preservantes porque son producidas por bacterias consideradas benéficas para la salud y en la producción de alimentos (Rojas y Vargas 2007). Al mismo tiempo tienen la ventaja de ser

proteínas que al biodegradarse no forman compuestos secundarios. Estos compuestos purificados o semipurificados pueden ser utilizados como biopreservantes en alimentos para la reducción o eliminación de ciertos microorganismos de deterioro y algunos patógenos como *Estafilococos* y *Listeria monocytogenes*, respectivamente. (González et al. 2003; Rojas y Vargas 2007).

En la naturaleza existe una enorme diversidad de bacteriocinas que han sido encontradas en casi todas las especies bacterianas examinadas hasta la fecha, y aún dentro de una especie podrían producirse diferentes tipos de bacteriocinas. Se piensa que el 99% de las bacterias pueden producir cuando menos una bacteriocina y la única razón de que no se hayan aislado es debido a que han sido muy poco estudiadas (Dosta et al. 2009).

3.2.1 CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

En la tabla 3 se muestra la clasificación de las bacteriocinas reportada por Gervasio (2012).

3.2.1. Nisina

La Nisina, descrita en 1928, fue la primera bacteriocina aislada a partir de la bacteria ácido láctica (*Lactococcus lactis* Subs. *lactis*.) Es la bacteriocina mejor caracterizada y es utilizada como conservador de alimentos; es la única reconocida por la FDA con la categoría GRAS (Generalmente reconocidos como seguros).

Tabla 3. Clasificación de las bacteriocinas.

Clase	Tamaño (kDa)	Características y subclases
I	<5	<p>Péptidos producidos en el ribosoma, sometidos a una gran modificación después de la traducción, pequeños péptidos que contienen lantionina y B-metillantionina.</p> <p>Son péptidos de bajo peso molecular, termoestables, formados únicamente por aminoácidos modificados, sintetizados en el ribosoma como péptidos inactivos y entran en función por el corte post-traducción en el N-terminal del péptido líder.</p>
II	<10	<p>Ila. Péptidos simples anti-listeria que contienen la secuencia de aminoácidos YGNGV cerca del N-terminal.</p> <p>Ilb. Bacteriocinas de dos péptidos.</p> <p>Ilc. Péptidos Thiol activados (necesitan reducir la cisteína para su actividad).</p>
III	>30	<p>Proteínas de alto peso moléculas y termolábiles.</p>
IV		<p>Complejo de bacteriocinas que llevan restos de lípidos o carbohidratos.</p>
V		<p>Bacteriocinas de estructura circular y no modificadas Postraduccionalmente.</p>

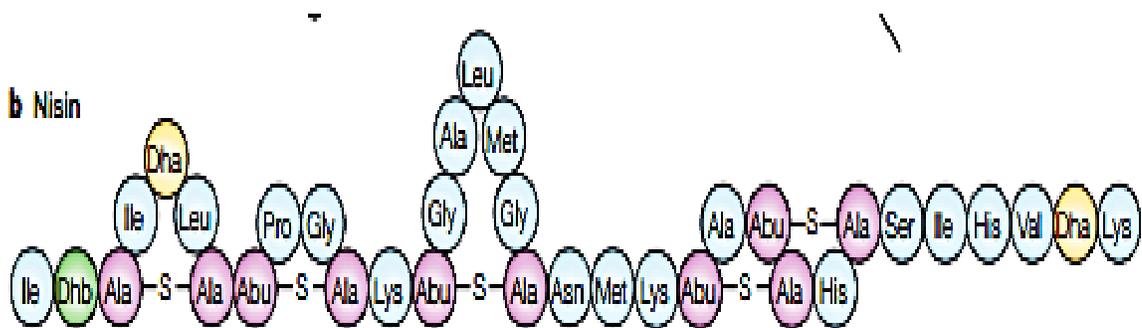
Fuente: (Gervasio 2012)

Se produce de forma natural en algunos productos lácteos y se utiliza en la producción de alimentos y como un aditivo en productos lácteos, como quesos untados, ricota, leche y suero líquido para prevenir la descomposición ocasionada por bacterias Gram positivas, especialmente de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria* (Dosta et al. 2009; Ollé et al. 2013). Desde 1993 se sabe que la Nisina actúa como un compuesto despolarizante en membranas bacterianas energizadas y crea poros en la membrana lipídica (SEM 1993), este mismo autor reporta que la solubilidad y estabilidad de la Nisina decrece de un pH óptimo de 2 a un pH de 6, lo que supone una desventaja tecnológica importante en la utilización de la Nisina como un aditivo en alimentos no ácidos, como los enlatados y derivados lácteos. Davies et al. (1997) encontraron en quesos elaborados con leche sin tratamiento térmico, con niveles de aplicación de 2.5 mg/L de leche del producto comercial (Nisaplin®) lograban inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* por un periodo de 8 semanas. También se evaluó un queso control, sin la aplicación de Nisina, mostrando que de 1 o 2 semanas de incubación se lograban detectar niveles peligrosos del patógeno. De igual forma se demostró que la temperatura de almacenamiento ensayada (6-8 °C), solo se perdió entre 10 y 32% de la actividad inicial de la Nisina aplicada. Un estudio realizado por Cava et al (2006); consistió en evaluar el efecto de la adición de Nisina en queso fresco "telita" sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus*, encontrando que esta bacteriocina fue capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo patógeno a lo largo del almacenamiento de los quesos, aunque no lograba eliminarlos por completo.

Chollet et al (2008) emplearon Nisina como conservante potencial de queso Emmental encontrando que esta interactuó con la matriz de queso.

Químicamente, la Nisina es un péptido de 34 aminoácidos, de bajo peso molecular menor a 5 kDa. La síntesis de la Nisina es compleja, requiere de procesos de transcripción, traducción, modificaciones posttraduccionales, secreción, procesamiento, y señales de transducción. Existen dos variantes de esta bacteriocina, la Nisina A y la Nisina Z, que difieren solamente en el aminoácido de la posición 27, la histidina en la Nisina A cambia por asparagina en la Nisina Z (Sangronis y García 2007). En la figura 1 se muestra la estructura básica de la Nisina A.

Figura 1. Estructura básica de la Nisina A. (ABU: Ácido amino butírico; DHA: Dehidroalanina; ALA-S-ALA: Dehidrobutirina (metildehidroalanina) y ABU-S-ALA metil-lantionina.)



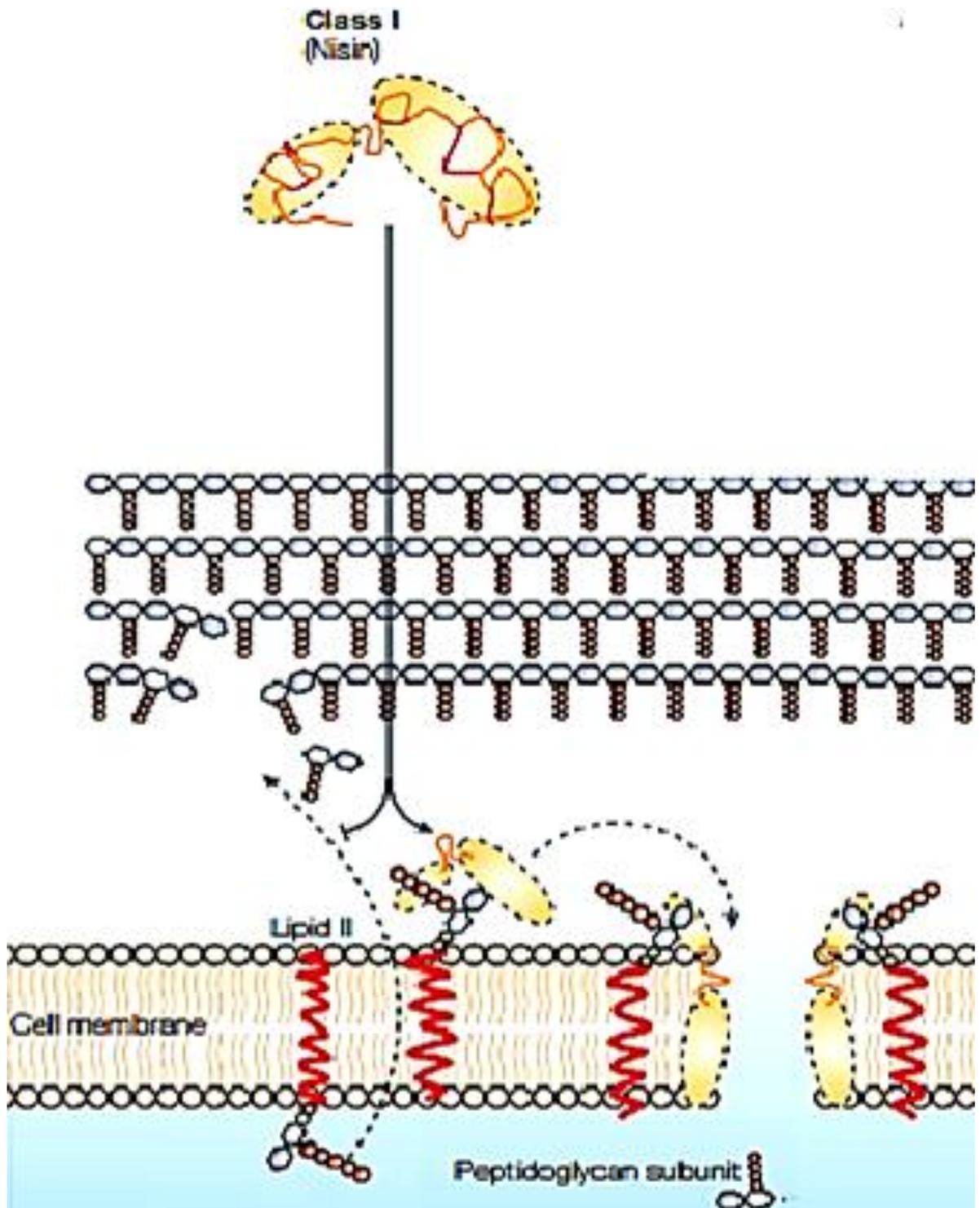
Fuente:(Cotter et al. 2005).

3.2.1.1. Modo de acción de la Nisina

Su mecanismo está determinado por la composición de la membrana citoplasmática, la estructura y expresión de una proteína en función de la inmunidad, además, de la composición química del medio de cultivo. Recientemente, también se considera la existencia de las moléculas superficiales en la membrana de la bacteria que se desea inactivar, que permite el acoplamiento con la bacteriocina producida por otras bacterias (Sierra 2012).

El modo de acción de la Nisina es la unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y la bacteriocina con su carga neta positiva localizada en uno de sus extremos y después se produce la inserción de la bacteriocinas en la bicapa lipídica. De este modo se forman poros en la membrana bacteriana, la cual queda permeabilizada, la célula comienza a perder iones y metabolitos fundamentales para su supervivencia y eventualmente se produce la muerte bacteriana, probablemente debido a la vesiculación del protoplasma, la formación de poros y la desintegración completa de la célula (Quintero 2006; Castro 2007; Sierra 2012). El modo de acción de la Nisina también incluye la inhibición de la biosíntesis de la pared celular y la inducción de autólisis, entre otros. Esta multiplicidad de acción de la Nisina, y otras bacteriocinas relacionadas, hace que sea muy efectiva incluso a concentraciones ínfimas (Diez 2011). En la figura 2 se ilustra el mecanismo de acción de la Nisina.

Figura 2. Mecanismo de acción de la Nisina.



Fuente: (Cotter et al. 2005).

3.2.1.2. Migración de la Nisina

La migración de una sustancia activa contenida en un empaque es un factor importante en el control del crecimiento de microorganismos en los alimentos (Quintero 2006).

La aplicación directa del agente antimicrobiano en la superficie del alimento provoca una rápida difusión desde la superficie hacia la masa de alimento. Por esta razón, es más eficiente el uso de sistema de envasado activos en donde los agentes antimicrobianos van incorporados dentro del sistema. La tasa de penetración de la sustancia bactericida en el producto alimenticio se ve afectado por sus condiciones de almacenamiento, el valor de pH, actividad de agua, así como la concentración de la sustancia activa introducida (Krasniewska y Gniewosz 2012). No obstante, la migración de Nisina en este tipo de películas puede incrementarse mediante la adición de cloruro de calcio (Sebti y Coma 2002). La condición de temperatura durante la producción y distribución tienen que ser predicha para determinar su efecto sobre la actividad antimicrobiana residual de los compuestos activos. La temperatura es un parámetro muy eficaz para representar la pérdida de los agentes antimicrobianos de films (Krasniewska y Gniewosz 2012).

Algunos investigadores como Teerakarn et al (2002) estudiaron la difusión de la Nisina en películas de proteínas (zeína de maíz fundido (CCZ), zeína de maíz prensada en calor (HPCZ), gluten de trigo fundido (GTC), y gluten de trigo prensado en calor (HPWG)). Se evaluaron a diferentes temperaturas de

exposición (5, 25, 35, y 45 °C). Obteniendo que la cinética de la difusión de la Nisina en las películas de proteínas siguieron el modelo de difusión de Fick. El CCZ tenía la menor difusividad de la Nisina y mayor retención de la misma. La difusividad en HPCZ, GTC y películas HPWG no fueron significativamente diferentes. Una disminución en la temperatura de 45 °C a 5°C dio como resultado una reducción de la difusividad para todas las películas estudiadas, mostrando la migración de la Nisina dependencia de la temperatura, ajustándose al modelo de Arrhenius. Más tarde Dawson et al. (2003) y Cha et al. (2003) establecieron que el tipo de proteína y el método de formación de las películas afectan la migración de Nisina contenida en películas elaboradas a base zeína y gluten de trigo. Por otra parte, Sebti et al. (2003) Realizaron un estudio en donde dan a conocer que las películas de agarosa que contienen Nisina presentan reacción entre ambos compuestos, pero induce una retención parcial de la Nisina sobre la superficie de los alimentos, lo que podría favorecer la liberación controlada de la Nisina, por lo que puede ser útil en la inhibición de los microorganismos que crecen sobre la superficie de los mismos.

3.3. PELÍCULAS COMESTIBLES

Los filmes y revestimientos comestibles son una innovación dentro del concepto de empaque activo biodegradable, los cuales interactúan con los alimentos con el fin de extender su vida útil, mejorar su seguridad y/o propiedades funcionales, mientras mantienen la calidad del alimento empacado. Estos actúan como una

barrera a los elementos externos, protegiendo y extendiendo su vida útil. Se presentan en formas diferentes; como filme es una fina película formada separadamente del alimento y aplicada después sobre el mismo; como revestimiento o recubrimiento, es una suspensión o emulsión aplicada directamente sobre la superficie del alimento donde es secada formando una fina película sobre el producto (Durango et al. 2011).

El soporte de películas biopoliméricas antimicrobianas permite prolongar la vida útil de productos alimenticios a través de la cobertura superficial con las mismas (Kristo et al. 2008). Los envases antimicrobianos son unos de los más prometedores sistemas de envasado activos que se han encontrado altamente eficaz para matar o inhibir el deterioro de microorganismos patógenos que contaminan los alimentos (Dutta et al. 2012).

Son muchos los investigadores que han introducido compuestos antimicrobianos en el desarrollo de películas comestibles, ejemplos a citar son: Ming et al (1997) quienes adsorbieron Nisina y pediocina en cubiertas de celulosa para reducir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en carnes, Scannell et al (2000) adsorbieron lactocina 3147 y Nisina en papel de celulosa para reducir el crecimiento de *Listeria innocua* y *Staphylococcus aureus* en queso y jamón, Ko et al (2001) produjeron películas comestibles que contenían Nisina para probar su acción contra *Listeria monocytogenes*.

Cao-Hoang et al (2010) inocularon *L. innocua* en la superficie y en profundidad de un queso (Mini red Babybel[®] cheese) para investigar la eficacia de la película antimicrobiana de caseinato de sodio que contenía Nisina (1000 UI/cm²), como una función de la distancia desde la superficie en contacto con la película. Encontrando que la presencia de la película activa resultó en una reducción de 1,1 log UFC/g en *L. innocua* para la superficie inoculada con muestras de queso después de una semana de almacenamiento a 4°C en comparación con las muestras de control. Con respecto a la profundidad en muestras, se encontró que la eficacia antimicrobiana tiende a ser dependiente de la distancia desde la superficie en contacto con las películas activas a la matriz de queso. Las tasas de inactivación obtenidos fueron 1.1, 0.9 y 0.25 log UFC/g para las distancias de la superficie de contacto de 1 mm, 2 mm y 3 mm, respectivamente. Estos investigadores concluyeron que el estudio demuestra la potencial aplicación de películas de caseinato de sodio que contienen Nisina como un método prometedor para superar los problemas asociados con la contaminación post-proceso, extendiendo así la vida útil y, posiblemente, la mejora de la seguridad microbiana de los quesos.

3.4. VIDA ÚTIL

La vida útil de un producto depende de factores ambientales, de la humedad, de la temperatura de exposición, del proceso térmico al que se somete y de la calidad de las materias primas, entre otros. El efecto de estos factores se manifiesta como el cambio en las cualidades del alimento que evitan su venta: cambios de sabor,

color, textura o pérdida de nutrientes se refiere a que el final de la vida útil de un producto se alcanza cuando ya no mantiene las cualidades requeridas para que el consumidor final lo utilice.

Para determinar la vida útil de un alimento o producto, primero deben identificarse las reacciones químicas o biológicas que influyen en la calidad y seguridad del mismo considerando la composición del alimento y el proceso a que es sometido y se procede a establecer las reacciones más críticas en la calidad. (Pineda et al. 2010; Carrillo y Mondragón 2011).

El tiempo de vida útil se puede estimar mediante varios métodos: pueden tomarse valores reportados en la literatura especializada de alimentos similares y bajo condiciones similares al producto de nuestro interés; se pueden monitorear las quejas de los consumidores para orientar los posibles valores de vida útil; se pueden evaluar atributos de calidad del alimento que varían durante la vida útil en anaquel o mediante pruebas aceleradas (Novoa y López 2008).

Los ensayos en anaquel ofrecen excelentes datos, pero presentan, en algunos casos, el inconveniente del tiempo prolongado para su adquisición. Entre las consecuencias están que el dato obtenido es puntual y se obtiene en un lapso que puede no ser práctico para la empresa, como en el caso del lanzamiento de nuevos productos (Baldizón y Molina 2008).

Los quesos presentan problemas de vida útil en las neveras asociadas al hábito de consumo (Alimento de abre y cierre) que provocan un deterioro prematuro por desarrollo de microorganismos (Carrillo y Mondragón, 2011). Estos productos pasteurizados poseen un pH elevado (5.1 – 6.2) y una actividad de agua óptima para el desarrollo microbiano. Numerosos estudios han establecido que el deterioro de los mismos depende de factores intrínsecos tales como variedad del queso, actividad de agua, contenido de sal, contenido y tipo de emulsificante, pH y factores extrínsecos, de los cuales los más importantes resultan la temperatura de almacenamiento y la contaminación post-pasteurización. Datos de bibliografía muestran que la *Listeria monocytogenes*, *salmonella spp*, y *Staphylococcus coagulasa positiva* representan a los patógenos de mayor incidencia en queso (Jorgensen et al. 2005; Siliciano 2010).

Para aumentar la vida útil del queso según investigaciones señalan a la Nisina como bioconservante, su actividad frente a algunos microorganismos Gram (+) incluyendo esporas. Los Gram (-) y Gram (+) resistentes pueden desarrollar sensibilidad a la Nisina cuando son sometidos a tratamientos que lesionan la membrana celular. Es una alternativa para disminuir los riesgos de la elaboración de queso con leche cruda, aumentar el tiempo de vida útil del producto ya que disminuye la carga microbiana y permite comercializarlo de mejor manera. La Nisina ingerida es inactivada por la tripsina y la pancreatina, y no tiene ningún efecto sobre la microflora digestiva (Toalombo 2011).

4. METODOLOGÍA

4.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de grado corresponde a una investigación de tipo experimental.

4.2 HIPOTESIS

Es posible aumentar la vida útil del queso costeño, utilizando recubrimiento de películas comestibles a base de Nisina, con una concentración de NaCl y temperatura de almacenamiento específicas que permitan obtener un producto con características fisicoquímicas, microbiológicas y organolépticas aceptadas por el consumidor.

4.3 POBLACIÓN O UNIVERSO DE ESTUDIO

La población objeto de estudio fue el típico queso costeño que se produce en el Departamento de Córdoba-Colombia. El cual fue elaborado con leche cruda de vaca, obtenida en los hatos de la Universidad de Córdoba sede Berástegui.

4.4 LOCALIZACIÓN

La investigación se llevó a cabo en la planta piloto del programa de Ingeniería de Alimentos de la Universidad de Córdoba sede Berástegui, la cual está ubicada en el kilómetro 10 vía Cereté-Ciénega de Oro (Córdoba-Colombia), con temperatura promedio de 29°C, 86 % humedad relativa y 20 m.s.n.m precipitación

promedio de 1200 mm anuales, enmarcada geográficamente entre los 8° 31' de longitud norte y 75°58' de latitud oeste del meridiano de Greenwich.

Los análisis físico-químicos y pruebas sensoriales se realizaron en el Laboratorio de Lactología y en el de Análisis de Alimentos de la Universidad de Córdoba sede Berastegui.

Los análisis microbiológicos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Investigación de Microbiología de alimento, perteneciente a la facultad de Bacteriología en la sede central de la Universidad de Córdoba

4.5 VARIABLES

4.5.1 Variables independientes

Porcentajes (p/p) de Cloruro de sodio (NaCl) (2,5- 3,0%).

Temperaturas de almacenamiento (12°C y Temperatura ambiente).

4.5.2 Variables dependientes

4.5.2.1 Variables fisicoquímicas

Materia grasa.

pH.

Acidez titulable.

Humedad.

Tiempo de vida útil.

4.5.2.2 Variables sensoriales

Sabor

Apariencia

Textura

4.5.2.3 Variables microbiológicas

Recuento de mohos y levaduras, UFC/g.

Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, UFC/g.

Recuento de Coliformes, UFC/g

Recuento de *E. Coli*, UFC/g.

Detección de *Salmonella*, UFC/g.

4.6. MATERIALES Y MÉTODOS

4.6.1 RECEPCIÓN Y ANÁLISIS DE CALIDAD A LA MATERIA PRIMA

4.6.1.1 Materiales y equipos

Cantinas de aluminio de 20 o 40 litros (Previamente lavadas y desinfectadas), papel filtro, Baldes de 10 litros, recipientes para filtrar, maya para filtrar, agitador, cronometro, frasco lavado, agua destilada, BIOLAC 60, contador de células somáticas De Laval DCC.

4.6.2 PROCEDIMIENTO

4.6.2.1 Recepción de la materia prima

Se recibió la leche, contenida en cantinas de aluminio de 20 o 40 litros provenientes de los hatos de la Universidad de Córdoba sede Berástegui.

Posteriormente se filtró y se refrigeró a una temperatura de 5 a 7°C.

Los análisis de calidad realizados a la materia prima se describen a continuación (tabla 4):

Tabla 4. Análisis de calidad de la materia prima.

MÉTODO	REFERENCIA
Analizador de leche BIOLAC 60	Método Ultrasónico. Citado en Calderón et al (2011).
Contador de células somáticas DE LAVAL.	DeLaval (2005).

4.6.3 TRATAMIENTOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SAL (% p/p)

Para establecer la concentración adecuada de cloruro de sodio se tuvo en cuenta lo establecido en la Resolución 2310 de MINSALUD de Colombia, en la cual se permite utilizar una cantidad máxima del 4.0% (p/p) de cloruro de sodio.

Los tratamientos realizados, son los siguientes:

Tratamiento Control: Queso al 2.5% (p/p) Cloruro de sodio sin recubrimiento de película (TC).

Tratamiento 2: Queso al 2.5% (p/p) Cloruro de sodio con recubrimiento de película (T2).

Tratamiento 3: Queso al 3.0% (p/p) Cloruro de sodio con recubrimiento de película (T3).

4.6.4 ELABORACIÓN DE LOS QUESOS

Calderón et al. (2011), exceptuando el proceso de pasterización de la leche.

4.6.4.1 Materiales y equipos

Cuajo líquido (MILKSET 50), Cloruro de sodio (NaCl), 1 termómetro, agitador para romper la cuajada, beaker de 500 mL, agitador de vidrio, moldes, 370 litros de leche, 150 g Cloruro de calcio (CaCl_2), prensadora, 4 tinas para leche de acero inoxidable, talego, recipiente u olla de acero inoxidable y cuchillo.

4.6.4.2 Procedimiento

4.6.4.2.1 Selección de la materia prima: Se seleccionó la leche que contenía una acidez no mayor de 0.20 % ácido láctico.

4.6.4.2.2 Preparación de la materia prima: La leche se filtró en filtros de papel desechable.

4.6.4.2.3 Adición del cuajo y coagulación de la leche: Antes de adicionar el cuajo se ajustó la temperatura de la leche de 33 a 35°C y se adicionó el Cloruro de calcio (20 g/100 L. leche). Posteriormente, se agregó la dosis correcta de la enzima diluida en agua, dependiendo de su fuerza o poder del cuajo, la temperatura se controló durante la coagulación, y se agitó la leche hasta realizar

una buena distribución del mismo. Por último se dejó en reposo (aproximadamente 45 minutos) hasta coagulación.

4.6.4.2.4 Corte y tratamiento de la cuajada: El corte de la cuajada se realizó en cuadros de 1 a 2 cm de lado dejándose en reposo durante 5 minutos, luego se agitaron lentamente los granos.

4.6.4.2.5 Desuere y salado directo: Se desueró totalmente la cuajada adicionándose directamente cloruro de sodio (2---3%, teniendo en cuenta lo especificado en el ítem 4.6.3) aplicando aireación.

4.6.4.2.6 Moldeado, prensado, empackado y almacenamiento: El queso se moldeó para darle forma y tamaño. Luego se prensó y después de 24 horas fue revestido con las películas comestibles de Nisina y se almaceno a diferentes temperaturas de refrigeración 12°C y temperatura ambiente 30°C.

4.6.5 ELABORACIÓN DE PELÍCULAS ANTIMICROBIANAS A BASE DE CARBOXIMETILCELULOSA (CMC) Y NISINA

4.6.5.1 Elaboración de películas

4.6.5.1.1 Materiales y equipos

Solución acuosa de CMC al 2.46% p/v, glicerol, Nisina, cajas de vidrio (Dimensiones: 56 L* 32 A), micrómetro, termómetro.

4.6.5.1.2 Procedimiento

Las películas antimicrobianas se elaboraron según la metodología descrita por Chams (2013), realizando modificaciones.

1. Se prepararon soluciones acuosas de CMC a 2.46 % p/v a temperatura de 80°C en baño de maría.
2. Se llevó a 60°C en baño de maría y se adicionó glicerol (30 mL) como plastificante y nisina como antimicrobiano en concentraciones de 16 mg.
3. Se homogenizaron las emulsiones y se prepararon las películas esparciendo de manera homogénea 650 mL en cajas de Vidrio.
4. Posteriormente se secó a 60°C por 72 horas.

4.6.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS FISCOQUÍMICOS DEL QUESO COSTEÑO CON PELÍCULA COMESTIBLE

La tabla 5 muestra los análisis fisicoquímicos del queso.

Tabla 5. Análisis fisicoquímicos

ANÁLISIS	MÉTODO
Toma de muestra.	NTC 666. Items 16.3.2.2.2.1-16.3.2.2.2.2
Determinación de materia grasa.	Gerber Van Gulik.FIL-IDF 5.(IDF 1969)
Determinación de acidez titulable.	Titulación con NaOH 0.1 N. Método oficial AOAC 942.15. (AOAC 1990c)

Determinación de sólidos totales y humedad.	IDF - FIL. 4-A.	(IDF 1982)
---------------------------------------------	-----------------	------------

pH.	pH metro. Método oficial AOAC 981.12. (AOAC 2005).
-----	----------------------------------------------------

4.6.7 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS DE LOS QUESOS

Los análisis microbiológicos se realizaron de acuerdo a lo establecido en la NTC 750 del 2009, los cuales son:

1. Recuento de mohos y levaduras, UFC/g.
2. Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, UFC/g.
3. Recuento de Coliformes, UFC/g.
5. Recuento de E. Coli, UFC/g.
6. Detección de Salmonella, UFC/g.

El procedimiento que se siguió para cada uno de los análisis es el descrito por la ICMFS (1984).

4.6.8 ANÁLISIS SENSORIAL

4.6.8.1 Toma de muestras

Para la toma de muestra, se tuvo en cuenta lo establecido en la NTC 666. Item 16.3.2.2.2.2.

4.6.8.2 Prueba de Ordenación por atributos.

Para realizar esta prueba se empleó un panel de 30 jueces no entrenados, consumidores habituales de queso costeño, estudiantes de la Universidad de Córdoba. Los atributos evaluados fueron los siguientes: Apariencia, sabor y textura. Lo anterior teniendo en cuenta el trabajo realizado por Lurueña (2010). De igual forma se tomó el procedimiento descrito por este mismo autor para la realización de la prueba.

4.6.8.3 Prueba Hedónica

Para la realización del análisis sensorial del tratamiento control del día cero se utilizó una prueba hedónica con una escala de 6 puntos, en la cual se evaluó el sabor, apariencia y textura de las diferentes muestras de queso, con un panel de 30 jueces no entrenados, El procedimiento a seguir es el reportado por Hernández (2005).

4.7 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el análisis del efecto del tiempo, temperatura y %p/p Cloruro de sodio sobre la Acidez titulable (%Ácido láctico) y pH en el queso costeño, se empleó un diseño en factorial a diferentes niveles, como se señala a continuación: tiempo (0,5,10,15, 20,25,30, días), temperatura (12 y 30 °C) y %p/p Cloruro de sodio (2,5% p/p sin recubrimiento de película, 2.5 y 3% p/p) y un número de réplicas de 3, para cada tratamiento.

Se realizó un estudio de análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 5%, a través del software SAS 9.1 For window.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Calidad de la materia prima

La tabla 6 muestra datos promedios y la desviación estándar de diferentes análisis fisicoquímicos medidos a través del analizador de leche Biolac 60[®] y recuento de células somáticas (DeLaval 2005[®]).

Tabla 6. Media y desviación estándar de diferentes análisis fisicoquímicos reportados por el analizador de leche Biolac 60[®] y conteo de células somáticas.

Análisis	Valores medios \pm Desviación estándar
Temperatura (°C)	25.67 \pm 0.95
Materia Grasa (%)	4.42 \pm 0.22
Sólidos no grasos (%)	8.48 \pm 0.02
Densidad (gm L ⁻¹)	1.030 \pm 0.02
Proteínas (%)	3.04 \pm 0.02
Lactosa (%)	4.43 \pm 0.30
Agua adicionada (%)	0.00 \pm 0.00
Temperatura de congelación (°C)	-0.54 \pm 0.00
Sólidos (sales) (%)	0.713 \pm 0.005
Ph	6.51 \pm 0.019
Acidez titulable (% Ácido láctico)	0.18 \pm 0.005
Células somáticas μ L ⁻¹	284.33 \pm 0.943

Parámetros como la acidez (% Ácido láctico) y la temperatura de congelación se encuentran por fuera de lo especificado en el decreto 616 de 2006, el cual establece que deben ser 0.13 a 0.17 % de ácido láctico y -0.530 a -0.510 °C, respectivamente.

El porcentaje de ácido láctico es un resultado importante por ser un indicador de la calidad de la leche que llega a una planta procesadora (García et al. 2013) y puede oscilar dentro de un valor más amplio (Flórez y Hernández 2010). Sin embargo, la tabla 1 muestra los demás parámetros evaluados dentro de lo estipulado en el decreto 616 de 2006 y la NTC 399 de 2002, por lo que asociamos este resultado con una acidez aparente y no a una acidez desarrollada por el crecimiento de microorganismo, pudiéndose considerar esta leche de buena calidad. Según Calderón et al. (2006) la leche cruda producida en otras regiones de Colombia, como el Magdalena Medio, muestran porcentaje de acidez que oscilan desde 0.110 a 0.350 Acidez (% Ácido láctico).

La temperatura de congelación, es un parámetro importante en la calidad de la leche y es ampliamente utilizado para detectar la adulteración por agua en la misma. Sin embargo, no es del todo constante, está influenciado por factores relacionados con la variación en el medio ambiente, la raza, composición genética alterada que surge de los programas de cría, así como cambios en los métodos de producción (Henno et al. 2008). Por lo que asociamos la variación presentada a los factores mencionados, y no a una adulteración, debido a que los demás

parámetros que confirman este hecho como lo es la densidad, agua adicionada entre otros están dentro de los rangos normales

Por otra parte el conteo de células somáticas en una leche sin mastitis subclínica es bajo, pero en leches procedentes de cuadros con mastitis subclínicas o clínicas, su número se incrementa y su proporción cambia, de acuerdo a la severidad de la inflamación (Fernández y Oliveira 2006). En este caso el recuento fue de $284.33 \text{ CS } \mu\text{L}^{-1}$ estando este parámetro dentro de lo especificado por Calderón et al. (2006) para una leche de buena calidad ($<100\ 000 \text{ CS mL}^{-1}$). Estos mismos autores realizaron recuentos de células somáticas en leches provenientes del Municipio de Montería (Córdoba) presentándose 345.133 a $302.241 \text{ CS mL}^{-1}$.

5.2 Análisis fisicoquímicos de los quesos

En el día cero y cinco (Temperatura ambiente) se realizaron análisis fisicoquímicos tales como pH, acidez titulable (% Ácido láctico), contenido de materia grasa (%) y humedad (%) a los TC y T3. T2 se excluyó debido a que inicialmente era igual al TC. En la tabla 7 se encuentran reportados promedios y la desviación estándar de dichos análisis.

Tabla 7. Valores medios y desviación estándar de diferentes análisis fisicoquímicos realizados a TC, T2 y T3 en el día cero y cinco.

Tratamiento	Días	pH	Acidez (%Ácido láctico)	Contenido de Humedad (%)	Contenido de materia Grasa (%)
TC	0	5.64 ±0.02	0.7325±0.016	42.93±0.03	24.50±0.10
	5	4.945±0.18	0.1875±0.018	39.37±0,04	25.83±0.04
T2	0	5.64±0.02	0.7325±0.016	42.93±0.03	24.50±0.10
	5	5.08±0.02	0.143±0.014	39.48±0.10	29.75±0.025
T3	0	5.64±0.02	0.7325±0.016	41.93±0.03	25.10±0.17
	5	5.2±0.01	0.1215±0.01	38.48±0.012	31.28±0.021

La determinación de los parámetros relacionados en la tabla 7, de los tratamientos almacenados a temperatura ambiente solo se llevó a cabo hasta el día 5, debido al deterioro visible de los mismos. Para los quesos almacenados a 12 °C los parámetros de pH y Acidez (% ácido láctico) se evaluaron cada cinco días por un periodo de tiempo de 30 días y el contenido de materia grasa (%) y humedad (%) para estos mismos solo se determinó para los días 0 y 30.

Se puede ver que inicialmente los valores de pH y Acidez (% Ácido láctico), presentan una variación poco notable entre los tratamientos, en cambio para el contenido de materia grasa (%) y humedad (%) la variación es mayor, estando lo anterior relacionado con el contenido de cloruro de sodio. Así, T3 presenta mayor contenido de materia grasa (%) y menor porcentaje de humedad (%).

5.2.1 pH

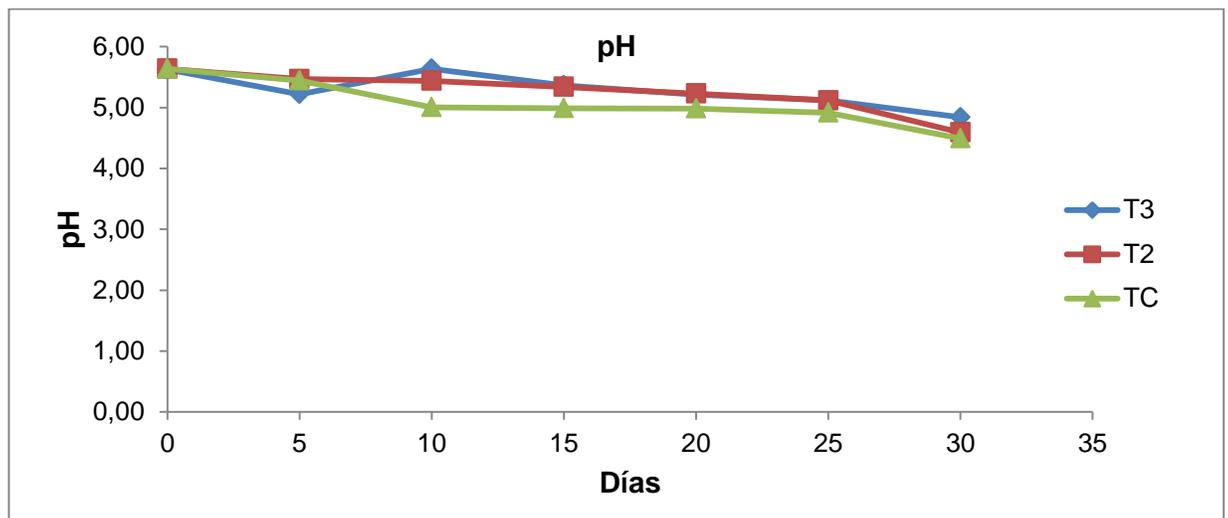
En el día cero se obtuvo un pH de 5.64 para los tratamientos bajo estudio (TC, T2 y T3), para el día treinta los valores medios de pH son TC (4.49); T2 (4.59); T3 (4.84), estos se encuentran por fuera de lo especificado en la normatividad donde se establece que el valor para este parámetro debe estar comprendido en un rango de 5.0 a 5.2 (ICTA 1994). Autores como Morales et al. (2012) y López et al. (2012) obtuvieron un pH de 5.4 para queso Costeño. No obstante, Ballesta (2012) reporta valores que oscilan en un rango de 6.50 a 6.78. La Nisina es, en general, más eficaz en pHs ácidos y tiene una actividad máxima a pH 5.5 (Sanjurjo et al. 2006).

Para estudiar la tendencia de los datos de pH se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 5% evaluándose el comportamiento por días para TC, T2 y T3, los resultados dan a conocer que no existen diferencias significativas los días 5, 10, 15, 20, 25 y 30 a un nivel de significancia del 5% (*Anexos E*). En la figura 1 están representados datos de pH para cada tratamiento en los diferentes periodos de tiempos evaluados.

Se puede observar en la gráfica 1 el comportamiento del pH de los diferentes tratamientos almacenados a 12°C, el cual es inversamente proporcional al tiempo. En definitiva la tendencia del pH fue descender, lo cual para Lurueña (2010) se

asocia a un aumento de la concentración de ácido láctico formado a partir de lactosa por la acción de bacterias ácido-lácticas y a compuestos resultantes de los fenómenos de lipólisis. No obstante para el T3 dicho descenso se detuvo más en el tiempo para ambas temperaturas (Temperatura ambiente y 12°C) en comparación con el tratamiento TC.

Gráfica 1. Comportamiento del pH. (Quesos almacenados a 12°C por un periodo de 30 días).

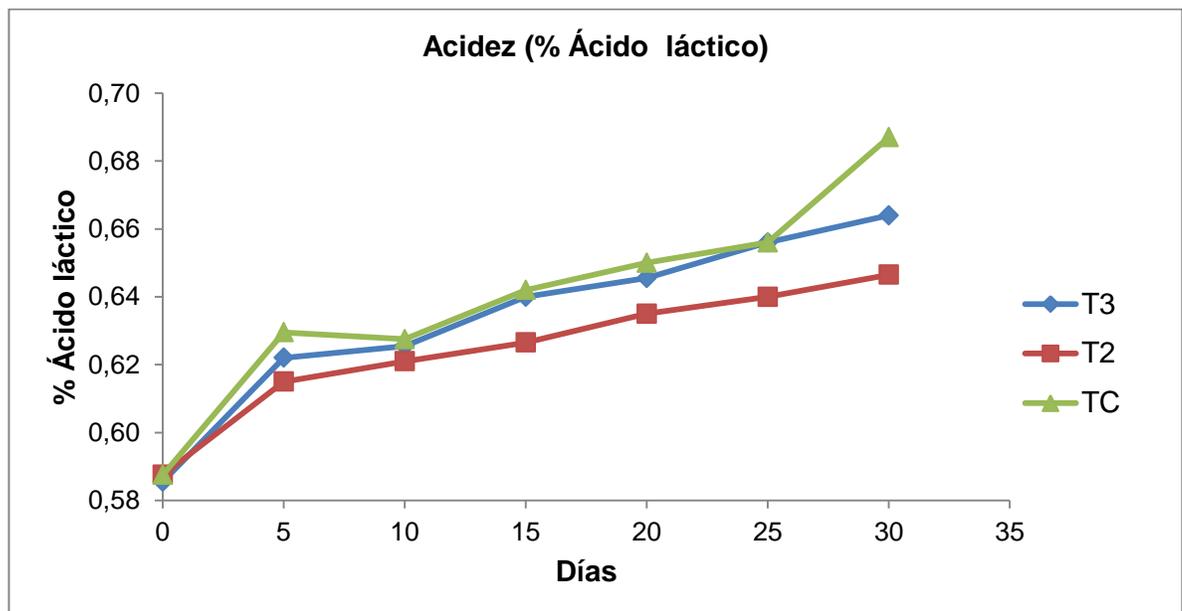


5.2.2 Acidez (% Ácido láctico)

La acidez titulable (% Ácido láctico) para el día cero es de 0.7325 para todos los tratamientos (TC, T2 y T3) y treinta (TC (0.69); T2 (0.66); T3 (0.65)), no está dentro de lo contemplado por autores como Caicedo (2012), Ballesta (2014) y Chávez y Romero (2006) quienes reportan valores de 0.55 , 0.08-0.23 y 0.369-1.14 Acidez (% Ácido láctico), respectivamente.

El comportamiento de la acidez (% Ácido láctico) se evaluó mediante un análisis de varianza (ANOVA) por día con un nivel de significancia del 5%, para TC, T2 y T3. Lográndose establecer que solo para el día 5 y 10 no existen diferencias estadísticamente significativas (*Anexos F*), lo contrario ocurre con los días 15, 20, 25 y 30, donde se detectaron diferencias (*Anexos F*), por lo tanto se empleó la prueba de comparación de medias de Duncan, los resultados son los siguientes: Los día 15, 20 y 25, TC y T3 son iguales y diferentes de T2, por último en el día 30 los tres tratamientos presentan un comportamiento diferente (*Anexos G*), respectivamente. Lo anterior está representado en la gráfica 2.

Gráfica 2. Comportamiento de la acidez titulable (% Ácido láctico). (Quesos almacenados a 12°C por un periodo de 30 días).



En la gráfica 2 se presentan valores promedios de acidez titulable (% Ácido láctico) de los tratamientos almacenados a 12°C, donde se aprecia un resultado directamente proporcional al tiempo, siendo este ascenso mayor para el TC y más leve para el T2.

5.2.3 Contenido de materia grasa (%)

El contenido de materia grasa (%) en el día cero para TC y T2 (24.50 % para ambos) se encuentra dentro del rango reglamentado para este parámetro a diferencia de T3 (25.10 %) que supera dichos valores. Este mismo análisis realizado el día treinta para TC, T2 y T3 (30.33, 34.99 y 40.27 %) está por fuera del rango establecido, siendo este de 23 a 25 % (ICTA 1994). Estos resultados coinciden con lo reportado por autores como Chávez y Romero (2006) quienes obtuvieron contenidos de materia grasa (%) para queso tipo Costeño fresco en rangos de 19-26%. No obstante, Morales et al. (2012) y López et al. (2012) obtuvieron valores medios de 25.5 y 31 contenido de materia grasa (%) en este mismo tipo de queso, respectivamente.

Investigadores como Guinee y McSweeney (2006) han reportado estudios de contenido de materia grasa (%) en diferentes tipos de queso, en los que se ha logrado establecer que la grasa constituye el componente mayoritario, con valores comprendidos entre 42 % y 56 % para la mayoría de variedades y las diferencias

en dicho contenido entre una variedad y otra, dependen de varios factores, como la composición de la leche (en particular de la relación proteína/grasa) y del proceso de elaboración del queso.

Inicialmente las determinaciones de contenido de grasa (%) no muestran diferencias estadísticamente significativas para los tratamientos en estudio (*Anexos H*) en cambio para los realizados el día 30 si existen diferencias significativas a un nivel de significancia del 5 % (*Anexo J*), al aplicar el test de comparación de medias de Duncan tenemos que el comportamiento de los tres (TC, T2 y T3) es diferente (*Anexo K*). En la tabla 8 se muestran valores de porcentajes de grasa, de los tratamientos (TC, T2 y T3), almacenados a 12°C.

Tabla 8. Contenido de materia grasa (%) (Tratamientos a 12°C)

Tratamiento	Día	Materia Grasa (%)
TC	0	24.50
	30	30.33
T2	0	24.50
	30	34.99
T3	0	25.10
	30	40.27

Los análisis del contenido de materia grasa (%) TC, T2 y T3 almacenados a temperatura ambiente mostrados en la tabla 7 para el día 5 muestran que no existen diferencias significativas, a un nivel de significancia del 5 % (*Anexo I*).

5.2.4 Contenido de humedad (%)

El contenido de humedad (%) para el día cero (42.93 % (TC y T2); 41.89 % (T3) y treinta (34.63 % (TC), 31.45 % (T2) y 28.94 % (T3)) se encuentra por fuera del rango establecido legalmente para este parámetro, el cual debe ser oscilar entre 45 y 47 % (ICTA 1994). Ballesta (2014) reporta valores promedios del contenido de humedad de 50.62 a 55.25 % en queso costeño con un contenido de sodio del 1% en peso de la cuajada obtenida.

El contenido de humedad (%) inicial no muestran diferencias estadísticamente significativas para los tratamientos en estudio (*Anexos H*) lo contrario ocurre para los realizados el día 30 donde si existen diferencias significativas a un nivel de significancia del 5 % (*Anexo J*), por lo tanto se aplica el test de comparación de medias de Duncan, dando a conocer que el comportamiento es diferente para cada uno de ellos (TC, T2 y T3), (*Anexo K*) . En la tabla 9 se muestran valores de contenido de humedad (%), de TC, T2 y T3, almacenados a 12°C.

Tabla 9. Contenido de Humedad (%) (Tratamientos a 12°C)

Tratamiento	Día	Humedad (%)
TC	0	42.93
	30	34.63
T2	0	42.93
	30	31.45
T3	0	41.89
	30	28.94

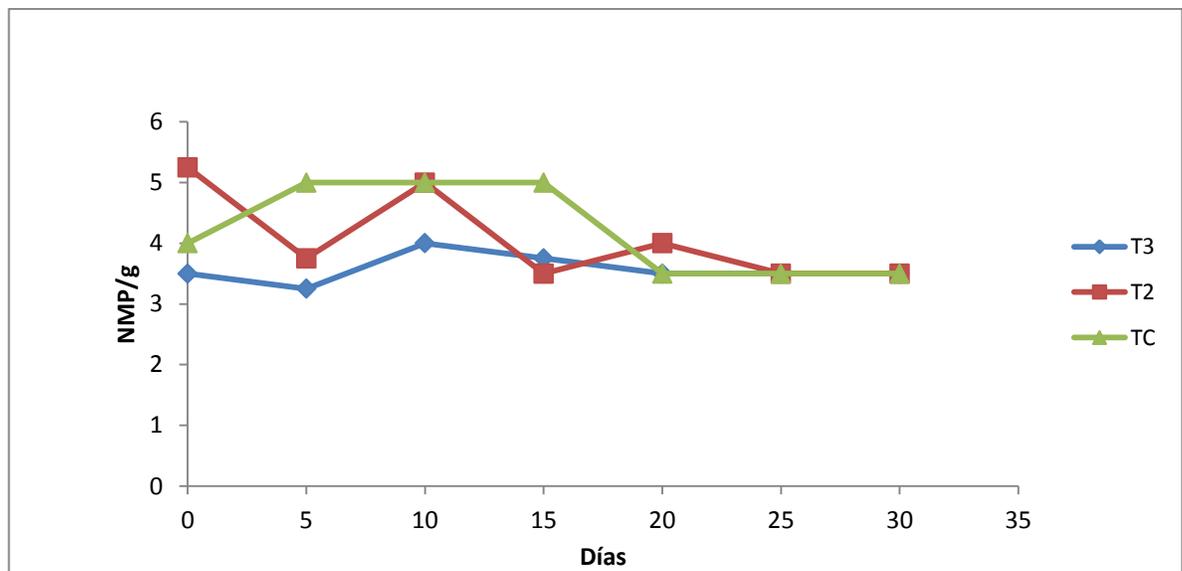
Las determinaciones de contenido de humedad (%) realizadas para TC, T2 y T3 almacenados a temperatura ambiente en el día 5 (*Tabla 7*) muestran que no existen diferencias significativas, a un nivel de significancia del 5 % (*Anexos I*).

La actividad de agua es, junto con el pH, el factor que más afecta a la estabilidad y la conservación del queso, de manera que influye sobre factores como: la calidad microbiológica, el proceso de maduración y el desarrollo de flavor y textura (Lurueña 2010). Este mismo autor declara que la evolución de este parámetro se ve afectada por múltiples factores como lo son la concentración de cloruro de sodio y minerales y fenómenos enzimáticos.

5.3 Análisis microbiológicos

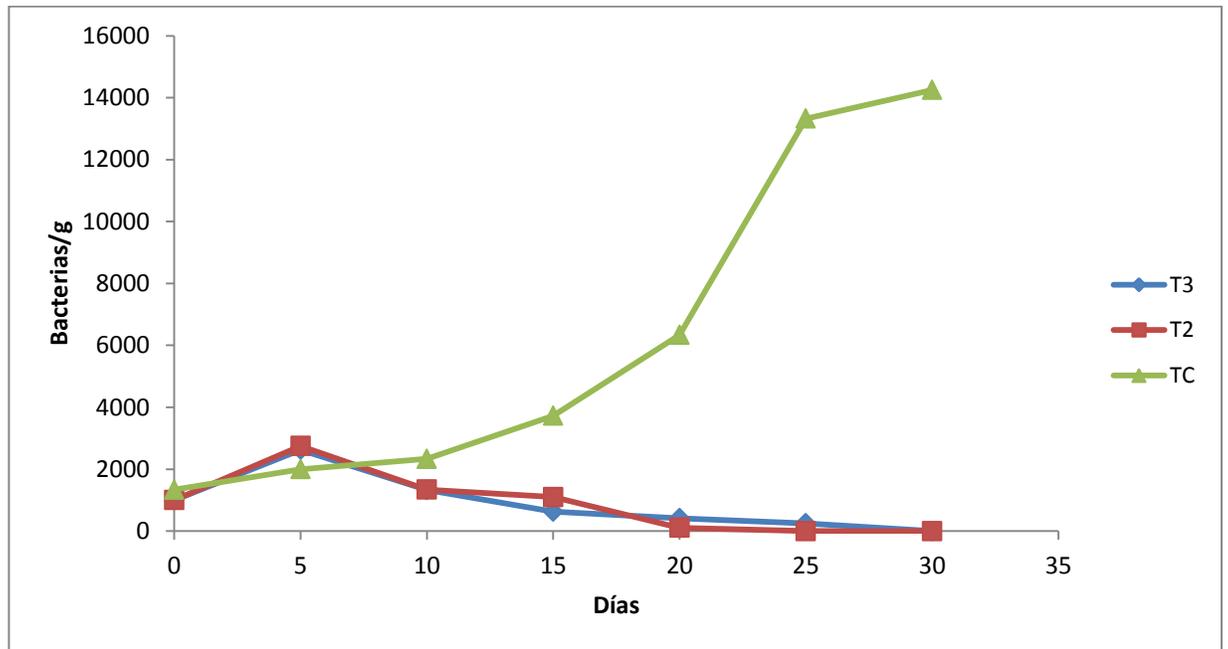
Los análisis de Coliformes totales y *Salmonella spp* efectuados desde el día 0 al 30, a los tratamientos en estudios (TC, T2 y T3) con sus respectivas réplicas mostraron los mismos resultados a 12°C y a temperatura ambiente, para esta ultima los análisis solo se realizaron hasta el día 5, debido a su deterioro por completo en dicho día. Los resultados son >2400 y ausencia, respectivamente.

Grafica 3. Coliformes fecales (Quesos almacenados a 12 °C durante un periodo de 30 días)



De forma general el recuento de Coliformes fecales presentó una disminución a lo largo del estudio a 12°C, pudiéndose evidenciar este comportamiento en la gráfica 3 manifestándose un aumento inesperado al día 10 en los T3 y T2.

Grafica 4. *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva (Quesos almacenados a 12 °C durante un periodo de 30 días)



Como se puede ver en la gráfica 4, el recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva presenta una disminución en el tiempo a 12°C a partir del día 5 para el T2 y T3, llegando a cero el recuento para estos el día 30. Resultados diferentes se obtuvieron en el TC, en donde el número de bacterias/g aumentó significativamente a medida que el tiempo avanzaba.

Resultados parecidos en el análisis microbiológico han reportado Márquez y García (2007) quienes determinaron el efecto de la Nisina sobre la microflora patógena del queso blanco artesanal tipo “telita” obteniendo recuentos de *Staphylococcus aureus* significativamente menores ($p < 0.05$) en las muestras de

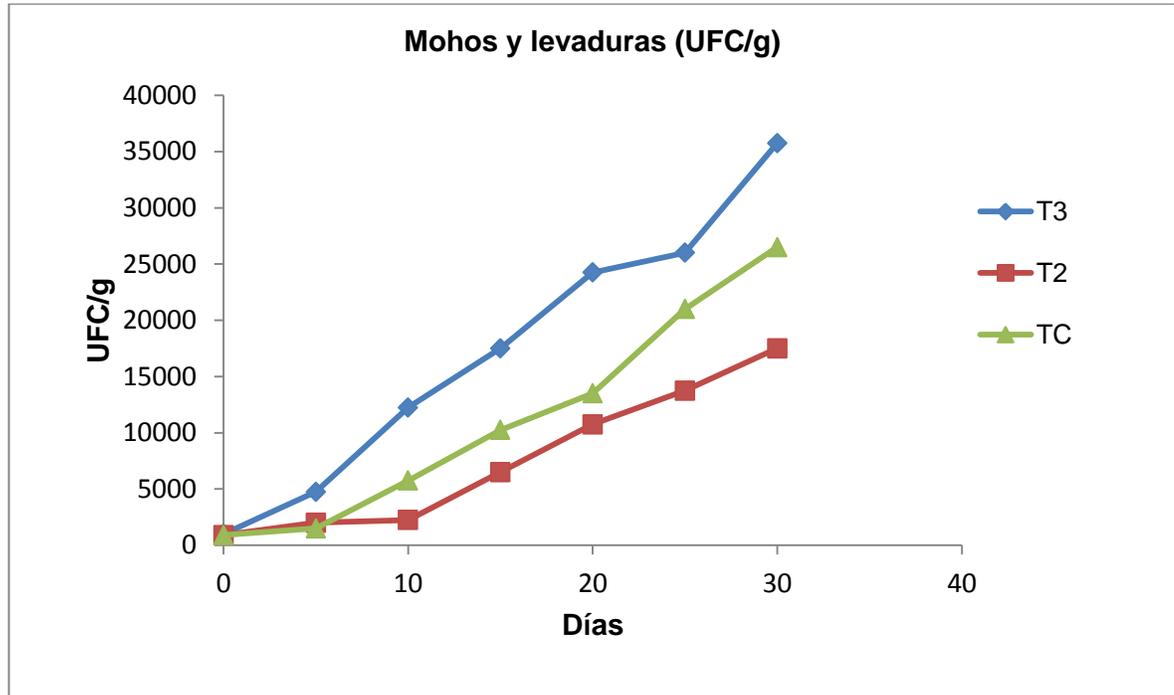
queso “telita” con dos concentraciones de Nisina ensayadas (10 y 16.7 mg kg⁻¹) con respecto a las muestras control. No se detectó *Salmonella spp* ni *Listeria monocytogenes* en ninguna de las muestras analizadas. Se encontró que las dos concentraciones de Nisina adicionadas al queso “telita” ejercieron un efecto inhibitorio sobre la población de *Staphylococcus aureus* presente como microflora contaminante en las mismas.

Pinto et al (2011) estudiaron el efecto de diferentes concentraciones de Nisina (0, 100 y 500 UI mL⁻¹) contra *Staphylococcus aureus* en queso Tradicional Mina Serro fabricados con leche cruda. También evaluaron la influencia de la Nisina en las propiedades físico-químicas, las características mecánicas y el color de los quesos de más de 60 días de maduración. Encontrando que la Nisina fue eficaz en la reducción de *Staphylococcus aureus* manifestándose una reducción de 1.2 y 2.0 ciclos log, lo cual se observó al séptimo día de la maduración de queso que contenían 100 UI mL⁻¹ y 500 UI mL⁻¹ de Nisina, respectivamente, en comparación con la muestra de control. Los principales cambios en las propiedades físico-químicas, características mecánicas y de color se asociaron con la maduración del queso.

Por otra parte, la liberación gradual del agente antimicrobiano de la película comestible también puede ayudar a impedir la proliferación de microorganismos

mejor que la Nisina añadida directamente, porque parece contrarrestar, al menos parcialmente, la inactivación de la misma (Sanjurjo et al. 2006). Sin embargo, de acuerdo con Chung et al. (2001) la liberación lenta puede que no sea tan eficaz como la adición directa del antimicrobiano cuando la concentración inicial del microorganismo es bastante alta

Grafica 5. Mohos y levaduras (Quesos almacenados a 12 °C durante un periodo de 30 días)



En el recuento de mohos y levaduras se obtuvo un comportamiento directamente proporcional al tiempo a 12°C, siendo dicho recuento mayor para el T3.

Tabla 10. Análisis microbiológico (Día cero y día 5 (Temperatura ambiente)).

<i>Tratamientos</i>	<i>Día</i>	<i>Staphylococcus</i>				<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	Mohos y levaduras (UFC/g)
		Coliformes totales (NMP /g)	Coliformes fecales (NMP /g)	<i>aureus</i> coagulasa positiva (Bacterias/g)			
TC	0	2400	4	1333.33	Ausencia	900	
	5	2400	3.5	70000	Ausencia	5500	
T2	0	2400	5.25	1000	Ausencia	900	
	5	2400	5.25	833.33	Ausencia	10250	
T3	0	2400	3.5	1000	Ausencia	1000	
	5	2400	3.5	633.33	Ausencia	17250	

En tabla 10 se presentan valores de recuentos de Coliformes fecales, recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva y mohos y levaduras, realizados a los TC, T2 y T3, para el día cero y día 5, almacenados a temperatura ambiente. Los análisis se realizaron al día 5 del experimento.

El NMP/g de Coliformes fecales se mantuvo constante para los T2 y T3, a diferencia del TC, en donde se puede apreciar una disminución. Para el recuento

de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva es notable un descenso para los T2 y T3, siendo mayor para este último. Un comportamiento diferente mostró el TC el cual registra un aumento significativo con respecto al día cero.

Para mohos y levaduras se presenta un incremento en el número de UFC/g en todos los tratamientos en el día 5 con respecto al día cero, siendo mayor el ascenso para T2 y T3, lo anterior se debe a que la Nisina es un agente antimicrobiano con eficacia hacia una amplia gama de bacterias Gram-positivas, pero muestra poca o ninguna actividad contra bacterias Gram-negativas, levaduras, y mohos (Pintado et al. 2010), por lo tanto no tiene un efecto inhibitorio para mohos y levaduras. La Nisina es un polipéptido hidrófobo y catiónico, un conservante de calidad alimentaria que exhibe actividad antimicrobiana hacia una amplia gama de bacterias Gram-positivas, pero muestra poca o ninguna actividad contra Gram-negativos bacterias, levaduras, y mohos (Delves-Broughton, 2005).

Una hipótesis para la pérdida de bioactividad de la Nisina es que se adsorbe en compuestos insolubles en agua tales como grasa (Chollet et al. 2008). En consecuencia, los resultados de Glass y Johnson (2004) apoyan la hipótesis de que alto contenido de grasa puede reducir la actividad antimicrobiana beneficiosa de la Nisina. Bhatti et al. (2004) encontraron que los bajos contenidos de grasa se correlacionaron con alta actividad antimicrobiana de la misma.

5.4 Evaluación sensorial

Para el análisis estadístico de las evaluaciones sensoriales realizadas, se empleó un análisis de varianza, los resultados son los siguientes: En el anexo E se muestra el análisis de varianza con un nivel de significancia del 5% de datos obtenidos en el análisis sensorial (Escala Hedónica verbal) para el día cero. En donde se comparó el T3 y T2, encontrándose que son significativamente diferentes en cuanto a sabor (P-valor: 0.2576) y apariencia (P-valor: 0.243), a diferencia de la textura, en donde no se detectaron diferencias significativas (P-valor: 0.7718).

Los día 5 al 15, se llevó a cabo la evaluación sensorial mediante una prueba discriminativa (Prueba de ordenamiento), analizando los resultados mediante la tabla de Kramer, con una significancia del 5%. Dando a conocer que no existe diferencia significativa en los aspectos evaluados (textura, apariencia y sabor) para los diferentes tratamientos (TC, T2 y T3).

Para el día 20 al 30, fue necesario emplear una prueba afectiva (Escala hedónica verbal), debido al crecimiento visible de moho y levaduras en el TC, quedando solo dos tratamientos (T3 y T2), los cuales no presentaban evidencias de deterioro visibles, con los que se realizó la evaluación sensorial para dichos días.

No existen diferencias significativas a un nivel de significancia del 5% (Anexo LI) para el día 20 en los tratamientos (T2 y T3) al evaluar el sabor (P-valor: 0.0034),

pero existen diferencias significativas en cuanto a la apariencia y la textura (P-Valor: 0.5576 y P-Valor: 0.896, respectivamente)

Se puede inferir del anexo M (Día 25) que no existen diferencias significativas a un nivel de significancia del 5% al comparar el T2 y T3 en cuanto al parámetro sabor (P-valor 0.02). En cambio en el anexo M se aprecia para la textura y apariencia (P-valor: 0.885 y P-valor 0.2566), diferencias significativas a un nivel de significancia del 5%, al confrontar los mismos tratamientos.

Para el día 30, se puede decir que no existen diferencias significativas al comparar el sabor de los T2 y T3. En cambio para los parámetros textura y apariencia (P-valor: 0.0798 y P-valor: 0.0566) de los mismos tratamientos si existen diferencias significativas (*Anexo M*).

Con respecto a la textura y el color de los quesos almacenados en refrigeración (12°C), presentaron una notable variación, pasando de una textura blanda a ser quesos duros, y de un color blanco cremosos a amarillentos (*Figura 3*), lo cual asociamos a cambios químicos que se dan en los componentes del mismo y a la pérdida de humedad progresiva, que se transfiere del queso a la película y de esta al medio hasta quedar en equilibrio con la humedad relativa del ambiente, como era de esperarse en el T3 se presentó una mayor pérdida de agua debido al porcentaje de cloruro de sodio, en comparación con el T2. Resultados parecidos han sido obtenidos por Estrella (2013) quien evaluó quesos sin ningún tipo de recubrimiento almacenado a temperatura de refrigeración presentándose cambios

en el color y la textura. Lurueña (2010) también observó cambios en el color y la dureza a través del tiempo en una variedad de queso tipo mozzarella asociando dicho comportamiento a la proteólisis y la pérdida de humedad, fenómenos que afectan notablemente a la estructura del queso.

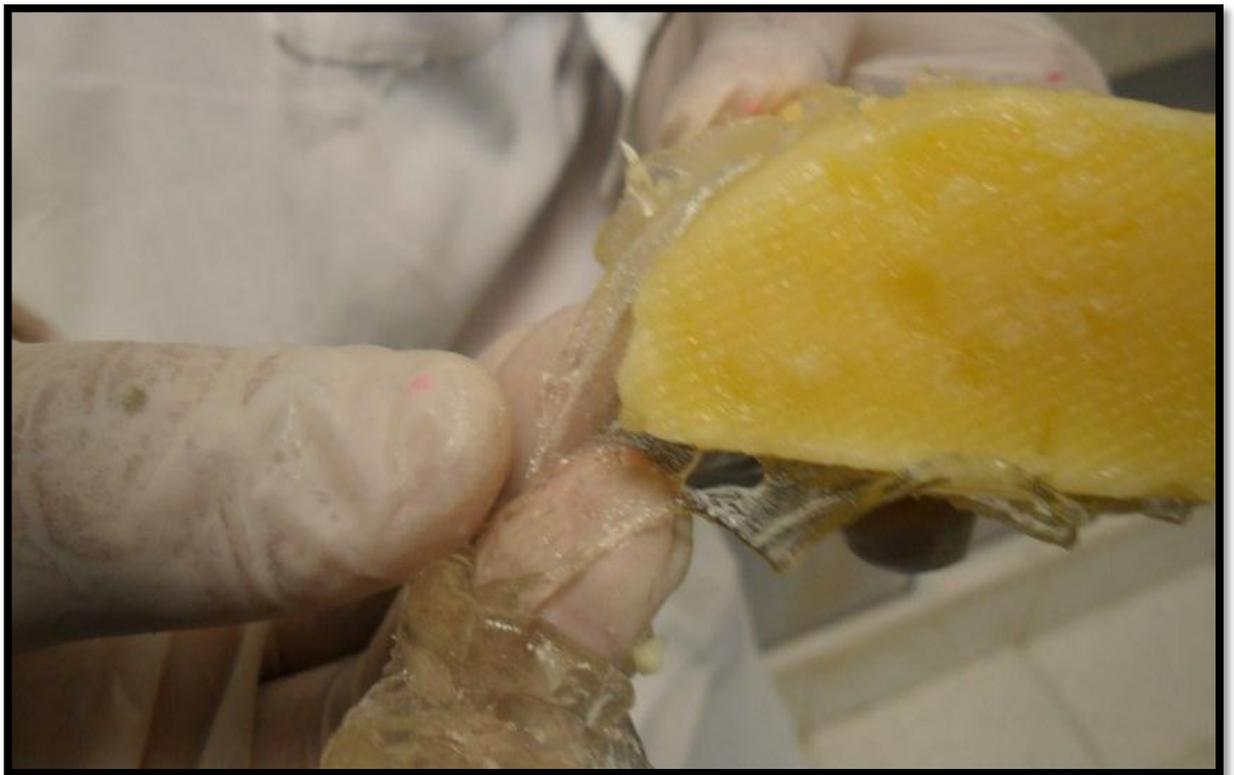


Figura 3. Aspecto de quesos almacenados a 12 °C al día 30

6. CONCLUSIONES

La película antimicrobiana con una concentración de Nisina de 16 mg/100mL de solución, aumenta la vida útil del queso almacenado a 12 °C en 12 días respecto a lo establecido para quesos sin películas de la NTC 750 de 2009, para un total de 30 días.

El comportamiento del pH respecto a los porcentajes de cloruro de sodio empleados es el mismo para los tratamientos en estudio, caso contrario ocurre con la acidez (% de ácido láctico) en donde se presentaron diferencias en los días 15, 20, 25 y 30.

Los tratamientos con películas y diferente concentración de cloruro de sodio (T2 y T3) durante los 30 días de estudio fueron aceptados organolépticamente por los panelistas a diferencia del tratamiento control que a los 15 días de almacenamiento se le detectó presencia de mohos y levadura impidiendo su estudio sensorial.

La condición que presenta una menor degradación del queso durante los 30 días fue la temperatura de refrigeración (12°C), en cuanto a la concentración de cloruro de sodio se presentó un comportamiento similar para cada uno de los parámetros estudiados

En los quesos almacenados a temperatura ambiente y temperatura de refrigeración se aceleró el crecimiento de microorganismos tales como mohos y levaduras

7. RECOMENDACIONES

- ❖ Desarrollar estudios similares empleando más de dos temperaturas de almacenamiento y por lo menos dos de estas deben ser de refrigeración, para poder garantizar la aplicación de la metodología de Arrhenius en la predicción la vida útil del producto.

- ❖ Agregar un agente antimicótico a la película para inhibir el crecimiento de mohos y levaduras.

- ❖ Realizar estudios con películas antimicrobianas aplicadas a queso costeño que permitan determinar la migración de la Nisina desde la película hasta el centro del producto.

- ❖ Coordinar estudios con las autoridades competentes que permitan determinar el grado de contaminación del queso costeño elaborado en el departamento de Córdoba, y así tomar acciones que permitan la implementación de este tipo de recubrimientos, para garantizar que sea un producto más inocuo al momento de ser consumido.

8. ANEXOS

Anexo A. Película comestible sobre queso costeño (Día 0)



Anexo B. Película del queso costeño (Día 20)



Anexo C. Formato evaluación sensorial (Prueba de ordenamiento)

Nombre: _____ Fecha: _____

Frente a usted hay tres muestras de queso, por favor pruébelas y ordénelas en forma creciente de acuerdo a su preferencia en cuanto a los siguientes atributos: apariencia, sabor y textura. Lave su boca entre cada muestra y espere 30 segundos.

Cada muestra deber llevar un orden diferente, dos muestras no deben tener el mismo orden.

Apariencia	Sabor	Textura

COMENTARIOS: _____

Muchas Gracias!

.Anexo D. Formato evaluación sensorial (Escala hedónica)

Nombre: _____ Fecha: _____

Frente a usted hay tres muestras de queso, por favor pruébelas y asígnele una puntuación según la tabla que se le presenta en cuanto a los siguientes atributos: apariencia, sabor y textura. Lave su boca entre cada muestra y espere 30 segundos.

Cada muestra deber llevar un orden diferente, dos muestras no deben tener el mismo orden.

Muestra: 015

	Apariencia	Sabor	Textura
Me disgusta extremadamente.			
Me disgusta mucho			
Me disgusta moderadamente			
Me gusta moderadamente			
Me gusta mucho			
Me gusta extremadamente			

Muestra: 340

	Apariencia	Sabor	Textura
Medisgusta extremadamente.			
Me disgusta mucho			
Me disgusta moderadamente			
Me gusta moderadamente			
Me gusta mucho			
Me gusta extremadamente			

COMENTARIOS: _____

Muchas Gracias!

Anexo E. Análisis de varianza para pH a 12°C

❖ Día 5

Fuente	G.I	Cuadrado	Suma de cuadrado de la media	F-valor	Pr > F
Modelo	2	0.07417778	0.03708889	0.22	0.8121
Error	3	0.49844444	0.16614815		
Total correcto	5	0.57262222			

❖ Día 10

Fuente	G.I	Cuadrado	Suma de cuadrado de la media	F-valor	Pr > F
Modelo	2	0.41793704	0.20896852	9.35	0.0514
Error	3	0.06707222	0.02235741		
Total correcto	5	0.48500926			

❖ Día 15

Fuente	G.I	Cuadrado	Suma de cuadrado de la media	F-valor	Pr > f
Modelo	2	0.17672593	0.08836296	4.01	0.1422
Error	3	0.06617778	0.02205926		
Total correcto	5	0.24290370			

❖ Día 20

Fuente	G.I	Cuadrado	Suma de cuadrado de la media	F-valor	Pr > f
Modelo	2	0.09219259	0.04609630	3.31	0.1744
Error	3	0.04183889	0.01394630		
Total correcto	5	0.13403148			

❖ Día 25

Fuente	G.I	Cuadrado	Suma de cuadrado de la media	F-valor	Pr > f
Modelo	2	0.05512593	0.02756296	0.69	0.5673
Error	3	0.12006111	0.02756296		
Total correcto	5	0.17518704			

❖ Día 30

Fuente	G.I	Cuadrado	Suma de cuadrado de la media	F-valor	Pr > f
Modelo	2	0.13000000	0.06500000	0.70	0.5648
Error	3	0.28041667	0.09347222		
Total correcto	5	0.41041667			

Anexo F. Análisis de varianza para la Acidez (% Ácido láctico)

❖ Día 5)

Fuente	G.I	Cuadrado	Suma de cuadrado de la media	F-valor	Pr > f
Modelo	2	0.00021033	0.00010517	8.19	0.0609
Error	3	0.00003850	0.00001283		
Total correcto	5	0.00024883			

❖ Día 10

Fuente	G.I	Cuadrado	Suma de cuadrado de la media	F-valor	Pr > f
Modelo	2	0.00004300	0.00002150	0.48	0.6596
Error	3	0.00013450	0.00004483		
Total correcto	5	0.00017750			

❖ Día 15

Fuente	G.I	Cuadrado	Suma de cuadrado de la media	F-valor	Pr > f
Modelo	2	0.00028433	0.00014217	170.60	0.0008
Error	3	0.00000250	0.00000083		
Total correcto	5	0.00028683			

❖ Día 20

Fuente	G.I	Cuadrado	Suma de cuadrado de la media	F-valor	Pr > f
Modelo	2	0.00023700	0.00011850	14.51	0.0287
Error	3	0.00002450	0.00000817		
Total correcto	5	0.00026150			

❖ Día 25)

Fuente	G.I	Cuadrado	Suma de cuadrado de la media	F-valor	Pr > f
Modelo	2	0.00034133	0.00017067	18.29	0.0209
Error	3	0.00002800	0.00000933		
Total correcto	5	0.00036933			

❖ Día 30

Fuente	G.I	Cuadrado	Suma de cuadrado de la media	F-valor	Pr > f
Modelo	2	0.00165033	0.00082517	0.0111	0.0111
Error	3	0.00008650	0.00002883		
Total correcto	5	0.00173683			

Anexo G. Prueba de comparación de medias Duncan para la Acidez (% Ácido láctico)

❖ Día 15)

DUNCAN	Numero de agrupamiento	Media observaciones	Tto
A	0.6420000	2	C
A	0.6400000	2	3
B	0.6265000	2	2

Nota: Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

❖ Día 20

DUNCAN	Numero de agrupamiento	Media observaciones	Tto
A	0.650000	2	C
A	0.645500	2	3
B	0.635000	2	2

Nota: Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

❖ Día 25

DUNCAN	Numero de agrupamiento	Media observaciones	Tto
A	0.656000	2	C
A	0.656000	2	3
B	0.640000	2	2

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

❖ Día 30

DUNCAN	Numero Nota: de agrupamiento	Media observaciones	Tto
A	0.687000	2	C
B	0.664000	2	3
C	0.646500	2	2

Nota: Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Anexo H. Análisis de varianza para el contenido de materia Grasa (%) y
Humedad (%)

❖ Día 0

Fuente	G.I	Cuadrado	Suma de la media	cuadrado de	F-valor	Pr > f
Modelo	2	0.00000000	0.00000000		0.00	1.0000
Error	3	0.00240000	0.00080000			
Total correcto	5	0.00240000				

❖ Día 0

Fuente	G.I	Cuadrado	Suma de la media	cuadrado de	F-valor	Pr > f
Modelo	2	0.00000000	0.00000000		0.00	1.0000
Error	3	1.13535000	0.37845000			
Total correcto	5	1.13535000				

Anexo I. Análisis de varianza para el contenido de materia Grasa (%) y Humedad (%) a temperatura ambiente

❖ Día 5

Fuente	G.I	Cuadrado	Suma de la media	cuadrado de	F-valor	Pr > f
Modelo	2	31.49763333	15.74881667		8.58	0.0574
Error	3	5.50570000	1.83523333			
Total correcto	5	37.00333333				

❖ Día 5

Fuente	G.I	Cuadrado	Suma de la media	cuadrado de	F-valor	Pr > f
Modelo	2	1.21543333	0.60771667		0.95	0.4799
Error	3	1.92505000	0.64168333			
Total correcto	5	3.14048333				

Anexo J. Análisis de varianza para el contenido de materia Grasa (%) y Humedad (%) a temperatura de refrigeración (12°C)

❖ Día 30

Fuente	G.I	Cuadrado	Suma de la media	cuadrado de	F-valor	Pr > f
Modelo	2	104.9931000	52.4965500		2571.26	<.0001
Error	3	0.0612500	0.0204167			
Total correcto	5	105.0543500				

❖ 30

Fuente	G.I	Cuadrado	Suma de la media	cuadrado de	F-valor	Pr > f
Modelo	2	32.58043333	16.29021667		33.40	0.0089
Error	3	1.46325000	0.48775000			
Total correcto	5	34.04368333				

Anexo K. Prueba de comparación de medias Duncan para contenido de materia Grasa (%) y Humedad (%)

❖ Día 30

DUNCAN	Numero de agrupamiento	Media observaciones	Tto
A	40.2700	2	3
B	34.9900	2	C
C	30.0250	2	2

Nota: Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

❖ Día 30

DUNCAN	Numero de agrupamiento	Media observaciones	Tto
A	34.6300	2	2
B	31.4500	2	3
C	28.9350	2	C

Nota: Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Anexo L. Análisis de varianza para evaluación sensorial día cero

❖ Sabor

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	1	1.350	1.350	1.31	0.257
Error	58	59.90	1.03275862		
Total correcto	59	61.250			

❖ Apariencia

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	1	0.8166	0.8166	1.39	0.2438
Error	58	34.166	0.5890		
Total correcto	59	34.983			

❖ Textura

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	1	0.0666	0.066	0.08	0.771
Error	58	45.533	0.785		
Total correcto	59	45.600			

Anexo LI. Análisis de varianza para evaluación sensorial día 20

❖ Sabor

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	1	9.600	9.600	3.32	0.0034
Error	58	59.733	1.029		
Total correcto	59	69.333			

❖ Textura

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	1	0.266	0.266	0.35	0.5576
Error	58	44.466	0.766		
Total correcto	59	44.733			

❖ Apariencia

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	1	0.0166	0.016	0.02	0.896
Error	58	56.833	0.979		
Total correcto	59	56.850			

Anexo M. Análisis de varianza para evaluación sensorial día 25

❖ Sabor

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	1	0.016	0.016	1.31	0.02
Error	58	46.166	0.795		
Total correcto	59	46.183			

❖ Textura

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	1	0.0166	0.016	0.02	0.8854
Error	58	46.166	0.795		
Total correcto	59	46.183			

❖ Apariencia

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	1	1.350	1.350	1.31	0.2566
Error	58	59.633	1.028		
Total correcto	59	60.983			

Anexo N. Análisis de varianza para evaluación sensorial día 30

❖ Sabor

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	1	5.40	5.40	5.02	0.0288
Error	58	62.333	1.074		
Total correcto	59	67.733			

❖ Textura

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	1	2.816	2.816	3.18	0.0798
Error	58	51.366	0.885		
Total correcto	59	54.183			

❖ Apariencia

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	1	3.266	3.266	3.78	0.0566
Error	58	50.066	0.863		
Total correcto	59	53.333			

9. BIBLIOGRAFÍA

Association Official analysis Chemical. A.O.A.C. Official methods 981.12 Ed.18; Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st Edition Washington . 2005.

Association Official analysis Chemical.AOAC. Determinación de cenizas: Metodogravimétrico. Official Method 935.42.15th Ed. Washington. 1990a.

Association Official analysis Chemical. AOAC. Official Methods: 942.15. 15th edition. Virginia, USA. 1990c.

Baldizón, C. Molina, M. 2008. Córdoba Estimación de la vida útil de una mayonesa mediante pruebas aceleradas. Revista de ingeniería de la universidad de Costa Rica, vol.18 (1,2). Editorial UCR Pág. 57-64.

Ballesta, I. 2014. Evaluación de la calidad del queso costeño elaborado con diferentes tipos de cuajo (animal y microbiano) y la adición o no de cultivos lácticos (*Lactococcus lactis subps. Lactis* y *Lactococcus Lactis subps. Cremoris*). Tesis: Magister en ciencia y tecnología de alimentos. Universidad nacional de colombia -Sede Medellín.

Bhatti, M. Veeramachaneni, A. Shelef. L. A (2004). Factors affecting the antilisteria effects of nisin in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 97. p. 215–219

Borras, M. 2011. Evaluación de los métodos de cribado para el control de la presencia de antibióticos en la leche cruda de vaca. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. Valencia-España.

Calderón, R., Rodríguez, V y Vélez, S. 2007. Evaluación de la calidad de leches en cuatro procesadoras de quesos en el municipio de montería, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 12(1), 912-920.

Calderón, A., García, F y Martínez, G. 2006. Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia, *Revista MVZ Córdoba*, 11(1), 725-737.

Calderón, A. Arteaga, M. Rodríguez, V. Arrieta, G. Bermúdez, D. and Villareal, V. 2011. Efecto de la mastitis subclínica sobre el rendimiento en la fabricación del queso costeño. *Biosalud* [online]. 10(2)16-27. ISSN 1657-9550.

Cao-Hoang, L., Chaine, A., Grégoire, L., and Waché. 2010. Potential of nisin-incorporated sodium caseinate films to control *Listeria* in artificially contaminated cheese. *Food microbiology*, 27(7):940-944.

Carrillo, M., Mondragon, F. 2011. Estudio se vida útil del queso asadero. Unidad académica multidisciplinaria zona huasteca, universidad de san Luis potosí (mexico). *Revista salud pública y nutrición (RESPYN)*. 12 (3).

Castro, G A. 2007. Evaluación del efecto biopreservador del *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* en queso blanco. Tesis Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Zulia. Venezuela.

Cava, R.; Sangronis, E.; Lucci, E. y Woyzechowsky, L. 2006. Efecto de la adición de Nisina en queso fresco "telita" sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus*. *AnVenezNutr.* 19 (2): 69-73.

Caicedo, I. B. (2012). Caracterización de potencialidades para la instalación de una planta de queso fresco artesanal "tipo costeño colombiano" con proyección como producto vinculado al origen. Universidad para la cooperación internacional (UCI). Master en gerencia de programas sanitarios en inocuidad de alimentos. San Jose (Costa Rica).

Cotter D. P., Hill C y Ross P. R. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews.* 3:777-788.

Clark, S., Warner, W. and Luedecke, L. 2001. Acceptability of Queso Fresco cheese by traditional and nontraditional consumers. *Food Science and Technology International* 7(2):165-170.

Cha, D S.; Cooksey, K.; Chinnan, M S. and Park HJ. 2003. Release of nisin from various heat pressed and cast films. *Lebensm.-Wiss.U.-Technol* 36:209-13.

Chávez, A., Romero, A. Diagnóstico de las condiciones microbiológicas y fisicoquímicas del queso costeño producido en el municipio de Sincé-Sucre, Colombia [Tesis de Grado]. Sincelejo: Universidad de Sucre. Facultad de Ingeniería; 2006. 115p. Disponible en:[http://biblioteca.unisucre.edu.co:8080/dspace/bitstream/123456789/242/1/T637.32%20C5 12.pdf](http://biblioteca.unisucre.edu.co:8080/dspace/bitstream/123456789/242/1/T637.32%20C5%2012.pdf) Consulta: Septiembre de 2011.

Chams, L. 2013. Efecto de Películas Antimicrobianas sobre la Supervivencia de *Salmonella sp.* y *Staphylococcus aureus* en Queso Costeño elaborado con Diferentes Concentraciones de Cloruro de Sodio. Tesis en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad De Córdoba. Montería-Colombia.

Chollet, E., Sebti, I., Martial-Gros, A., y Degraeve, P. (2008). Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. *Food Control*, 19(10):982-989.

Chung, D. Chikindas, M y Yan. K. 2001. Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by slow release of propyl paraben from a polymer coating. *Journal of Food Protection*. 64 (9):1420–1424.

Davies, E.; Bevis, H. and Delves-Broughton, J. 1997. The use of bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol.* (24), 5, 343-346).

Dawson, P L.; Hirt, D E.; Rieck, J R.; Acton, J C. and Sotthibandhu A. 2003. Nisin release from films is affected by both protein type, and film-forming method. *Food Research Int* 36:959-68.

DeLaval. Manual de instrucciones. DeLavalcellcounter DCC. Tumba: DeLaval International AB; 2005.

Delves-Broughton, J. 2005. Nisin as a food preservative. *Food Australia*, 57 (12):525–527.

Decreto, 616. Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendia, importe o exporte en Colombia, 13, Bogotá, Colombia (2006).

Diez, L. 2011. Efecto de agentes enológicos y pediocina PA-1 sobre las bacterias lácticas del vino. Tesis Doctoral. Universidad de La Rioja. La Rioja-España.

Dosta, M. D. C., Barrera, T. C., Perrino, F. J. F., and Reyes, L. M. 2009. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS*, 73:63-72.

Durango, A., Soares, N. y Arteaga, M., 2011. Filmes y revestimientos comestibles como empaques activos biodegradables en la conservación de

alimentos. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*. 9(1):112-118.

Durán, M., Montero, P., Flórez, W., Franco, V. y Coneo, R. 2010. Evaluación higiénico-sanitaria y acción antagónica de cepas de lactobacilos comerciales frente a microorganismos patógenos (*Escherichia coli*) presentes en el queso de capa del municipio de Mompox. *Revista Científica*, 20(003):312-317.

Dutta, J., Tripathi, S., and Dutta, P. K. 2012. Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications. *Food Science and Technology International*. 18(1):3-34.

Estrella, G. 2013. Monitoreo de la calidad e inocuidad durante el almacenamiento de queso fresco elaborado artesanalmente en las parroquias rurales del cantón Riobamba. Tesis Bioquímico Farmacéutico. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador.

Fernandes, A.M. y Oliveira, C.A.F. 2006. Actividad enzimática relacionada às células somáticas no leite. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora. 61:350-355.

Flores, J y Hernández, R., 2010. Evaluación, de las características fisicoquímicas universidad de el salvador facultad multidisciplinaria oriental departamento de ciencias agronómicas, Ingeniero agrónomo, Universidad del salvador, San salvador.

García, C., Guzmán, E y Zaldívar, N. 2013.Parámetros físico-químicos de leche cruda. *Revista producción animal*, 25 (1):2.

Gallegos, J. Arrieta, G. Máttar, S. Poutou, R.Trespalacios, A. M. Carrascal, A. 2007. Frecuencia de *Listeria* spp., en quesos colombianos costeños. *Rev.MVZ Córdoba* 12(2): 996-1012.

Gervasio G. A. 2012. Determinación de sustancias tipo bacteriocinas producidas por cepas identificadas como *Weissella* sp. Tesis Doctoral en Especialista en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F. – México.

González, R.E. 2010. Caracterización de la composición físico química del queso fresco elaborado artesanalmente en Sehaulaca, municipio de Minatitlán, Veracruz. Tesis Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Veracruzana. Mexico.

González, B. E., Gómez, M., y Jiménez, Z. 2003. Bacteriocinas de probióticos. *Revista de de Salud Pública y Nutrición*, 4(2).

Guinee, T.P. y McSweeney, P.L.H. (2006).Significance of milk fat in cheese.En: Fox, P.F y McSweeney, P.L.H. (ed.), *Advanced dairy chemistry*. Volume 2. Lipids. 3ª ed. Nueva York, EEUU: Springer.

Glass, K. Johnson E. (2004). Efecto antagonista de la grasa en la actividad antibotulinal de conservantes de alimentos y ácidos grasos. *Microbiología de Alimentos*, 21.p. 675-682.

Henno, M., Joudu, I., Kaart, T and Kärt, O. 2008. Factors affecting the freezing point stability of milk from individual cows. *International dairy journal*, 18(2), 210-215.

Hernández, E. 2005. Evaluación sensorial. Unad. Primera edición. Pag. 85.

ICMSF. Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis Microbiológico. Vol. 1, 2da edición, Editorial Acribia. Zaragoza, España,1984.

ICTA, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, guía para producir quesos colombianos, Bogotá 1994.

IDF, International Dairy Federation. Cheese and processed cheese. Determination of the total solids content (Reference method) i.s. IDF - FIL. 4-A. *Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium.* 1982.

IDF, International Dairy Federation. Determinación del contenido en materia grasa del queso y de los quesos fundidos (método de referencia). Código de Principios referente a la leche y a los Productos Lácteos. Norma B-3. FIL-IDF 5A. 1969.

Jorgensen, H., Mork, T. y Rorvik, L- 2005. Presencia de *Staphylococcus aureus* en una granja con producción a pequeña escala de queso de leche de vaca. *Revista de Dairyscience*. 88:3810 – 3819

Krasniewska, K. and Gniewosz, M. 2012. Substances with antibacterial activity in edible films - A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 62(4).

Ko, S., Janes, M.E., Hettiarachchy, N.S. y Johnson, M.G. 2001. Physical and chemical properties of edible films containing nisin and their action against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Science*. 66(7):1006-1011.

Kristo, E., Koutsoumanis, K. and Biliaderis, C. 2008. Thermal, mechanical and water vapor barrier properties of sodium caseinate films containing antimicrobials and their inhibitory action on *Listeria monocytogenes*. *Food Hydrocolloids*, 22(3): 373–386.

Leggett, L. N., Tomasula, P. M., Van Hekken, ,D.L., Porto-Fett, A., Shoyer, B., Renye, J. A., and Farkye, N. 2012.Effect of storage at 4 and 10 °C on the growth of *Listeria monocytogenes* in and on queso fresco. *Journal of Food Safety*, 32(2):236.

Lin, C.M., Zhang, L., Doyle, M.P. and Swaminathan, B. 2006. Comparison of media and sampling locations for isolation of *Listeria monocytogenes* in queso fresco cheese. *Journal of Food Protection*, 69(9):2151-2156.

López, T., Rodríguez, E., Sepúlveda, J. 2012. Evaluación de las características físicas y texturales del pandebono. *Acta gastronómica*: 61(3):273-281.

Lurueña, M. 2010. Efecto de la raza y del recuento de células somáticas sobre la calidad del queso de oveja. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. Zamora-España.

Novoa, C., Lopez, N. 2008. Evaluación de la vida útil sensorial del queso doble crema con dos niveles de grasa. *Revista de medicina veterinaria y zootecnia* Vol. 55. PAg. 2.

NTC, 399. Productos lácteos, leche cruda, 2, Bogotá, Colombia. 2002

NTC, 666, Leche y productos lácteos. Guía para muestreo, 23-24, Bogotá, Colombia (1996).

NTC, 750, Productos lácteos. Queso,6-8, Bogotá, Colombia (2009).

Maldonado, R. y Llancas, L., 2007. Efecto de la incorporación de Nisina sobre la supervivencia del *Staphylococcus aureus* en queso de mano, *Rev. Fac. Agron.* 33(3):147- 163.

Márquez, J. García, C. 2007. Efecto de la Nisina sobre la microflora patógena del queso blanco artesanal tipo "telita" elaborado en una quesera de Upata, Estado Bolívar, Venezuela." *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 27 (2): 108-111.

MADR (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural). 2012. Boletín Mensual: Unidad de seguimiento de precios de la leche. Internet: http://portal.fedegan.org.co/pls/portal/docs/PAGE/PORTAL/ESTADISTICAS1/PRODUCCION/COYUNTURA_LACTEA/BOLETIN%20COYUNTURA%20SECTOR%20LACTEO%20-%20USP%20-%20JULIO%202012.PDF. (11 de Julio 2013).

Melgar, A., Borge, D., Perez, J. 2008. Estudio cinético del proceso de devolatilización de biomasa lignocelulósica mediante análisis termogravimétrico para tamaños de partícula de 2 a 19 mm. *Revista Dyna* Vol. 75 (155), Pág. 123-131.

MinSalud (Ministerio de Salud y Protección Social), 2013. Documento de experiencias exitosas de cómo se ha aplicado el análisis de riesgos en Colombia. Internet: http://www.osancolombia.gov.co/doc/Experiencias_Exitosas_ARIA_Colombia_2012.pdf. (27 de agosto de 2013).

Ming, X., Weber, G.H., Ayres, J.W. and Sandine W.E. 1997.Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *Journal of Food Science*, 62(2):413-415.

Morales, M., Rodríguez, E., Sepúlveda, J. 2012. Evaluación de las propiedades físicas y texturales del buñuelo. *Revista lasallista de investigación*: 9(2):112-121.

Moreno, R.I., Garcia, A., Acedo, E., Gonzalez, I.H., Call, J.E., Luchansky, J.B. and Diaz, M.E. 2007. Prevalence, types, and geo-graphical distribution of *Listeria monocytogenes* from a survey of retail Queso Fresco and associated cheese processing plants and dairy farms in Sonora, Mexico. *Journal of Food Protection*. 70(11):2596-2601.

Ollé, C. P., Jagus, R. J. y GerschensonLía, N. 2013.Efecto de la presencia de Nisina y natamicina sobre las propiedades físicas de películas de almidón de mandioca. Congreso Argentino de ciencia . p1.

Ostyn, M., L. De Buyser, F., Guillier, J., Groult, B., Felix, S., Salah, G. Delmas, G. and Hennekinne. J. 2010. First evidence of a food poisoning outbreak due to staphylococcal enterotoxin type E, France, 2009. *Euro Surveill*. 15(13):10-13.

Paniagua, H. 2008. Manual de elaboración de los productos lácteos en la

Empresa Chelmar S.A. de C. V. En saltillo, Coahuila. Tesis Médico Veterinario y Zootecnista. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia-Mexico.

Paul, M., Nuñez, A., and Van Hekken, D. 2012.The effect of milling on proteins in model queso fresco cheeses. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3(1):1-6.

Pineda, P., bedoya, C y Rosales, a. 2010. Estimación de los parámetros cinéticos y tiempo de vida de la cáscara de arroz y arcilla mediante la técnica de análisis termogravimétrico (tga), *revista Dyna* Vol. 78 (165):207-214.

Pinto, M. S., De Carvalho, A. F., Pires, A. C. D. S., Campos, A. A., Fonseca , P. H., Sobral, D and De Lima A. (2011).The effects of nisin *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. *International dairyjournal*, 21(2), 90-96.

Pintado, C. M., Ferreira, M. A., y Sousa, I. (2010). Control of pathogenic and spoilage microorganisms from cheese surface by whey protein films containing malic acid, nisin and natamycin. *Food Control*, 21(3), 240-246.

Pouillot, R. Lubran, M. B. Cates, S. C. y Dennis, S. 2010.Estimating parametric distributions of storage time and temperature of ready-to-eat foods for U.S. households. *Journal of Food Protection*, 73(2):312-321.

Quintero, B. 2006. Incorporación de la pediocina producida por *Pediococcusparvulus*MXVK133 en películas y recubrimientos comestibles. Tesis doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa-México.

Resolución número 02310. Por la cual se reglamenta parcialmente el Título V de la Ley 09 de 1979, en lo referente a procesamiento, composición, requisitos, transporte y comercialización de los Derivados Lácteos.3,13,20, . Bogotá-Colombia. 1986.

Renye, J.A., Somkuti, G.A., Vallejo, B., Van Hekken, D.L. and Gonzalez, A.F. 2008. Characterization of the microflora isolated from queso fresco made from raw and pasteurized milk. *Journal of Food Safety*, 28(1):59-75.

Rojas, C., y Vargas, P. 2007. Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. *Tecnología en Marcha*, 21(2):17.

Rovira, S. 2013. Estudio de la microestructura y aplicación de sensores ópticos en la elaboración de queso de cabra. Tesis Médico Veterinario. Universidad de Murcia. Murcia-España.

Sangronis, E., y García, J. 2007. Efecto de la adición de Nisina en los parámetros físicos, químicos y sensoriales del queso "telita". *Anales Venezolanos de Nutrición*: 20 (1):12-16.

Sanjurjo, K., Flores, S., Gerschenson, L y Jagus, R. (2006). Study of the performance of nisin supported in edible films. Food research international: 39(6), 749-754.

Sebti, I.; Carnet, A R.; Blanc, D.; Saurel, R. and Coma V. 2003.Controlled diffusion of an antimicrobial peptide from a biopolymer film. Trans Ichem E 81, Part A: 1099-1104.

Sebti, I. y Coma, V. 2002. Active edible polysaccharide coating and interactions between solution coating compounds. CarbohydrPolym 49(2):139-44.

SEM (Sociedad Española de Microbiología). 1993.Microbiología. Volumen monográfico de Alimentos. Graesal. Madrid. p 40-41.

Sierra, L. 2012. Evaluación de la prevalencia de extractos líquidos en café mediante el uso de bacteriocinas (Nisina) y aplicación de microondas. Tesis Magister en Ciencia y Tecnología de los alimentos. Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín. Colombia.

Siliciano, M. 2010. Estudio de la vida útil de queso crema utilizando microbiología predictiva. Tesis de maestría en tecnología de alimento de la universidad tecnológica nacional, facultad regional buenos aires. Pag. 28- 29.

Simanca, S. Durango, A. 2004. Guías de laboratorio: Microbiología de Alimentos. Universidad de Córdoba. Sede Berástegui. Berástegui-Colombia. Pág. 33-43.

Sivigila (Sistema de Vigilancia en Salud Pública). 2011 (a). Evaluación de riesgos de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia. Internet: (<http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/investigacion/ueria/Publicaciones/ER%20STAPHYLOCOCCUS.pdf>). (27 de agosto de 2013).

Sivigila (Sistema de Vigilancia en Salud Pública). 2011(b). Identificación de riesgos biológicos asociados al consumo de leche cruda bovina en Colombia. Internet:<http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/investigacion/ueria/Publicaciones/ER%20PELIGROS%20BIOLOGICOS%20EN%20LECHE.pdf>. (27 de agosto de 2013).

Scannell, A.G.M., Hill, C., Ross, R.P., Marx, S., Hartmeier, W. and Arendt, E.K. 2000. Development of bioactive food packaging materials using immobilised bacteriocins Lacticin 3147 and Nisaplin. *International Journal of Food Microbiology*, 60(2):241-249.

Schmid, D. R., Fretz, P., Winter, M., Mann, G., Hpger, A., Stöger, W., Ruppitsch, J., Ladstätter, N., Mayer, G., De Martin, A. and Allerberger, F. 2009. Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. *Wien. Klin. Wochenschr.* 121(3-4):125-131.

Teerakarn A, Hirt D., Acton J C, Rieck J R, Dawson P L. 2002. Nisin diffusion in protein films: effects of film type and temperature. *Journal Food Science:* 67(8): 3019-25.

Toalombo M. 2011. Estudio de Nisina en la vida útil de queso tipo Ricotta. Tesis de pregrado titulo ingeniero de aliemnto. Universidad tcnica de Ambato. Ecuador. Pag 21 – 22.

Torres, M., Mendoza, M., Castro, J., Gomez, C., Garay, L., Navarro-Hidalgo, V. and Villarruel-López, A. (2012). Incidence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, and Staphylococcal enterotoxin in two types of mexican fresh cheeses. *Journal of Food Protection*, 75(1):79-84.

Tornadijo, M. E., Marra, A. I., Fontán, M. G., Prieto, B., y Carballo, J. 1998. La calidad de la leche destinada a la fabricación de queso: calidad química milkqualityforcheeseproduction: chemicalquality a calidade da leite destinada á fabricación de queixo: calidade química. *Journal of Food*, 2(2):79-91.

Tunick, M. H., Van Hekken, D.,L., landola, S. K. and Tomasula, P. M. 2012.Characterization of queso fresco during storage at 4 and 10°C. *Journal of Food Research*, 1(1):308-319.

Van Hekken, D. L. and Farkye, N. Y. 2003. Hispanic cheeses: The quest for queso. *Food Technology*, 57(1):32-38.

Zumbado, H. 2002. Análisis químico de los Alimentos, Métodos clásicos. Instituto de farmacia y alimentos. Universidad de la Habana. pág. 226.