

t  
664  
A45



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL CALLAO**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y DE ALIMENTOS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA DE ALIMENTOS**

**EFFECTOS DEL *Lactobacillus casei* ATCC  
393™ SOBRE EL *Escherichia coli*  
DURANTE LA VIDA COMERCIAL DEL  
QUESO FRESCO**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO DE ALIMENTOS**

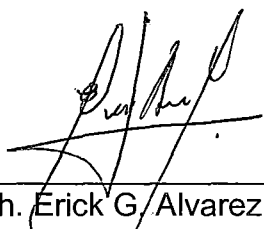
**ERICK GEORGE ALVAREZ YANAMANGO**

**Callao, Noviembre del 2011**

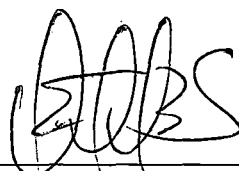
**PERÚ**

**EFFECTOS DEL *Lactobacillus casei*  
ATCC 393<sup>TM</sup> SOBRE EL  
*Escherichia coli* DURANTE LA  
VIDA COMERCIAL DEL QUESO  
FRESCO**

El presente trabajo de tesis titulado: "EFECTOS DEL *Lactobacillus casei* ATCC 393™ SOBRE EL *Escherichia coli* DURANTE LA VIDA COMERCIAL DEL QUESO FRESCO", fue realizado por el Bachiller Erick George Alvarez Yanamango, bajo la supervisión del asesor Blgo. Enrique Barrientos A. y del Co-asesor Ms.Cs. Blgo. Edgar Zarate S.



Bach. Erick G. Alvarez Yanamango  
TESISTA



Blgo. Enrique Barrientos A.  
ASESOR



Ms.Cs. Blgo. Edgar Zarate S.  
CO-ASESOR

## DEDICATORIA

A Juan Yanamango y Simón Flores,  
*In memoriam*, por sus enseñanzas y  
consejos dejadas tras sus partidas,  
por haber apostado y confiado en  
que este día llegaría.

A mi madre, Elsa Yanamango, por  
ser muestra del sacrificio de toda  
una vida.

## AGRADECIMIENTO

A Dios, por bendecir mi camino, por permitirme lograr las metas que he trazado en mi vida y por albergar en su seno a mis abuelos que aunque ya no estén físicamente, aún permanecen en nuestros corazones y son los mejores guías que uno puede tener.

Al Dr. José Ramón Cáceres Paredes, Vicerrector de investigación, por todo el apoyo brindado para la realización de esta investigación, por su confianza y prestación mostrada desde el primer día de trabajo en el Centro Experimental Tecnológico (CET).

Al Mg Sc. Blgo. Edgar Zarate Sarapura, por ser el verdadero promotor de este trabajo de investigación, por el apoyo incondicional recibido, por permitirme aprender más de lo que me exigió la tesis, por ser guía, maestro y amigo.

Al Blgo. Enrique Barrientos Aguilar, por todo el apoyo recibido, sobre todo por la predisposición mostrada desde el primer día que se inició este proyecto.

A mis compañeros del CET, por los buenos y malos momentos que hacen que uno madure en lo personal y profesional. En especial a Leynard Natividad, por su apoyo en la realización de las pruebas fisicoquímicas.

A Gustavo Fuentes-Rivera y Alberto Hernández, amigos con quienes compartí la universidad y largas horas en el laboratorio, por encontrarse siempre dispuestos cuando fueron requeridos. A Cindy Casaverde, por su apoyo y comprensión, por hacer que retome la calma cuando las cosas salían fuera de sitio y sobre todo por brindarme su compañía, su atención y su cariño.

A todo el personal del CET, por haberme atendido y albergado en todo este tiempo. Al Sr. Walter Paulino, por su disposición en la solución de problemas técnicos de los equipos e instalaciones.

A mis padres Simón y Elsa, por su cariño, protección y por todo el sacrificio realizado para sacarme adelante. A mis hermanos, por comprenderme y apoyarme en todo este tiempo, en especial a Wilmer, por estar siempre pendiente de mis pasos y por apostar en la realización de mis planes, proyectos y metas.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	<b>Página</b>
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	xii
<b>CAPITULO I            PROBLEMA</b>	
1.1 Formulación y definición del problema	1
1.2 Importancia	4
1.3 Justificación	4
<b>CAPITULO II           OBJETIVOS</b>	
2.1 Objetivos general	6
2.2 Objetivos específicos	6
2.3 Alcances de la investigación	7
<b>CAPITULO III        MARCO TEÓRICO</b>	
3.1 Antecedentes de la investigación	8
3.2 Revisión literaria	14
3.2.1 LECHE	14
3.2.1.1 Definiciones	14
3.2.1.2 Composición química de la leche	15
3.2.2 QUESO FRESCO	19
3.2.2.1 Características generales	19
3.2.2.2 Alteraciones del queso fresco	22
3.2.2.3 Conservantes en queso fresco	23
3.2.2.4 Elaboración de queso fresco	25
4.2.2.4.1 Insumos	25
4.2.2.4.2 Etapas de la elaboración de queso fresco	28
3.2.3 BACTERIAS ACIDO LACTICAS	33
3.2.3.1 características generales	33

3.2.3.2	Efectos protector/inhibitorio de las BAL	35
3.2.3.3	Características generales del género <i>Lactobacillus</i>	38
3.2.3.4	Características generales de <i>Lactobacillus casei</i>	39
3.2.4	BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR LAS BAL	41
3.2.4.1	Características generales	40
3.2.4.2	Modo de acción de las Bacteriocinas	44
3.2.5	CRECIMIENTO BACTERIANO	47
3.2.5.1	Factores que influyen en el crecimiento bacteriano	47
3.2.5.2	Fases del crecimiento bacteriano	48
3.2.5.3	Modelamiento matemático del crecimiento bacteriano	51
3.2.5.3.1	Baranyi y Robert	52
3.2.6	<i>Escherichia coli</i>	55
3.2.6.1	Características generales	55
3.2.6.2	<i>Escherichia coli</i> : indicador de Higiene	55
3.2.6.3	<i>Escherichia coli</i> enteropatógeno.	57
3.2.6.4	Condiciones de crecimiento del <i>Escherichia coli</i>	59
3.2.6.5	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	61
3.2.7	VIDA UTIL	62
3.2.7.1	Definición	62
3.2.7.2	Evaluación de la vida útil de un alimento	63
<b>CAPITULO IV MATERIALES Y MÉTODOS</b>		
A.	Lugar de ejecución	67
B.	Materia prima e Insumos	67
C.	Materiales y Equipos	69
4.1	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	70
4.2	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	72
4.3	MÉTODOS DE ANÁLISIS	74



4.3.1 Leche fresca	74
4.3.2 Queso fresco experimental	78
4.4 METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	81
4.4.1 Análisis de la materia prima	81
4.4.2 Activación de las cepas experimentales	81
4.4.3 Inoculación de las cepas experimentales	82
4.4.4 Elaboración del queso fresco	83
4.4.5 Evaluación de la vida útil del queso fresco	89
4.4.6 Efectos del <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393™ sobre el crecimiento del <i>Escherichia coli</i>	90
4.4.7 Análisis estadístico de los resultados	94
CAPITULO V RESULTADOS	96
CAPITULO VI DISCUSIÓN	120
CAPITULO VII CONCLUSIONES	129
CAPITULO VIII RECOMENDACIONES	131
CAPITULO IX REFERENCIAS	132
ANEXOS	144

**ÍNDICE DE TABLAS**

	<b>Página</b>
Tabla N° 1 Composición media de la leche cruda de algunas razas vacunas (%p/p)	16
Tabla N° 2 Requisitos Microbiológicos para el Queso fresco	20
Tabla N° 3 Composición química del queso fresco	21
Tabla N° 4 Conservantes permitidos para quesos no madurados	24
Tabla N° 5 Principales mecanismos de acción propuestas para las bacterias probióticas	37
Tabla N° 6 Caracteres de las enfermedades producidas por ECC	60

## ÍNDICE DE CUADROS

		<b>Página</b>
Cuadro N° 1	Resultados de las pruebas de estabilidad prácticas a la leche destinada a la elaboración de quesos.	98
Cuadro N° 2	Recuento de coliformes totales practicado a la leche cruda y leche pasteurizada.	98
Cuadro N° 3	Parámetros cinéticos promedios del crecimiento de coliformes totales en quesos frescos almacenado a dos rangos de temperaturas: 8-10 °C y 20-25 °C.	100
Cuadro N° 4	Tiempo de vida útil estimado para el queso fresco almacenado a dos rangos de temperaturas: 8-10 °C y 20 – 25 °C.	102
Cuadro N° 5	Parámetros cinéticos de crecimiento de las bacterias ácido lácticas del queso fresco almacenado a 8-10 °C y 20 -25 °C.	104
Cuadro N° 6	Parámetros cinéticos de crecimiento del <i>Escherichia coli</i> en el queso fresco (tratamiento 1: control)	106
Cuadro N° 7	Parámetros cinéticos de crecimiento y letalidad del <i>Escherichia coli</i> y <i>Lactobacillus casei</i> en el queso fresco (tratamiento 2).	109
Cuadro N° 8	Parámetros cinéticos de crecimiento y letalidad del <i>Escherichia coli</i> y <i>Lactobacillus casei</i> en el queso fresco (tratamiento 3).	110
Cuadro N° 9	Parámetros cinéticos de crecimiento y letalidad del <i>Escherichia coli</i> y <i>Lactobacillus casei</i> en el queso fresco (tratamiento 4).	112
Cuadro N° 10	Parámetros cinéticos de crecimiento y letalidad del <i>Escherichia coli</i> de los cuatro tratamientos	114
Cuadro N° 11	Prueba de Tukey (HSD) entre los tratamientos, con un intervalo de confianza de 95%.	117
Cuadro N° 12	Valores de humedad de los quesos frescos correspondientes a vida útil y tratamientos experimentales.	117
Cuadro N° 13	Valores de acidez titulable de los quesos frescos correspondientes a vida útil y tratamientos experimentales.	119

## ÍNDICE DE FIGURAS

		<b>Página</b>
Figura N° 1	Distribución de las proteínas de la Leche de vaca.	17
Figura N° 2	Interacción de los monómeros de bacteriocina con la membrana citoplasmática: modelo de complejo de poración.	46
Figura N° 3	Curva típica de crecimiento bacteriano.	49
Figura N° 4	Parámetros cinéticos de crecimiento bacteriano en una curva típica: Modelo Baranyi y Robert, 1994.	53
Figura N° 5	Simulación de la estimación de la vida útil del queso fresco a determinadas condiciones de almacenamiento.	66
Figura N° 6	Galtonera para el transporte de la leche.	68
Figura N° 7	Diseño experimental del estudio.	73
Figura N° 8	Equipo de Medición de pH.	74
Figura N° 9	Titulación de la Leche	75
Figura N° 10	Prueba de estabilidad frente al alcohol.	76
Figura N° 11	Colonias coliformes en Agar Mc Conkey	77
Figura N° 12	Colonias de BAL en Agar MRS.	80
Figura N° 13	Escalas Mc Farland usadas como referencia	82
Figura N° 14	Diagrama de elaboración del queso fresco experimental.	84

## ÍNDICE DE GRAFICOS

		<b>Pagina</b>
Grafica Nº 1	Curvas de crecimiento promedio de coliformes totales del queso fresco almacenado a dos rangos de temperaturas: 8-10 °C y 20-25 °C.	100
Grafica Nº 2	Estimación de la vida útil del queso fresco almacenados a dos rangos de temperaturas: 8-10 °C y 20-25 °C.	102
Grafica Nº 3	Curva de crecimiento de Coliformes Totales y Bacterias Acido Lácticas presentes en el queso fresco almacenado a 8-10 °C.	105
Grafica Nº 4	Curva de crecimiento de Coliformes Totales y Bacterias Acido Lácticas presentes en el queso fresco almacenado a 20-25 °C.	105
Grafica Nº 5	Curvas de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> inoculado en el queso fresco (Tratamiento 1 o Control).	107
Grafica Nº 6	Curvas de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> y <i>Lactobacillus casei</i> inoculados en el queso fresco (Tratamiento 2).	108
Grafica Nº 7	Curvas de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> y <i>Lactobacillus casei</i> inoculados en el queso fresco (Tratamiento 3).	111
Grafica Nº 8	Curvas de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> y <i>Lactobacillus casei</i> inoculados en el queso fresco (Tratamiento 4).	113
Grafica Nº 9	Curvas de crecimiento promedio de EC de los cuatro tratamiento.	115
Grafica Nº 10	Evaluación de la humedad en los quesos frescos correspondientes a vida útil y tratamientos experimentales.	120
Grafica Nº 11	Evaluación de la acidez titulable en los quesos frescos correspondientes a vida útil y tratamientos experimentales.	120

## RESUMEN

Con el objetivo de determinar el efecto inhibitorio de *Lactobacillus casei* ATCC 393™ sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, se inoculó de manera conjunta al queso fresco experimental tres poblaciones de *Lactobacillus casei* ATCC 393™ ( $10^3$ ,  $10^6$  y  $10^9$  ufc/ml) y a una población de *Escherichia coli* ATCC 25922™ ( $10^3$  ufc/ml). Los quesos fueron almacenados a  $8 \pm 2$  °C por 10 días, realizándose pruebas fisicoquímicas y microbiológicas diariamente. El recuento bacteriano permitió obtener las curvas de crecimiento y los parámetros cinéticos de crecimiento y letalidad de las bacterias experimentales, las cuales fueron ajustadas con el modelo de crecimiento poblacional propuesto por Baranyi y Roberts (Cayré et al, 2007), usando la herramienta predictiva DMFit (Combase, 2010). Los resultados determinaron que el tratamiento con una población inicial de  $10^9$  ufc/ml de *Lactobacillus casei*, presentó un efecto bactericida, permitiendo una mayor inhibición y reducción poblacional de *Escherichia coli*, mientras que el tratamiento con una población inicial de  $10^6$  ufc/ml de *Lactobacillus casei*, presentó un efecto bacteriostático, permitiendo el control de la población inicial de *Escherichia coli*. Así mismo, la acumulación de bacteriocinas secretadas por el *Lactobacillus casei* ATCC 393™ fue la probable causa de la inhibición del *Escherichia coli* y no la producción de ácido láctico. La aplicación de *Lactobacillus casei* ATCC 393™ en concentraciones superiores a  $10^6$  ufc/ml, permite considerarlo como un bioconservante para quesos frescos, logrando obtener un queso fresco inocuo y extendiendo la vida útil del producto.

## INTRODUCCIÓN

La seguridad de los alimentos está relacionada con la protección de la salud de los consumidores, para tal fin se debe garantizar la calidad higiénica de los mismos, controlando todas las etapas de procesos y muchas veces adicionando conservantes que permita la inocuidad durante su vida comercial del producto.

Los quesos frescos si bien es cierto de origen ancestral sigue presente en nuestra dieta, siendo en la actualidad los quesos más populares en todos los países latinoamericanos, son los más fáciles de elaborar y uno de mayor rendimiento; sin embargo, también son los de mayor riesgo potencial de intoxicación e infección, debido a que sus características permiten un rápido crecimiento de los microorganismos que alteran el alimentos y generan un riesgo para el consumidor, es por ello la preocupación de asegurar la inocuidad del mismo.

En la actualidad el uso de las bacterias ácido-lácticas (BAL) en la elaboración de alimentos son ampliamente utilizadas en productos lácteos fermentados. Una de las características de este grupo de bacterias es la producción de ácido láctico desencadenada por el metabolismo microbiano, que aporta texturas y sabores característicos al producto de

origen. A demás de la producción de ácido láctico existe la producción de otros metabolitos considerados secundarios como los peróxidos, ácidos orgánicos, diacetilo y bacteriocinas. Esta última presentando actividad antibacteriana.

El género *Lactobacillus* aporta no solo ácido láctico al alimento si no también bacteriocinas que de acuerdo a la concentración en el producto podría otorgar actividad antimicrobiana del genero gram negativo, responsables del deterioro acelerado del alimento. La aplicación del *Lactobacillus casei* en la producción de quesos regula la carga inicial de bacterias presentes en el producto, mejorando la condición sanitaria del queso, permitiendo prolongar el periodo de almacenamiento del producto.

En la presente investigación se usó *Lactobacillus casei* ATCC 393™, quien posee la capacidad de producir bacteriocinas, como principal producto antibacteriano. La presencia de este antibacteriano inhibe y controla el crecimiento del *Escherichia coli* ATCC 25922™ presente en el queso, garantizando la inocuidad del producto.



## CAPITULO I

### PROBLEMA

#### 1.1 FORMULACIÓN Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El queso fresco, es uno de los productos lácteos de mayor consumo popular, aceptado no solo por ser fuente de proteínas y calcio, sino también por su variedad de usos, principalmente el culinario.

Muchos de los quesos frescos comercializados en el país y en especial los de producción artesanal, son puestos a la venta en expendios ambulatorios, mercados, etc., los cuales presentan elevada carga microbiana, que refleja las deficiencias higiénicas en la manipulación y conservación del producto, representando un riesgo para la salud del consumidor (Cristóbal y Mautua, 2003).

La elevada carga bacteriana presentes en el queso fresco, se debe principalmente a que éste, es un alimento que otorga la condiciones adecuadas para el crecimiento acelerado de cualquier tipo de bacteria que llegue al producto durante o después de su elaboración, constituyendo un excelente sustrato para la proliferación de microorganismos como: *Salmonella sp.*, *Listeria sp.*, *Staphylococcus*

*aureus*, *Escherichia coli*, entre otros. La presencia de estas bacterias en el alimento, son las causantes de muchas intoxicaciones alimentarias, causadas ya sea por microorganismos patógenos o por las toxinas que estos producen.

Debido a su alto contenido de nutrientes, alta actividad de agua (0.99), pH ligeramente ácido (5.6-6.3), favorecen el crecimiento de bacterias iniciales o añadidas post-elaboración. Si bien la sal utilizada para contribuir sensorialmente con el producto, podría inhibir el crecimiento de las bacterias presentes, la concentración de sal permitida en el queso no es la suficiente para ejercer un efecto inhibitorio considerable. Todas estas características del producto, hacen de él un producto perecedero, fuente y vehículo de bacterias patógenas, entre las que se encuentra *Escherichia coli*, que indica un riesgo alimentario. La presencia de este patógeno en el queso puede reducirse considerablemente mediante una adecuada higiene y buenas prácticas de manufactura, considerando la aplicación de la pasteurización previa de la leche destinada a la elaboración del queso. El uso de conservantes de origen químico como propionatos y sorbatos, también representa una alternativa para impedir el crecimiento de no solo bacterias, sino también de hongos quienes podrían presentar un riesgo para el consumidor. No obstante la tendencia actual, es la búsqueda de alimentos libres de conservantes químicos; lo cual nos obliga a evaluar nuevos métodos de conservación, entre las que se incluyen el uso de

bacterias benéficas con propiedades inhibitorias de bacterias patógenas. Es así que la aplicación de bacterias ácido lácticas como el *Lactobacillus casei* al queso, favorecen a las características sensoriales del producto y también podrían contribuir con su conservación. Esta acción conservante se explica por la producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno y bacteriocinas, este último considerado como un poderoso agente antimicrobiano, que permitiría inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y deteriorativas presentes en el queso fresco (Ramírez et al, 2005).

La presente investigación propone el uso del *Lactobacillus casei* ATCC 393™, debido a que se considera que este microorganismo posee cualidades probióticas por la producción de bacteriocinas como uno de sus principales productos antibacterianos. Debido a esta característica es justificable incorporar al *Lactobacillus casei* ATCC 393™ como un conservante natural al queso fresco, para lograr inhibir el crecimiento de bacterias patógenas a nivel intestinal y que permitirá comercializar un producto inocuo.

Finalmente, el problema fue planteado bajo la siguiente interrogante: ¿Es factible utilizar *Lactobacillus casei* ATCC 393™ para controlar o inhibir el crecimiento del *Escherichia coli*, y que permita garantizar un producto inocuo durante la vida comercial del queso fresco?

## 1.2 IMPORTANCIA

El presente estudio permitirá obtener información básica del uso del *Lactobacillus casei* ATCC 393™, como una alternativa de conservante de origen natural para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*, y así permitirá garantizar la inocuidad del queso fresco, prolongando su tiempo de vida útil, ofreciendo beneficios económicos a los productores de queso fresco, ya que se extendería la vida útil del producto, y con ello mayor tiempo de comercialización y consumo del mismo. También permitirá reducir los casos clínicos y los costos de tratamientos de enfermedades reportadas por el consumo de este alimento contaminado con *Escherichia coli*, causante de cuadros diarreicos a nivel infantil.

Además, el presente estudio permitirá obtener evidencia científica que servirá como base para futuras investigaciones, aplicadas al uso de esta bacteria en el campo de la conservación de otros productos lácteos.

## 1.3 JUSTIFICACIÓN

La presente investigación estudiará el efecto inhibitorio del *Lactobacillus casei* ATCC 393™ sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, que permitirá considerarlo como un conservante natural y permita reducir las

incidencias por infecciones producto del consumo de quesos contaminados con esta bacteria, reduciendo así el uso de conservantes de origen químico como los sorbatos y propionatos.

Por otro lado, los resultados obtenidos generaran aporte científico y tecnológico para que el *Lactobacillus casei* ATCC 393™ pueda ser incluido dentro de las normas sanitarias del país, que contribuyan a comercializar productos inocuos. Cumpliendo con lo especificado en la NTP 202.195 (2004).

## CAPITULO II

### OBJETIVOS

La ejecución del presente proyecto tiene los siguientes objetivos:

#### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Utilizar el *Lactobacillus casei* ATCC 393™ para controlar el crecimiento del *Escherichia coli* ATCC 25922™ presente en el queso fresco experimental.

#### 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar mediante ensayos microbiológicos y fisicoquímicos, la vida comercial del queso fresco experimental elaborado con técnicas artesanales.
- Utilizar *Lactobacillus casei* ATCC 393™ a una concentración de  $10^3$  ufc/mL para controlar el crecimiento de *Escherichia coli* en el queso fresco experimental.

- Utilizar *Lactobacillus casei* ATCC 393™ a una concentración de  $10^6$  ufc/mL para controlar el crecimiento de *Escherichia coli* en el queso fresco experimental.
- Utilizar *Lactobacillus casei* ATCC 393™ a una concentración de  $10^9$  ufc/mL para controlar el crecimiento de *Escherichia coli* en el queso fresco experimental.

### 2.3 ALCANCES DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación determinará la actividad antimicrobiana de *Lactobacillus casei* ATCC 393™ para inhibir o controlar el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922™. En respuesta a los efectos de *Lactobacillus casei* ATCC 393™ permitirá garantizar la inocuidad del producto para el consumidor.

## CAPITULO III

### MARCO TEÓRICO

#### 3.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION

Cristóbal y Maurtua (2003), evaluaron la calidad bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados a nivel ambulatorio en el distrito de Pueblo libre, cuya temperatura de almacenamiento estuvo entre 14-22 °C; se evaluó la carga microbiana de bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales y fecales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Lactobacillus spp.*, y la supuesta acción bactericida de esta última bacteria sobre las anteriores. Los resultados indicaron que el 97,4% de las muestras estuvieron por encima de los valores máximos permitidos por la NTP 202.087 (1982)<sup>1</sup> para los diferentes microorganismos: coliformes totales (74,2% de las muestras), coliformes fecales (58,6%), *Escherichia coli* (28,1%) y *Staphylococcus aureus* (87,2%). No se observó que la presencia de *Lactobacillus spp.* impidiera el crecimiento de los microorganismos estudiados en los quesos.

---

<sup>1</sup> NTP vigente en el año del estudio, posteriormente fue reemplaza por la NTP 202.195 (2004).



Cristóbal (2008), aisló 341 cepas identificadas como lactobacilos de quesos artesanales provenientes de lima y provincias. Las especies de lactobacilos aisladas con mayor frecuencia fueron *Lactobacillus casei* 56 % y *Lactobacillus plantarum* 35.8 %. Sólo el 16.42 % de los aislados presentaron actividad inhibitoria frente a *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Los sobrenadantes de los cultivos bacteriocinogénicos se ajustaron el pH a 6.5 con NaOH 2.5 N, para descartar que la acción inhibitoria fuera debida a los ácidos orgánicos. Por otro lado, Las bacteriocinas presentes en los sobrenadantes de los diferentes aislados inhibieron el crecimiento de cepas de *Bacillus cereus* UA05, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708, *Shigella sonnei* ATCC 9290 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Sin embargo, *Listeria innocua* UP01 fue resistente.

Francia y Santa Cruz (2002), aislaron cepas nativas ácido lácticas, proveniente de quesos frescos adquiridos de mercados y puestos de expendio ambulatorio de Lambayeque. Evaluaron la actividad inhibitoria de cepas productoras de bacteriocinas a través de la inhibición del crecimiento de *Listeria spp.*, utilizada como cepa indicadora. Se identificaron 44 cepas de *Lactobacillus*, de las cuales 20 se reconocieron como *Lactobacillus plantarum* y 24 *Lactobacillus casei*, 12 cepas fueron identificadas como *Pediococcus spp.* y 25 como *Lactococcus spp.*, de las

cuales el 90% de *Lactobacillus plantarum* y 50% *Lactobacillus casei* inhibieron el crecimiento de *Listeria spp.*

Gutiérrez, et al (2007), evaluaron la viabilidad de una bacteria ácido láctica nativa con actividad probiótica en un queso crema durante 15 días. Sus resultados indicaron que el queso crema ofrece una serie de ventajas con respecto a las leches fermentadas como vehículo de microorganismos probióticos: el pH, mayor consistencia, contenido graso y capacidad tamponante, estos factores contribuyeron a la protección de los microorganismos probióticos durante su almacenamiento.

Larrea, et al (2007), determinaron el efecto bacteriostático y bactericida del *Lactobacillus casei* frente a *Escherichia coli*, a través de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de la suspensión de esta cepa en condiciones de laboratorio, encontrado que para obtener un efecto bacteriostático del *Lactobacillus casei* sobre el *Escherichia coli* se necesita un CMI de 64  $\mu\text{L/mL}$ , mientras que para obtener un efecto bactericida se necesitó un CMB de 256  $\mu\text{L/mL}$  capaz de lograr una lisis celular y una reducción del 99.99% de la población inicial.

López Díaz (2006), estudió diferentes sistemas de calentamiento para pasteurizar leche destinada a la fabricación de queso colonial

(pasteurización lenta en el propio tanque de elaboración, con sistemas de calentamiento por hornallas, eléctrico, y con calentamiento por circulación de agua caliente), determinando la eficiencia de éstos en el control de la flora microbiana de la leche cruda. Como resultado de la pasteurización lenta de la leche en tanque abierto (65 °C/30 min), se redujo la población de *Escherichia coli* de  $10^5$  ufc/ml a  $10^0$  ufc/ml, permitiendo obtener quesos colonial con padrones microbiológicos dentro de las normas. Así mismo la calidad microbiológica de quesos Colonial fabricados con leche cruda demostró que el 100% de los quesos elaborados eran impropios para el consumo.

López Orozco (2004), determinó un proceso estandarizado para mejorar la vida en anaquel del queso tradicional ranchero (México). La aplicación de tratamiento térmico previo de la leche, uso de aditivos antimicrobianos, almacenamiento en refrigeración (4-6 °C), la aplicación de programas de limpieza y saneamiento de equipos, le permitieron mejorar la vida en anaquel del producto de 10 a 15 días. Así mismo, reportó que la humedad de este tipo de quesos se encuentra entre 46-57 % y un pH mayor o igual a 6.1.

Márquez y García (2007), evaluaron el efecto inhibitorio de dos concentraciones de nisina (10,0 y 16,7 mg/kg) sobre la población de *Staphylococcus aureus*, coliformes totales, *Escherichia coli*, *Salmonella*

*sp.* y *Listeria monocytogenes* en queso blanco tipo "telita" elaborado en una quesería de Upata, Venezuela. Se encontró que las dos concentraciones de nisina adicionadas al queso "telita" ejercieron un efecto inhibitorio sobre la población de *S. aureus* presente como microflora contaminante en las mismas. No se detectó *Salmonella spp.*, ni *Listeria monocytogenes* en ninguna de las muestras analizadas. Los recuentos de coliformes totales y de *E. coli* (serotipos O118 y O8) encontrados en las muestras de queso "telita" sin nisina no mostraron variación al compararlos con los encontrados en las muestras de queso "telita" suplementadas con las dos concentraciones de nisina ensayadas, debido al espectro antimicrobiano de la nisina.

Mejía, et al (2007), evaluó el efecto inhibitorio de 2 concentraciones de sobrenadantes de cultivos de cepas *Lactobacillus sp.* aisladas de heces de niños lactantes y muestras vaginales, sobre el crecimiento de patógenos de prueba como *Escherichia coli* ATCC 25922™, encontró que la exposición de este patógeno al 10% de sobrenadante de cepas *Lactobacillus spp.*, permitió obtener un efecto bacteriostático, logrando controlar el crecimiento de este patógeno por 8 horas y que la exposición a una concentración de 50% de sobrenadante permite no solo la inhibición si no la reducción poblacional, logrando un efecto bactericida. En el mismo estudio se descartó que el efecto inhibitorio de las cepas *Lactobacillus spp.* se debía a la producción de ácidos orgánicos, mediante

la exposición de los microorganismos patógenos de prueba al crecimiento en un medio con una máxima concentración de ácido láctico (0.25%), encontrando que el crecimiento de bacterias patógenas se vieron afectadas pero no en la magnitud que se produjo en presencia del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus*, además en ninguno de los casos se observó lisis celular.

Ramírez, et al (2005), evaluaron la presencia y la actividad antimicrobiana de las bacterias ácido-lácticas (BAL) productoras de bacteriocinas aisladas de quesos artesanales del estado de Hidalgo en México. El espectro de actividad de estas cepas fue evaluado tanto frente a bacterias Gram positivas como contra Gram negativas. De acuerdo a los resultados, *Vibrio cholerae* fue el microorganismo más sensible, ya que el 26.06 % de las cepas de BAL analizadas lo inhibieron. Por el contrario, se observó cepas resistentes como *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Proteus* y *Bacillus*, en las cuales menos del 1 % de las BAL tuvieron un efecto inhibitorio. Así mismo, cabe señalar la inhibición de *Listeria monocytogenes* que si bien fue inhibida solo por el 2.42 % de las cepas de BAL, el grado de inhibición mostrado frente a las cepas a las que resultó sensible es considerable (halos entre 4 y 7 mm).

Zambrano (2010), determinó la viabilidad de un queso probiótico usando *Lactobacillus acidophilus*. Evaluó en el producto características físicas,

químicas, microbiológicas y organolépticas. Así mismo, realizó un análisis de estabilidad del producto considerando la variación de peso, pH, sinéresis y contaminación microbiana, medidos los días 1, 7, 14 y 21. Determinó, que el queso fresco es un vehículo ideal para *Lactobacillus acidophilus* pues las colonias se mantuvieron viables y sobre los niveles mínimos recomendables para considerar al producto como probiótico, entre  $10^6$  y  $10^7$  UFC/g. El uso de los microorganismos en la fabricación del queso fresco no influyó en la humedad de los quesos, reportándose una humedad promedio de 64.16%, pero si modificó algunas características como la acidez y pH durante su periodo de vida útil (21 días almacenado a 4-10 °C).

## **3.2 REVISION LITERARIA**

### **3.2.1 LECHE**

#### **3.2.1.1 Definición**

La leche es la materia prima principal para la elaboración de quesos. La leche según la definición legal NTP 202.001, es el producto de la ordeña completa y no interrumpida de vacas sanas bien alimentadas, en reposo y exenta de calostro, la cual debe de poseer no menos de 3.0% de materia

grasa y no menos de 8.20% de sólidos no grasos. Otra característica de la leche fresca, es que debe de estar libre de antibióticos, olores, materias o sabores extraños. Así mismo, la acidez de la leche destinada a la elaboración de quesos debe encontrarse en el rango de 0.14 – 0.18 g Ác. Láctico/100 leche y el pH de 6.5 - 6.8 (Zambrano, 2010)

Para Schlimme y Buchheim (2002), la leche es una secreción blanca producto del ordeño de una o varias vacas, la cual se puede describir como un sistema polidisperso donde la grasa se encuentra emulsionada en forma de gotitas alrededor de una membrana, las proteínas se encuentran dispersas y formando un coloide en forma de micelas y la lactosa es el carbohidrato principal y se encuentra disuelto.

### **3.2.1.2 Composición química de la leche**

La leche es un alimento adaptado para los recién nacidos de cada especie que contiene en una forma fácilmente absorbible, todos los nutrientes y agentes activos que el recién nacido necesita para el crecimiento y el mantenimiento corporal. La composición de la leche varía dentro de una misma especie, estas variaciones están determinadas por la raza, la edad, el estadio de lactación, la alimentación, el manejo así como por el estado sanitario (Schlimme y Buchheim, 2002). Por lo tanto es difícil dar una composición exacta de la leche de una especie animal.

Las variaciones de la composición de la leche cruda de vaca se muestra en la Tabla N°1.

**Tabla N°1 Composición media de la leche cruda de algunas razas vacunas (%p/p)**

	Holstein Alemana	Jersey	Parda suiza
Agua	87.0	85.4	87.1
Grasa	4.2	5.3	3.9
Proteína	3.4	3.9	3.5
Lactosa	4.7	4.7	4.6
Cenizas	0.75	0.75	0.75

Fuente: Schlimme y Buchheim, 2002

#### **3.2.1.2.1 Grasa**

La grasa de la leche está compuesta sobre todo por grasas neutras (triglicéridos) con algunos lipoides (fosfolípidos, carotenoides, tocoferoles, aldehídos, etc.), que aunque en pequeñas proporciones, tienen una gran influencia en la elaboración del queso, ya que contribuye a su aroma y color (Madrid, 1996).

#### **3.2.1.2.2 Proteínas**

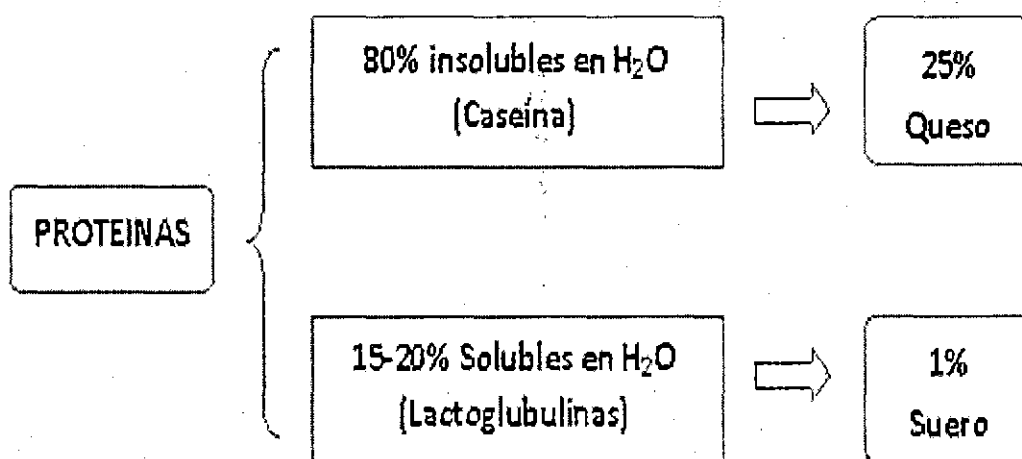
Están formadas por polímeros de  $\alpha$ -aminoácidos, además pueden contener otros compuestos. Su estructura básica son aminoácidos unidos



por un enlace peptídico entre cada grupo amino y carboxilo. Las proteínas participan en un gran grupo de reacciones químicas tales como oxidación, reducción, hidrólisis y desaminación entre otras (Revilla, 1982).

Según la Figura N° 1, si se toma en cuenta las cantidades de diferentes proteínas en la leche, indiscutiblemente la caseína se encuentra en primer lugar, ya que constituye el 80 % de las proteínas lácticas. Además, la caseína es la que da el color a la leche y juega un papel muy importante en la elaboración de quesos gracias a su coagulación (se precipita fácilmente en medios ácidos), para constituir al final del proceso cerca del 25 % del queso terminado (Artavia, 1999). Además se observa que el suero posee 1 % de proteína, lo que se puede comparar con el 3.4 % de proteína de la leche (Schlimme y Buchheim, 2002).

**Figura N°1 Distribución de la proteínas de la Leche de vaca**



Fuente: Adaptada de Artavia, 1999.

### **3.2.1.2.3 Carbohidratos**

Prácticamente la lactosa es el único azúcar de la leche, aunque en ella existan poliósidos libres y glúcidos combinados en pequeñas proporción (Madrid, 1996). La lactosa constituye la mitad de los sólidos no grasos y cerca de un 4.7 % del total de la leche. Además, la propiedad más importante de la lactosa que esta puede ser transformada en ácido láctico por acción de las bacterias ácido lácticas, siendo este el principal factor de maduración y fermentación de los productos lácteos. También juega un papel importante en el control microbiano cuando este se encuentra en altas concentraciones en el alimento.

### **3.2.1.2.4 Sales minerales**

Las sales minerales en la leche se encuentran disueltas o formando compuestos con la caseína. Las más numerosas son calcio, potasio, sodio y magnesio, que se encuentran como fosfato cálcico, cloruro sódico, caseinato cálcico, etc. El calcio se encuentra en dos formas en la leche. El 30% aproximadamente en solución y el restante 70% en forma coloidal. El fosfato cálcico forma parte del complejo caseínico producido en la coagulación de la leche al fabricar quesos, contribuyendo al aumento del tamaño de las micelas de caseína (Madrid, 1996).

### **3.2.1.2.5 Vitaminas**

La leche es rica en vitaminas, las cuales nos ayudan a una mejor asimilación de los nutrientes. Las vitaminas más comunes en la leche son las solubles en grasa (A y D) y las solubles en agua (vitamina C y el complejo vitamínico B). Es por esta razón que los quesos son ricos en vitaminas A, D y algunas del complejo B como las vitaminas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> (Madrid, 1996).

## **3.2.2 QUESO FRESCO**

### **3.2.2.1 Características generales**

En el Perú, el consumo de Queso Fresco, se ha incrementado, llegando al 75% en relación al consumo de quesos madurados; esto debido a su bajo costo, a sus características nutricionales y usos variados (Calle y Solano, 2004).

Según la definición legal NTP 202.195, define al queso fresco (tradicional), como el queso blando, no madurado ni escaldado, moldeado, de textura relativamente firme, levemente granular, sin cultivos lácteos, obtenido por separación del suero después de la coagulación de

la leche pasteurizada, entera, descremada o parcialmente descremada, o una mezcla de algunos de estos productos.

Los quesos frescos tienen un alto contenido de humedad y no han sufrido proceso de maduración, por lo que pueden tener sabor a leche fresca o leche acidificada. Su consistencia suele ser pastosa y su color blanco. Por tener un alto contenido de humedad en la pasta (45-80%), su tiempo de vida útil resulta corto, debiendo ser consumidos en pocos días. Su transporte y conservación se debe hacer a temperaturas de 4-10 °C; aun manteniendo la cadena de frío son altamente perecederos (Madrid, 1996; Villegas, 2009).

Los quesos frescos deben presentar una humedad mayor al 46 % y su contenido de materia grasa en extracto seco mayor al 40 %. Microbiológicamente debe cumplir con las características presentadas en la Tabla 2.

Los quesos se encuentran entre los mejores alimentos del hombre siendo una variedad ampliamente producida en los países de Latinoamérica por la sencillez del procesamiento, su costo más bajo y el rendimiento mayor al obtenido en comparación con otras variedades (Inda, 2000). El queso fresco es un alimento reconocido por su alto valor nutricional debido a sus

altas concentraciones de proteínas, calcio, riboflavina y vitaminas A y D (Dillon y Berthier, citado por Cerón 2008).

**Tabla Nº 2 Requisitos Microbiológicos para el Queso fresco**

<b>Requisito</b>	<b>Conteo Máximo (ufc/g)</b>
Numeración de coliformes	$10^3$
Numeración de <i>Staphylococcus</i> coagulosa positiva	$10^2$
Detección <i>Salmonella</i> sp.	Ausencia en 25 g
Detección <i>Listeria monocytogenes</i>	Ausencia en 25 g

Fuente: NTP 202.195 (2004)

**Tabla Nº 3 Composición química del queso fresco**

	<b>Porcentaje (%)</b>
Agua	45-65
Grasa	17-26
Proteína	15-25
Carbohidratos	2-3.5
Sales Minerales	2 – 4.5

Fuente: Adaptada de Calle y Solano 2004; Cerón 2008 y Collazos 1996.

### 3.2.2.2 Alteración del queso fresco

Por su alto contenido proteico, el queso fresco se constituye en el sustrato adecuado para el crecimiento bacteriano. Las características del queso fresco (pH, humedad y nutrientes) permiten el desarrollo de muchos microorganismos propios de la leche, de contaminación ambiental y del manipuleo del producto terminado y/o durante la producción del mismo.

La flora microbiana varía con los distintos tipos de quesos e inclusive entre varios quesos del mismo tipo, dependiendo siempre de la carga microbiana inicial de la leche y la eficiencia de la pasteurización. Entre los microorganismos que pueden generar un riesgo para el consumidor y que puede presentar el queso fresco son: Coliformes, *Escherichia coli*, hongos y levaduras, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*, *Lactobacillus sp.* y *Listeria monocytogenes*.

La velocidad de deterioro o alteración del queso no solo depende de los microorganismos presentes, sino también de la composición química del alimento y del tipo de carga inicial. Algunos factores relacionados que afectan al crecimiento de las bacterias causantes del deterioro del queso fresco son: la actividad de agua presente en el alimento, pH y ligera acidez del alimento que favorecen el crecimiento bacteriano, el tratamiento térmico aplicado a la leche previo al procesamiento del queso,

las condiciones ambientales en la cual se conserva el queso (temperatura y humedad), y finalmente la relación de dependencia entre los microorganismos presentes en el queso (antagonismo o sinergismo).

La alteración de los quesos es principalmente de dos tipos, el crecimiento superficial de microorganismos, normalmente mohos, y la producción de gas, alteración del sabor y aroma, debida al crecimiento de microorganismos en el interior de la masa del queso. Los quesos muy ácidos se alteran normalmente por acción de levaduras y mohos, pero la alteración bacteriana es importante en las variedades de pH más alto, como el queso fresco blanco o el queso cottage. Las bacterias más comunes son gram negativas, como las *Pseudomonas* y *enterobacterias*, aunque también *Enterococcus* puede producir alteración. En cuanto al crecimiento de mohos produce una alteración visible, muchas veces acompañada de una lipólisis y proteólisis intensa, siendo los responsables más frecuentes de esta alteración los *Penicillium* en un 60-80% de los casos y *Aspergillus* (Varnam y Sutherland, 1994).

### **3.2.2.3 Conservantes en queso fresco**

En la actualidad el uso de conservantes de origen químico en los procesos de elaboración de alimentos se realiza con el afán de prolongar su tiempo de vida comercial. Los sorbatos y propionatos son los

conservantes más comunes incluidos en las formulaciones de alimentos. La elaboración del queso fresco no está ajena al uso de estos conservantes que permite extender su vida en anaquel. Los conservantes permitidos para su uso en alimentos está regulado por disposiciones legales nacionales e internacionales, tal es el caso que la FDA/Codex *Alimentarius* tiene permitido la aplicación de ciertos aditivos en la elaboración del queso fresco (Tabla N° 4).

**Tabla N° 4 Conservantes permitidos para quesos no madurados**

NOMBRE DEL ADITIVO	DOSIS MAXIMA
Ácido sórbico	1 g/Kg de queso, sólo o mezclado, expresado como ácido ascórbico
Sorbato de potasio	
Sorbato de calcio	
NISINA	12,5 mg/Kg
Ácido propiónico	Limitada por las BPF
Propionato de sodio	
Propionato de calcio	
Propionato de potasio	

Fuente: FDA/Codex *Alimentarius*. Codex Stan 221, 2001.

La alteración del queso por mohos se suele retardar o impedir cuando al propio queso o a los materiales que se emplean para envolverlos se les



añade ácido sórbico, sorbatos, ácido propiónico o propionatos. Aunque son más eficaces a valores bajos de pH, siendo empleados en alimentos cuyo pH tiene un valor próximo a 6.5 (Frazier y Westhoff, 2000).

El uso de conservantes químicos como el Sorbato de potasio, que si bien se usa fundamentalmente para prevenir las alteraciones provocadas por mohos en la superficie del queso, también tiene efecto inhibidor sobre un gran número de bacterias (Franco et al, 2002). Para López Orozco (2004), el Sorbato de potasio es el aditivo antifúngico más apropiado en base a su funcionalidad y a su costo, para su uso en quesos frescos con pH entre 5.0 y 6.0.

#### **3.2.2.4 Elaboración de queso fresco**

Las operaciones que se aplican para la obtención del queso generalmente involucran la acidificación y deshidratación de la leche en la cual se concentra la grasa y la caseína de la leche por la coagulación enzimática (quimosina) de la caseína. En la elaboración de los diferentes tipos de quesos, existen diferentes pasos a seguir, siendo la adición del cuajo una de las etapas más importantes.

#### **4.2.2.4.1 Insumos**

##### **a. Leche**

La leche es la materia prima principal en la elaboración del queso fresco, es fuente importante de lactosa y caseína. La caseína ocupa el 80% aproximadamente de la fracción nitrogenada de la leche, siendo fundamental para la elaboración de quesos, pues sobre ella actúan los coagulantes.

##### **b. Cuajo**

El cuajo es una enzima específica llamada quimosina, la cual es secretada en el abomaso (cuarto estómago) de los rumiantes y tradicionalmente la principal fuente de suministro son los terneros (Varnam y Sutherland, 1994). Frecuentemente utilizada en la fabricación de queso cuya función es separar el agua de la leche, llamado suero, de la cuajada, a partir de la cual se fabrican los quesos. El accionar de la quimosina es que actúa directamente en un punto delimitado de la caseína. Al romper dicha molécula se inicia la formación de un gel que atrapa la mayoría de los componentes sólidos de la leche; este gel se contrae poco a poco y al contraerse va expulsando suero. Al cortarse el

gel en cubitos, se logra separar entre un 50-90 % del contenido inicial del agua de la leche.

#### **c. Sal común**

El cloruro de sodio (NaCl), comúnmente llamado sal, cumple un rol importante en la elaboración de quesos. La sal da forma y constriñe las características del queso. La sal tiene influencia en el desuerado, el cual a su vez incide en el contenido de humedad del queso terminado. Al mismo tiempo, la sal afecta la forma y características de la corteza del queso, influye en el sabor así como en el desarrollo y supervivencia de bacterias iniciadoras o no iniciadoras (Jonson y Paulus, 2005).

#### **d. Cloruro de Calcio**

El cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ), tiene como función darle mayor firmeza mecánica a la cuajada. Esto es particularmente importante cuando se trata de leche pasteurizada, porque durante la pasteurización, se da un proceso normal de descalcificación parcial de las caseínas. La ausencia de cloruro de calcio hace que muchas veces la cuajada tenga poca firmeza mecánica y, entonces, al cortarla, se generarán cantidades innecesarias de "polvo" o "finos" de cuajada, que se depositan en el fondo de la tina de quesería y se van con el lactosuero, en lugar de contribuir al rendimiento del queso (Inda, 2000).

#### **4.2.2.4.2 Etapas de la elaboración de queso fresco**

##### **a. Recepción de la Leche**

La leche empleada en la elaboración de quesos debe ser de buena calidad, tanto de vista químico como microbiológico, incluso los niveles de higiene exigidos para la leche de consumo directo, deben ser exigidos para la leche destinada a la elaboración de quesos (Madrid, 1996). La leche debe de tener la acidez requerida y debe estar libre de impurezas, siendo necesaria su filtración para eliminar cuerpos extraños en la misma. Es importante aplicar en la leche una serie de pruebas y procedimientos para comprobar el estado de conservación de la leche que ingresa a proceso e involucran la determinación de pH, la acidez titulable y la estabilidad frente al alcohol.

##### **b. Pasteurizado**

La pasteurización puede definirse como "un proceso higienizante destinado a eliminar completamente la microflora patógena de la leche, disminuir considerablemente la microflora banal y destruir un alto porcentaje de enzimas deterioradoras (Villegas, 2009). No obstante, el calentamiento de la leche origina la pérdida de su capacidad de coagulación por el cuajo. Sin embargo, tecnológicamente está perdida

puede ser reversible mediante la adición de  $\text{CaCl}_2$  (Varnam y Sutherland, 1994).

La pasteurización es un procedimiento fundamental en la elaboración de quesos frescos de corta maduración y en los curados de no más de 2 meses (Martegani, 2006). Para quesos frescos existen dos métodos para pasteurizar la leche; el primero consiste en calentar la leche a 63-65 °C, durante 30 minutos (pasteurización lenta, LTLT) y el otro en calentarla durante 15 segundos, a 72 °C (pasteurización rápida, HTST). Ambos tratamientos son equivalentes en cuanto a su capacidad de destrucción total de microorganismos patógenos (Inda, 2000; Villegas, 2009; López Orozco, 2004). Para Frazier y Westhoff (2000), la pasteurización lenta de la leche a 65 °C por 30 minutos es eficiente en la eliminación de la flora patógena inicial de la leche, permitiendo la reducción del 99.9% de la carga inicial.

### **c. Enfriado**

El objetivo principal de esta etapa es acondicionar la leche (Temperatura, corrección de calcio) que permita mejorar el rendimiento, la actividad y formación del cuajo. Con la pasteurización la leche se pierde algunas de sus propiedades coagulantes; pierde entre 8 y 30% de calcio soluble, dando coágulos más débiles y difíciles de desuerar, provocando pérdidas

por los tratamientos mecánicos a aplicar (Zambrano, 2010). El uso de cloruro de calcio restituye parte de este calcio, pudiéndose agregar en esta etapa el  $\text{CaCl}_2$  en una proporción no mayor del 0.02 % en relación a la leche que entró a proceso (Fernández et al, 2004). Con la adición del cloruro de calcio facilitamos la coagulación, mejora el rendimiento y en definitiva la calidad final del queso.

#### **d. Coagulado**

La coagulación de la caseína es el proceso fundamental de la fabricación del queso, y es consecuencia de la desestabilización proteica y puede llevarse a cabo mediante la acción de proteinasas ácidas como la quimosina (coagulación enzimática) o por acidificación a un valor de pH próximo al punto isoeléctrico de las proteínas (Varnam y Sutherland, 1994; Zambrano, 2010). La coagulación enzimática tiene lugar en dos fases distintas, una fase proteolítica en la que las micelas de caseína se desestabilizan por hidrólisis de la k-caseína, formándose micelas de para-k-caseína y una fase secundaria, mediada por el calcio, en la que las micelas de paracaseína se agregan y precipitan. Con el tiempo van formando una red con poros, dentro de la cual se van acomodando los glóbulos grasos y el coágulo se va haciendo más firme por la continua formación de enlaces entre las micelas (Zambrano, 2010). Esta última fase requiere condiciones de reposo y una temperatura por encima de 20

°C (Varnam y Sutherland, 1994). Para Zambrano (2010), la temperatura óptima de acción del cuajo está alrededor de los 40°C pero se utiliza menores para evitar la dureza del coagulo

#### **e. Cortado y Batido**

El corte de la cuaja inicial favorece la sinéresis. Durante el corte debe evitarse la ruptura del coagulo y la correspondiente pérdida de materia grasa y un deficiente sinéresis (Varnam y Sutherland, 1994). El tamaño del corte de la cuajada depende del tipo de queso y permitirá obtener un queso más o menos húmedo. Para los quesos frescos se debe cortar en cubos de 1 a 2 cm de arista, en lo posible de forma homogénea que permita la salida de la mayor cantidad de suero posible por aumento de la superficie (Zambrano, 2010). La agitación o batido de la cuajada, manteniendo la temperatura entre 38-40 °C, favorece a la sinéresis y la eliminación del suero.

#### **f. Desuerado**

Consiste en la separación del suero de la cuajada, ya sea por filtración o decantación. Pudiéndose separar hasta el 90% del lactosuero. Tecnológicamente se puede realizar dos desuerados, en el primer desuerado se elimina el 35-50% del lactosuero, el suero restante permite

la homogenización de la sal añadida de manera directa. El suero generalmente puede ser aprovechado para la elaboración de otros productos.

#### **g. Salado**

El salado es un procedimiento que se aplica en todo tipo de quesos. El salado debe realizarse para lograr el sabor adecuado del queso, además facilita el desuerado de la cuajada y tiene un papel conservante al inhibir el crecimiento de bacterias no deseables, cuando este se encuentra en concentraciones elevadas.

#### **h. Moldeado**

El moldeado permite que los coágulos se unan y formen una masa continua, determinando así la textura del queso y la forma definitiva (Zambrano, 2010). Los orificios del molde permiten la salida del suero retenido en el interior de la cuajada.

#### **i. Almacenado**

La refrigeración permite que el queso alcance su punto final de textura y presentación. El almacenamiento en refrigeración se debe realizar a una



temperatura de 4 - 7 ° C, para impedir el crecimiento acelerado de los microorganismos, sin afectar a las características sensoriales del producto (IIAC, 2004). La durabilidad del queso fresco es variable y depende de que tan riguroso se fuera con la elaboración, sobre todo en la pasteurización, enfriamiento de la leche, manipulación de la cuajada durante el moldeado y almacenamiento del producto final (Fundación para la innovación agraria de Chile, 2000).

### **3.2.3 BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS**

#### **3.2.3.1 Características generales**

Las bacterias ácido-lácticas constituyen un grupo de microorganismos de gran importancia en la industria alimentaria, ya que participan fundamentalmente en los procesos de maduración de muchos alimentos fermentados como derivados lácteos, cárnicos e otros. La fermentación de los alimentos por bacterias ácido-lácticas (BAL) es una de las formas más antiguas de conservación usadas por el hombre. Incluidos en estos alimentos están el yogurt, muchas variedades de quesos, salsas, vegetales fermentados y productos de panadería (Ramírez et al, 2005).

Las bacterias lácticas se definen como microorganismos gram positivos, generalmente inmóviles, no esporulados, y no reductores de nitratos. Tampoco licúan la gelatina y no producen indol ni ácido sulfhídrico. Son anaerobios aerotolerantes ya que, aunque en general carecen de catalasa, poseen peroxidasas y superóxidodismutasas que destruyen, respectivamente, el  $H_2O_2$  y el  $O_2$  que se forman en condiciones de aerobiosis (Martínez, 1996). Este grupo de microorganismos está formado por *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, cuya característica principal es la producción de ácido láctico. Uno de los rasgos fisiológicos más característicos es su tolerancia al ácido como consecuencia obligada de su metabolismo, lo cual les ofrece una gran ventaja para desarrollarse en los hábitats donde se encuentran.

Las actividades metabólicas de las bacterias lácticas no sólo contribuyen al desarrollo de las características organolépticas y reológicas de los alimentos fermentados, además, permiten preservar el valor nutritivo y la salubridad de la materia prima, proporcionando un producto agradable al consumidor y generando en él un ambiente poco favorable para el desarrollo de patógenos y otros microorganismos que pudieran alterarlos (Martínez, 1996).

En la actualidad un gran número de BAL son consideradas probióticas ya que estas ejercen una acción protectora contra la adherencia, la colonización, la reproducción y la acción patógena de agentes

enteropatógenos específicos, mediante distintos mecanismo de acción, que aún no han sido completamente esclarecidos (Amores et al, citado por Cartes, 2005). Las BAL utilizadas generalmente como probióticos pertenecen a especies de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium*.

### **3.2.3.2 Efectos protector/inhibitorio de las BAL**

Los microorganismos poseen distintas formas para sobrevivir y competir en su ambiente, interactuando unas con otras; habiéndose definido dos efectos de interacción: un efecto sinérgico o un efecto antagónico. Un claro ejemplo del efecto sinérgico se da en el cultivo clásico de yogurt donde existe una protosimbiosis entre *Streptococcus thermophilus* y el *Lactobacillus bulgaricus*. Mientras que el efecto antagónico se da por la producción de sustancias de defensa que le confieren un carácter antagónico frente al crecimiento de microorganismos patógenos. Este efecto antagónico se basa comúnmente en la producción de sustancias que inhiben e interactúan más o menos, especialmente con microorganismos iniciadores relacionados y hasta con bacterias no relacionadas (Heller, 2008).

La capacidad de producir grandes cantidades de ácido láctico por fermentación de los carbohidratos presentes y la consecuente caída del pH son los factores primarios en los que se basa la actividad

antimicrobiana de las bacterias lácticas. Los ácidos lipofílicos son capaces de atravesar la membrana plasmática e interferir con las funciones básicas del metabolismo celular, disminuyendo el pH interno de la célula. Así se explica el amplio rango de microorganismos inhibidos, con la única excepción de los organismos acidodúricos como levaduras, mohos y las propias bacterias lácticas (Martínez, 1996). Así pues, las BAL llegan a proliferar en la mayoría de los hábitats, constituyendo un claro ejemplo de antagonismo microbiano.

Otro efecto antagónico mostrado por las BAL consideradas probióticas, es la competición con los patógenos, no sólo por los nutrientes, sino también por el espacio físico. Algunas de estas bacterias pueden inhibir la adherencia de los agentes patógenos a los sitios receptores de la célula animal por un mecanismo de bloqueo específico del receptor, con lo que se produce una prevención de la colonización de los microorganismos patógenos, por inhibición competitiva en los lugares de adhesión (Chauviere et al, citado por Cartes, 2005). En general la privación a los agentes patógenos de los nutrientes específicos limita el desarrollo y proliferación de los mismos. Sin embargo, el complejo sistema antagonista de las bacterias lácticas no sólo se basa en la producción de ácido láctico sino que también participan activamente otros metabolitos inhibitorios que a pesar de ser sintetizados en menor cantidad, contribuyen significativamente al efecto antagónico. Entre ellos cabe destacar la producción de  $H_2O_2$  y otros derivados del metabolismo del  $O_2$ ,

CO<sub>2</sub>, compuestos aromáticos (diacetilo, acetaldehído), derivados deshidratados del glicerol (reuterina), benzoato, enzimas bacteriolíticos, bacteriocinas (Rojas y Vargas, 2007; Muños, 2003; Farías et al, citado por Ramírez et al, 2005; Martínez, 1996). La producción de estas sustancias anti-microbianas es considerada como el principal mecanismo por el cual las bacterias lácticas inhiben el crecimiento de diferentes bacterias patógenas, como *Escherichia coli*, *Streptococcus* y *Salmonella* (Fons et al, citado por Cartes, 2005; González et al, 2003).

**Tabla N° 5 Principales mecanismos de Acción propuestas para las bacterias probióticas**

ACCION	MECANISMO
Prevención de la colonización por microorganismos patógenos	Bloqueo de receptores específicos (adherencia) y competencia por nutrientes.
Actividad antimicrobiana	Producción de sustancias con acción antimicrobiana (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , bacteriocinas, ácidos orgánicos...).
Inmunomoduladora	Regulación de la respuesta inmunitaria humoral y celular.
Actividad enzimática	Disminución en la actividad de enzimas asociadas con la síntesis de lactosas, procarcinógenos, etc.

Fuente: Adaptada de Cartes, 2005

### 3.2.3.3 Características generales del género *Lactobacillus*

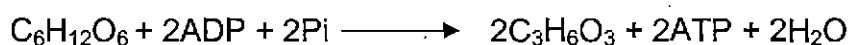
Son organismos gram positivos, inmóviles, no esporulados, microaerófilos, mejorando su crecimiento en anaerobiosis o bajo reducidas presiones de oxígeno y entre 5 y 10 % de dióxido de carbono. Su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 30 y 40 °C. Su tolerancia al ácido varía desde 0,3% hasta 1,9% de acidez titulable (Gomes y Malcata, citado por Cartes, 2005). El pH óptimo para su crecimiento se ubica entre 5,5 y 6,2, pudiendo desarrollarse a pH menores de 5,0 (Kandler y Weiss, citado por Cartes, 2005).

El género *Lactobacillus* está distribuido a través del tracto gastrointestinal y genital, constituye una fracción importante de la microflora presente en el hombre. Su repartición es afectada por distintos factores medioambientales, entre los que se incluyen el pH, la disponibilidad de oxígeno, los niveles de sustratos específicos, la presencia de secreciones y las interacciones bacterianas. Es por ello que para que esta cepa sea considerada un organismo probiótico, debe presentar adecuada estabilidad al ácido clorhídrico y a la bilis, que permita su paso por todo el tracto gastrointestinal, para que se adhiera a la mucosa intestinal y que colonice temporalmente el tracto gastrointestinal humano, produciendo componentes antimicrobianos.

### 3.2.3.4 Características generales de *Lactobacillus casei*

Son bacterias gram positivas con forma de bastón inmóviles, las cuales se encuentran en pares o cadenas, son mesófilas heterofermentadoras facultativas, las cuales producen ácido láctico como principal producto final de la fermentación y no producen gas en presencia de glucosa. En condiciones limitadas de glucosa, producen tres otros productos, ácido acético, etanol y ácido fórmico (Navarrete, 2007). Su nombre proviene principalmente de la palabra "Caseus" que significa queso (Curry y Crow, citado por Alvarado, 2008). Cada microorganismo está rodeado de una pared de aproximadamente 20 a 30 nm de grosor, la cual está compuesta de peptidoglicano, ácido teicoico y proteínas.

Es una bacteria anaeróbica facultativa, no esporuladas, no productora de catalasa, comúnmente se encuentran en forma natural en vegetales fermentados, leche, carne, así como en el intestino. Genera su energía a partir de la glucosa de acuerdo a la siguiente reacción:



El ácido láctico producido, se acumula en el medio, y el pH del medio decrece. Cuando la concentración de ácido láctico incrementa a 16 g/l, el

pH decrece cerca de 4, el crecimiento microbiano cesa debido a la alta concentración del ácido láctico (Cerón, 2008). Adicionalmente a la producción del ácido láctico como producto principal, también produce otros metabolitos como las bacteriocinas.

Debido a que este microorganismo ejerce beneficios sobre el organismo del consumidor y a la actividad biológica que presenta esta cepa y otras cepas benéficas se les emplea en la elaboración de alimentos lácteos probióticos. Con el término "probiótico", se ha definido a los microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas ejercen una influencia positiva en la salud o en la fisiología del hospedero (Schrezenmeir y Vrese, citado por González et al, 2003).

Esta cepa probiótica, se ha comprobado que es muy resistente a rangos muy amplios de pH y temperatura, siendo además un complemento al crecimiento del *Lactobacillus acidophilus*, un productor de la enzima amilasa (una enzima digestiva de carbohidratos en la saliva y en el jugo pancreático de mamíferos). Se sabe que mejora la digestión, la tolerancia a la leche y evita la diarrea. Por esta razón se emplea en la elaboración de diversos alimentos funcionales.



### **3.2.4 BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR LAS BAL**

#### **3.2.4.1 Características generales**

Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica producidas por diferentes cepas bacterianas (Ramírez et al, 2005; Monroy et al, 2009). Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo de péptidos sintetizados en el ribosoma con más de 60 aminoácidos y pueden ser péptidos de moléculas elongadas o péptidos de moléculas globulares con un amplio rango de peso molecular (Fimland et al, citado por Rojas y Vargas, 2007). Estas sustancias con frecuencia actúan frente a las bacterias más estrechamente relacionadas con la especie productora (Tagg et al, citado por Martínez, 1996). Sin embargo otros estudios recientes afirman que también pueden actuar frente a otras especies bacterianas, hongos y algunos parásitos (Monroy et al, 2009; Sablón et al, citado por González et al, 2003).

La producción de bacteriocinas parece depender del crecimiento y actividad fisiológica de la cepa productora. De hecho, la mayoría de las bacteriocinas que se han estudiado hasta el momento presentan una cinética de metabolito primario y, en consecuencia, su producción está correlacionada con el aumento de la biomasa (Martínez, 1996). La actividad antibacteriana de las bacteriocinas producidas por las BAL, se

pronuncia en la fase logarítmica temprana y la fase estacionaria por lo que a la hora de aplicar las bacteriocinas a un alimento a partir de un cultivo iniciador o para su purificación, es importante considerar que la etapa en la cual la velocidad máxima de producción de la bacteriocina es la fase log, por lo que aumenta la efectividad del proceso de acción de estos compuestos ante microorganismos alterantes o patógenos importantes (Ogunbanwo et al, Pal et al, citados por Rojas y Vargas, 2007).

Las características antagónicas que han presentado las bacteriocinas contra microorganismos patógenos presentes en los alimentos, permite ser considerados en la bioconservación de alimentos, es decir, el uso de bacterias lácticas, sus productos metabólicos o ambos que permitirá mejorar la seguridad y calidad de los alimentos que generalmente no son fermentados, como lo es el queso fresco.

En la actualidad las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son las que encierran un mayor interés ya que tienen el reconocimiento de GRAS, por su siglas en inglés (*Generally recognized as safe*), es decir son consideradas como microorganismos seguros para la salud, ya que tanto ellas como sus metabolitos han sido consumidos en alimentos fermentados por innumerables generaciones sin que hubiera efectos adversos en la población (son proteínas que al biodegradarse no forman

compuestos secundarios). Además tiene un papel importante en la preservación y fermentación de alimentos, además de mejorar la calidad higiénica en alimentos por inhibir la flora competitiva la cual incluye bacterias deteriorativas y patógenas como *Listeria monocytogenes* (Rojas y Vargas, 2007; Monroy et al, 2009; González et al, 2003).

De acuerdo al espectro de inhibición, existen bacteriocinas que son activas frente a cepas o especies relacionadas como la lactococinas A, B, M y G, lactacina B, helveticina J, etc. Pero también existen bacteriocinas que inhiben a un rango mucho más amplio de microorganismos, entre los que se incluyen patógenos y alterantes de alimentos Gram positivos nisina, pediocinas, lactacina F, etc (Klaenhammer, citado por Martínez, 1996). Considerando la diferencia en peso molecular se entiende que cada bacteriocina es diferente y que su uso en la industria alimentaria como preservante, depende del microorganismo de deterioro o patógeno que se desea controlar (Rojas y Vargas, 2007).

El estudio de las propiedades físicas y químicas, modo de acción y relaciones entre estructura y función de las bacteriocinas es necesario para evaluar su potencial aplicaciones en alimentos (Núñez et al, 2007).

### 3.2.4.2 Modo de acción de las Bacteriocinas

El blanco primario de acción de las bacteriocinas parece ser la membrana plasmática. Éstas alteran la permeabilidad selectiva de la membrana de las células vegetativas sensibles, provocando la inmediata e inespecífica liberación de iones, compuestos de bajo peso molecular y algo más tarde del ATP intracelular. Estas alteraciones provocan la disipación completa o parcial de la fuerza protón motriz (PMF) ocasionando desórdenes metabólicos secundarios que, en último término, inhiben la generación de energía y la síntesis de macromoléculas, lo que supone la muerte celular (Monteville et al, citado por Martínez, 1996; Grande *et al*, citado por Rojas y Vargas, 2007). La PMF es un gradiente electroquímico compuesto de un potencial de membrana ( $\Delta\psi$ ) y de un gradiente de pH ( $\Delta\text{pH}$ ), y es necesaria para llevar a cabo gran parte de los procesos dependientes de energía del metabolismo celular (Martínez, 1996).

La hipótesis más aceptada sobre cómo las bacteriocinas desestabilizan las membranas es que, en función de su carácter catiónico, éstas serían inicialmente atraídas electrostáticamente por la superficie celular (las bacteriocinas se adsorben inespecíficamente a células sensibles, a resistentes y a las propias células productoras). Posteriormente, bien por la presencia de un determinado potencial de membrana o por la interacción con un receptor específico o no, adoptarían una conformación

tal que les permitiría agregarse entre sí formando aglomerados que se reordenarían para dar lugar a una especie de cilindro hueco (poro) que atravesaría la matriz membranal, manteniendo las zonas hidrofílicas hacia la parte interior del poro (Martínez, 1996).

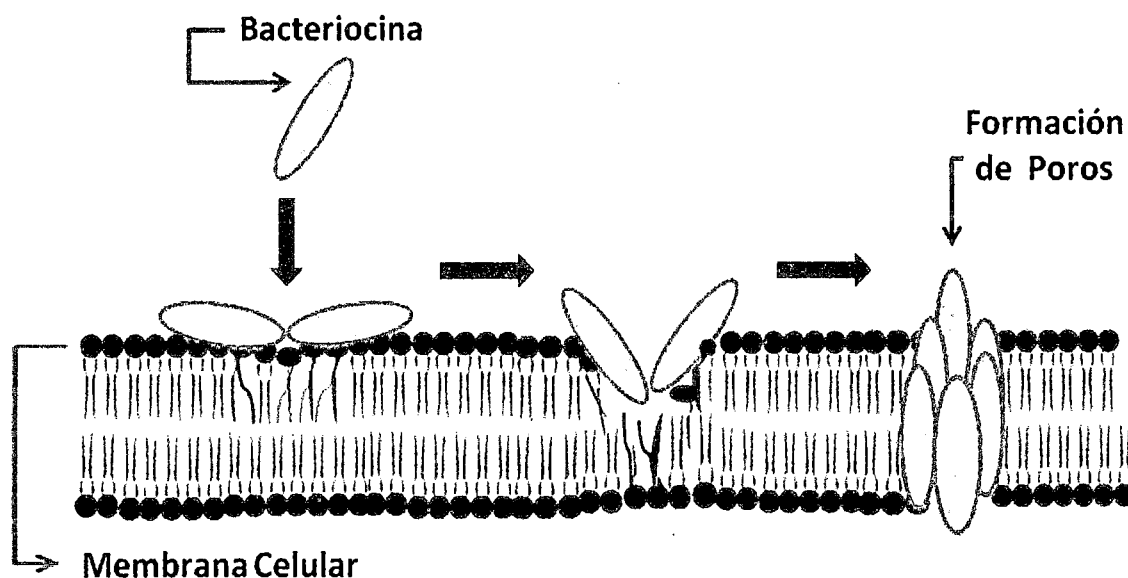
La composición y distribución de los fosfolípidos de la membrana celular influye en la eficiencia de la asociación de la bacteriocina con el citoplasma, su inserción y la formación del poro, es por este fenómeno que se debe la resistencia de algunos de los microorganismos patógenos frente a una bacteriocina específica (Cintas *et al*, citado por Rojas y Vargas, 2007).

Otro mecanismo de acción propuesta sobre la permeabilidad de la membrana celular por parte de las bacteriocinas, es que estas desestabilizan la membrana a modo de un detergente biológico (Abee *et al*, Muriana, citados por Nuñez *et al*, 2007). Los resultados de numerosos experimentos apoyan la hipótesis de formación de poros frente a la desestabilización de la membrana mediante una acción de tipo detergente (Monteville *et al*, citado por Martínez, 1996; Nuñez *et al*, 2007, González *et al*, 2003).

Un esquema del modelo de poración se presenta en la Fig. 2. Los monómeros de bacteriocina se unen a la membrana citoplasmática a

través de uniones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente, luego se insertan en la membrana con una reorientación que depende del potencial de membrana. Este potencial podría estar influenciado por el pH y la composición fosfolípídica. Los monómeros se agregan resultando en la formación de un poro en la membrana, hacia adentro de la región de fosfolípidos se ubican los residuos hidrofílicos y hacia fuera los hidrofóbicos, con la consecuente salida de iones y la pérdida de la fuerza protón motriz (FPM) a la que le sigue la muerte celular.

**Figura N° 2 Interacción de los monómeros de bacteriocina con la membrana citoplasmática: modelo de complejo de poración**



Fuente: Doyle et al, 1997.

### 3.2.5 CRECIMIENTO BACTERIANO

El crecimiento se define como un incremento en el número de células microbianas en una población, lo cual también puede ser medido como un incremento en la masa microbiana (Madigan et al, 1999).

El ritmo de reproducción de las bacterias suele ser una simple división en dos nuevas células. El tiempo que tarda una población en duplicarse se llama tiempo generacional ( $T_g$ ). Para las bacterias un ciclo de división se da cada veinte-treinta minutos (Madrid, 1996). Este ritmo de reproducción se ve frenado en la práctica por factores limitantes que condicionan la vida y desarrollo de las bacterias.

#### 3.2.5.1 Factores que influyen en el crecimiento bacteriano

Las bacterias, como todo ser vivo, necesitan unas condiciones especiales del medio que las rodea para poder desarrollarse adecuadamente. Es preciso distinguir entre las variaciones de las condiciones externas que pueden soportar y las condiciones óptimas para su desarrollo.

**Factores intrínsecos.-** se refiere a las propiedades físicas y a la composición química del propio alimento. Entre los factores intrínsecos

tenemos: Nutrientes, pH, actividad de agua, constituyentes antimicrobianos y la estructura del propio alimento.

**Factores extrínsecos.-** determinado por los factores ambientales o características del ambiente donde se almacena el alimento: temperatura, humedad y tensión de oxígeno.

**Factores implícitos.-** determinados por las relaciones que se establecen entre los microorganismos presentes en el alimento, entre las que se encuentran: la velocidad de crecimiento específica, antagonismo, comensalismo y sinergismo.

Existen otros factores considerados de procesos, en la cual el alimento es sometido a tratamientos tecnológicos que modifican la microbiota inicial y repercuten en la composición final del producto.

### **3.2.5.2 Fases del crecimiento bacteriano**

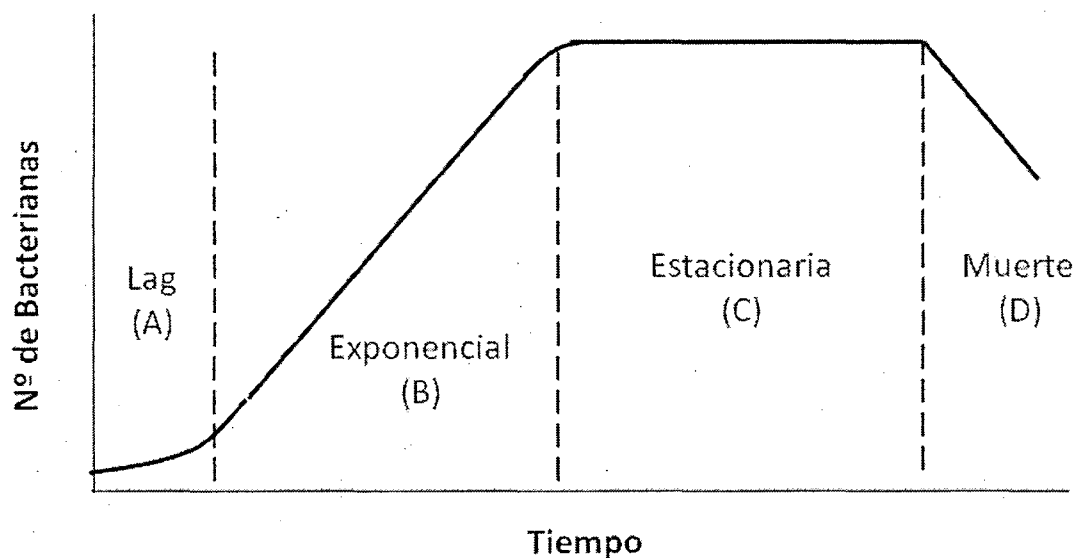
Siempre que se encuentren presente o se añadan microorganismos a un alimento y las condiciones del medio sean apropiadas, las células microbianas empezarán a multiplicarse, pasando por una serie de fases consecutivas. Cuando se hacen recuentos periódicos del número de células microbianas y los resultados obtenidos se expresan con el



logaritmo del número de células por g o ml y se representan gráficamente como ordenadas, y las unidades de tiempo se representan gráficamente como abscisas, se obtiene una curva de crecimiento bacteriano (Frazier y Westhoff, 2000).

En la Figura N° 3 se presenta la curva típica de crecimiento de las bacterias, donde se distinguen cuatro fases.

**Figura N° 3 Curva típica de crecimiento bacteriano**



Fuente: Adaptada de Madigan et al, 1999.

**Fase Lag o de latencia:** es el periodo de adaptación o aclimatación de la bacteria al medio para iniciar su crecimiento. La presencia o extensión de este periodo depende del inoculo (estado fisiológico, fase de crecimiento,

tamaño y tipo de microorganismo) y de la composición del medio en el que se inocula (condiciones fisicoquímicas del medio). Es decir, si las condiciones para el desarrollo de esta última son las adecuadas (temperatura, nutrientes, humedad, etc.) apenas necesitará adaptación alguna (Madrid, 1996).

**Fase exponencial:** en esta etapa el crecimiento bacteriano es acelerado y la velocidad de multiplicación o tasa de crecimiento es constante (Frazier y Westhoff, 2000). Las condiciones del medio son las adecuadas y la producción de desechos metabólicos es poca para inhibir el desarrollo de la propia bacteria. Durante esta fase cada microorganismo se divide a intervalos constantes, y la población se doblará en el transcurso del tiempo de generación.

**Fase Estacionaria:** en esta etapa aun se reproducen las bacterias a un ritmo menos acelerado, produciéndose muertes de otras células existentes a una velocidad similar, equilibrándose el crecimiento bruto con las muertes celulares. En esta etapa se agotan los nutrientes especiales y se acumulan sustancias de desechos metabólicos de las propias bacterias alcanzan niveles inhibitorios (Madrid, 1996).

**Fase de declive o muerte:** en esta etapa el número de células que mueren es mayor que el número de células que se forman (Frazier y

Westhoff, 2000). Se presenta la lisis masiva exponencial del cultivo, debido al agotamiento de reservas de energía.

### **3.2.5.3 Modelamiento matemático del crecimiento bacteriano**

Las curvas de crecimiento bacteriano nos permiten obtener los parámetros cinéticos de crecimiento propios de la bacteria en un medio concreto. Estos parámetros vienen a ser la descripción matemática del comportamiento bacteriano. Estos parámetros nos permiten evaluar y caracterizar el comportamiento de la bacteria en un sustrato y tiempo determinado.

Existen modelos matemáticos que nos permiten estimar la población bacteriana en función del tiempo. Entre los diferentes modelos matemáticos tenemos a los modelos primarios que tienen como objetivo describir matemáticamente la curva de crecimiento generada por los microorganismos de interés bajo condiciones ambientales definidas con el objeto de estimar los parámetros cinéticos que caracterizan dicha curva: tiempo de latencia, máxima velocidad específica de crecimiento y máxima densidad celular (Cayré et al, 2007). Entre los modelos primarios tenemos: modelos sigmoidales, entre los que se encuentran las versiones modificadas de los modelos Logístico y de Gompertz; modelos con una función de ajuste, como el propuesto por Baranyi y Roberts, y modelos de

compartimentos como el propuesto por Hills y Wrigth (Baty y Delignette-Müller, citado por Cayré et al, 2007).

La propiedad más importante de un modelo primario es que describa de forma adecuada el crecimiento de los microorganismos y permita obtener estimaciones precisas de los parámetros que caracterizan dicho crecimiento. Es así que uno de los modelos matemáticos más usados para estimar y ajustar el crecimiento microbiano es el modelo propuesto por Baranyi y Roberts en 1994 (Cayré et al, 2007).

#### **3.2.5.3.1 Baranyi y Roberts**

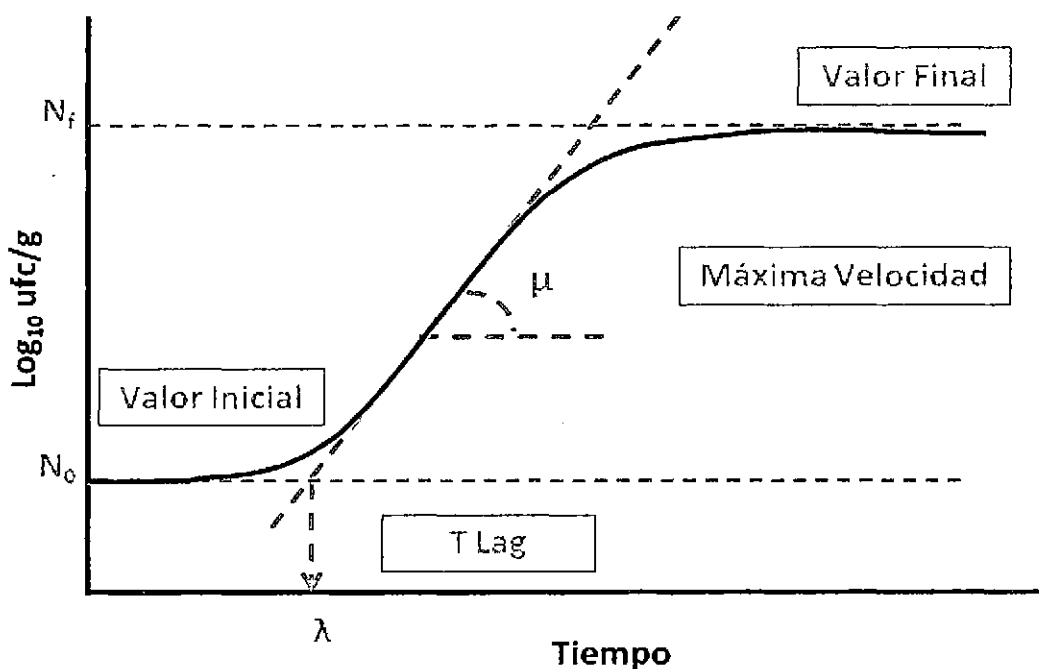
El modelo de Baranyi y Roberts describe una curva bacteriana sigmoidea. La diferencia principal entre este modelo y otras curvas sigmoidales como la función modificada de Gompertz, el modelo logístico, etc., es que las interfases son más lineales que los de aquellas curvas sigmoideas clásicas, las cuales tienen una mayor pronunciación en la curvatura de estas interfases (DMFit, 2009). El modelo de Baranyi y Roberts tiene 4 parámetros principales valor inicial ( $N_0$ ), Tiempo de latencia ( $\lambda$ ), velocidad máxima ( $\mu_{max}$ ) y el valor final ( $N_{max}$ ) (Figura N° 4).

El modelo de Baranyi ha sido usado para ajustar las curvas de crecimiento comúnmente observadas en bacterias: curvas lineales,

aquellas con fase de latencia, aquellas con fase de muerte o declinación y curvas sigmoides (Xiong et al, citado por Carrillo et al, 2007).

Carrillo et al (2007), uso el modelo de Baranyi para ajustar las curvas de crecimiento del hongo *Rhizopus oryzae* generadas a diferentes condiciones de crecimiento. El modelamiento permitió obtener los parámetros de crecimiento ajustados (velocidad específica de crecimiento, tiempo de latencia y crecimiento máximo).

**Figura N° 4 Parámetros cinéticos de crecimiento bacteriano en una curva típica: Modelo Baranyi y Roberts**



Fuente: DMFit, 2009.

La expresión matemática del modelo de Baranyi y Roberts citado por Cayré et al (2007) es:

$$y(t) = y_{\max} + \text{Ln} \left( \frac{-1 + \exp(\mu_{\max} \cdot \lambda) + \exp(\mu_{\max} \cdot t)}{-1 + \exp(\mu_{\max} \cdot t) + \exp(\mu_{\max} \cdot \lambda + y_{\max} - y_0)} \right)$$

Donde:

$y(t) = \ln N(t)$ , siendo  $N(t)$  la densidad bacteriana ( $\text{ufc} \cdot \text{g}^{-1}$ ) al tiempo  $t$ .

$y_0 = \ln N_0$ , siendo  $N_0$  el valor asintótico inferior y aproximadamente igual a la densidad bacteriana inicial ( $\text{ufc} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

$y_{\max} = \ln N_{\max}$ , siendo  $N_{\max}$  el valor asintótico superior y aproximadamente igual a la máxima densidad bacteriana ( $\text{ufc} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

$\mu_{\max}$  = máxima velocidad específica de crecimiento ( $\text{tiempo}^{-1}$ ) o tasa de mortalidad máxima (letalidad) en caso de una curva de supervivencia.

$\lambda$  = tiempo de latencia o retraso (tiempo). Definida generalmente como la intersección entre la tangente a la fase de crecimiento exponencial y el valor inicial.

### **3.2.6 *Escherichia coli***

#### **3.2.6.1 Características generales**

Taxonómicamente las bacterias de la especie *Escherichia coli* pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacilos cortos, gram negativos, quimioheterotrofos, catalasa positiva, oxidasa negativa, anaerobios facultativos. Produce ácido y gas a partir de la glucosa, lactosa, fructosa, galactosa, maltosa, arabinosa, xilosa, ramnosa y manitol. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar. Nunca fermenta la dextrina, almidón, glucógeno e inositol (Dos santos, 2007).

La mayoría de las cepas pertenecientes a la especie *Escherichia coli*, forman parte de la microflora normal del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente, encontrándose habitualmente en las heces. Es por ello que su presencia en los alimentos es índice de contaminación fecal y señala un peligro potencial de posibles patógenos entéricos.

#### **3.2.6.2 *Escherichia coli*: indicador de Higiene**

En 1920, se introdujo la utilización del grupo total de las bacterias del grupo coliformes como marcadores en el análisis microbiológico de la

leche pasteurizada y de los helados, basándose en el principio de que un tratamiento térmico adecuado habría de eliminar todas las bacterias presentes de este grupo y de que el envasado debería impedir la recontaminación del producto (Dos santos, 2007). Pero en la actualidad se distinguen dos grupos de microorganismos indicadores:

- Aquellos cuya presencia en los alimentos señala la posible presencia simultánea de gérmenes patógenos ecológicamente relacionados. Tales microorganismos podrían ser denominados “índices”. El microorganismo clásico es *Escherichia coli*.
- Aquellos cuya presencia en los alimentos indica deficiencias en su calidad higiénica. El término “microorganismos indicadores” sería utilizado para este grupo de bacterias. Los microorganismos indicadores más conocidos son los coliformes. En la leche pasteurizada, por ejemplo, la existencia de bacterias de este grupo en número que exceda a un valor de referencia experimental y legalmente establecido puede poner de manifiesto o advertir diversas deficiencias de este producto, entre ellas un tratamiento térmico insuficiente, una contaminación posterior al tratamiento, o un almacenamiento del producto final a una temperatura demasiado elevada (Dos santos, 2007).



*Escherichia coli* puede actuar como índice o como indicador, incluso en un mismo alimento. Por ejemplo, su presencia en número significativo en camarones precocidas y congeladas pone de manifiesto o un tratamiento de inocuidad inadecuado (función indicadora), o la posible presencia de microorganismos patógenos de procedencia entérica (función de índice) (Dos santos, 2007).

### **3.2.6.3 *Escherichia coli* enteropatógeno**

Los serotipos de *Escherichia coli* a los cuales se les ha relacionado con enfermedades diarreicas en hombres o brotes de intoxicaciones alimentarias han sido denominados *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC). En el hombre, los síndromes de enfermedad como consecuencia de la ingestión de EPEC se han dividido en dos grupos principales. El primer grupo está integrado por cepas que elaboran una enterotoxina y que producen una enfermedad parecida al cólera o enfermedad enterotoxigénica en las personas (Ver Tabla N° 6). Estas cepas enterotoxigénicas suelen producir dos enterotoxinas, una toxina termoestable y otra toxina termolábil, creyéndose que son las causantes de las enfermedades diarreicas de los niños y de la diarrea del viajero. Para que se desencadene las enfermedades enterotoxigénicas, se precisa la ingestión de serotipos de EPEC capaces de elaborar las enterotoxinas, seguida de la colonización de los microorganismos en el

tramo superior del intestino delgado y de la producción de las enterotoxinas. Parece ser que las enterotoxinas intervienen en el paso de agua a la luz intestinal. Esta acumulación de líquido tiene lugar sin que se produzca ninguna modificación macroscópica importante en el epitelio intestinal y sin que exista penetración ni invasión de las bacterias.

El otro gran grupo está integrado por cepas invasoras que elaboran una citotoxina y originan una enfermedad invasora, colitis, o un síndrome disenteriforme. Estos serotipos no elaboran enterotoxinas se multiplican en el colon, e invaden o penetran en las células epiteliales de su mucosa, produciendo los signos y síntomas que se describen en la Tabla N° 6.

Para que se presente tanto la enfermedad enterotoxigénicas como la enfermedad invasora, se necesita una elevada dosis de EPEC. Por consiguiente para que tenga lugar una abundante multiplicación, los alimentos deben estar contaminados masivamente o deben estar incorrectamente conservados o refrigerados (Frazier y Westhoff, 2000).

**Tabla N°6 Caracteres de las enfermedades producidas por EPEC**

<b>Agente causal</b>	<b>Periodo de incubación</b>	<b>Sintomatología</b>	<b>Alimentos implicados</b>
Cepas enterotoxigénicas	De 8 a 44 horas, con una media de 26 h	Fiebre, escalofríos, cefalalgia, mialgia, retortijones abdominales, abundante diarrea acuosa (parecida a la shigelosis)	Sucedáneos del café, salmón, queso.
Cepas invasoras	De 8 a 24 horas, con una media de 11 h	Diarrea (deposición que parece agua de arroz), vómitos, deshidratación (parecida al cólera)	

Fuente: Frazier y Westhoff, 2000

#### **3.2.6.4 Condiciones de crecimiento del *Escherichia coli***

La temperatura óptima de crecimiento del microorganismo es de 37 °C, con un intervalo de crecimiento de 10-40 °C (Frazier y Westhoff, 2000). Algunas cepas de *Escherichia coli* patógeno son capaces de crecer a temperaturas tan bajas como 7 °C y tan altas como 46 °C. Sin embargo, *Escherichia coli* O157:H7 tiene un intervalo de crecimiento ligeramente más limitado, con una temperatura mínima de crecimiento de 8 °C, una máxima de aproximadamente 44 – 45 °C y una óptima de 37 °C (Dos santos, 2007). Este microorganismo es relativamente termosensible y puede ser destruido con facilidad a temperaturas de pasteurización,

mediante la cocción del alimento y también durante su almacenamiento en frío, sobre todo a la temperatura de congelación.

Su pH óptimo de crecimiento es de 7.0 a 7.5, con un pH mínimo de crecimiento de valor 4.0 y un pH máximo de crecimiento de valor 8.5 (Frazier y Westhoff, 2000). Para Fuller, citado por Rodríguez (1994), el crecimiento del *Escherichia coli* puede detenerse ajustando el pH de un medio de cultivo a 4,5 mediante la adición de ácido láctico o clorhídrico. Este mismo autor administró leche fermentada por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* a lechones destetados, observando cómo descendía el recuento de *Escherichia coli* en estómago y duodeno, afirmando que el efecto originado por el yogurt podía ser reproducido por leche acidificada con ácido láctico a un pH de 4,2.

En cuanto a la  $a_w$ , se ha determinado que el *Escherichia coli* puede crecer en un 6 % de NaCl y toleran mejor el cloruro sódico y nitrito sódico que las cepas típicas de *Salmonella* spp. La cepa *Escherichia coli* O157:H7 es capaz de crecer, aunque lentamente, en un caldo que contenga 6.5 % de NaCl, pero no al 8.5 % (ICMSF, citado por Dos santos, 2007).

### 3.2.6.5 *Escherichia coli* ATCC 25922

El *Escherichia coli* (Migula) Castellani y Chalmers, es una cepa control del American Type Culture Collection (ATCC), cuyo número ATCC es 25922, es un organismo aislado de casos clínicos. Su aislamiento se da en medios selectivos a 37 °C en condiciones de aerobiosis. Así mismo, está clasificado con un nivel de bioseguridad de grado 1, presentando un riesgo biológico mínimo para la salud (ATCC, 2011). Esta cepa bacteriana puede ser utilizada como control en una gran variedad de utilidades, lo cual nos permite conocer el grado de confiabilidad de los productos comerciales o elaborados en el laboratorio. En la actualidad la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 es ampliamente utilizado como un control de bacterias Gram negativas para diversos experimentos de laboratorio, especialmente para los ensayos de susceptibilidad a los antibióticos (Uri, 1994). Además, tiene otras aplicaciones en las que destacan: el control de tensión, detección de *Escherichia coli* y bacterias coliformes, evaluación de agar Mueller-Hinton, medios de pruebas de control de calidad y pruebas de sensibilidad de disco: cefalexina, cefaloglicina, cefaloridina, ceflomocina, gentamicina, tetraciclina, entre otros.

### **3.2.7 VIDA UTIL**

#### **3.2.7.1 Definición**

La aptitud para el consumo de un alimento no solo comprende el estado higiénico-sanitario del alimento, sino también el valor nutricional y el sensorial. En definitiva, la calidad, entendida como la adecuación del producto al uso o consumo a que va destinado según la percepción subjetiva del consumidor (Hernández et al, 1999). Bajo esta percepción distintos autores han definido el concepto de vida útil de la siguiente manera:

Para Hernández et al (1999), la durabilidad o vida útil, es el periodo entre la elaboración y la compra al detalle de un producto alimenticio, durante el cual dicho producto mantiene una calidad satisfactoria. Otra definición del mismo autor sería el tiempo durante el almacenamiento en el que el producto mantiene su aptitud para el consumo.

Para Cantillo et al, citado por Novoa y López (2008), la vida útil de un alimento es el tiempo durante el cual este conserva su integridad nutritiva, sus características organolépticas y su calidad microbiológica.

Finalmente, podemos definir a la vida útil del alimento, como el momento en que uno o varios atributos de calidad se ven alterados como consecuencia del paso del tiempo, de las condiciones de manipulación y de almacenamiento posteriores a su elaboración, y que limite su aceptabilidad o implique un riesgo para la salud del consumidor.

### **3.2.7.2 Evaluación de la vida útil de un alimento**

Los estudios de vida útil son importantes para definir la duración de los alimentos, siendo necesario para no sub o sobre dimensionar el tiempo que realmente dura el producto (Valencia et al, 2008).

Para poder evaluar el tiempo de vida útil será necesario definir un indicador de calidad. Este indicador varía en función del tiempo y puede ser medido a través de pruebas físico-químicas (rancidez, oxidación), biológicas (incremento de microorganismos) y/o pruebas sensoriales del alimento (cambios de olor, color, y textura).

El estudio de vida útil se basa en la evaluación de la calidad del indicador en función del tiempo. El tiempo que demora el indicador al llegar al límite crítico es lo que se conoce como tiempo de vida útil. Pasado ese tiempo el alimento se le considera deteriorado o no apto para el consumo. El

indicador y su límite crítico dependen de la naturaleza y composición del alimento y la normativa sanitaria vigente.

Novoa y López (2008), evaluó la vida útil del queso doble crema con dos niveles de grasa, mediante pruebas sensoriales, basándose no en el deterioro del producto, sino sobre el rechazo del consumidor hacia el producto, ya que la calidad del producto cambia durante su almacenamiento dependiendo del contenido de grasa, la cual tiene un papel importante en el desarrollo del sabor, aroma y textura durante el almacenamiento, que pueden llevar a cambios en el grado de aceptabilidad y por lo tanto su vida útil se puede afectar.

En el caso de productos perecederos, como el queso fresco, un producto fresco, de corta vida útil, el cual proporciona las condiciones óptimas de crecimiento bacteriano, se realiza la evaluación de su vida útil basado en su calidad higiénico-sanitaria. En este tipo de alimentos las pruebas sensoriales pueden llevar a un tiempo de vida útil errado, puesto que sensorialmente puede ser apto, pero la calidad sanitaria puede implicar un riesgo para el consumidor. Lo mismo sería si se consideraría como indicador al contenido de grasa para evaluar su vida útil, ya que su contenido de grasa no se ve alterado en gran medida por las condiciones de almacenamiento y por qué no posee proceso de maduración en la cual sí existen fenómenos como la lipólisis, cuya descomposición de la materia



grasa generaría un cambio en la calidad del producto. Entonces, el estudio de la vida útil del queso fresco se basa en el tiempo en la cual se supera el recuento de células bacterianas permitida por la norma sanitaria vigente.

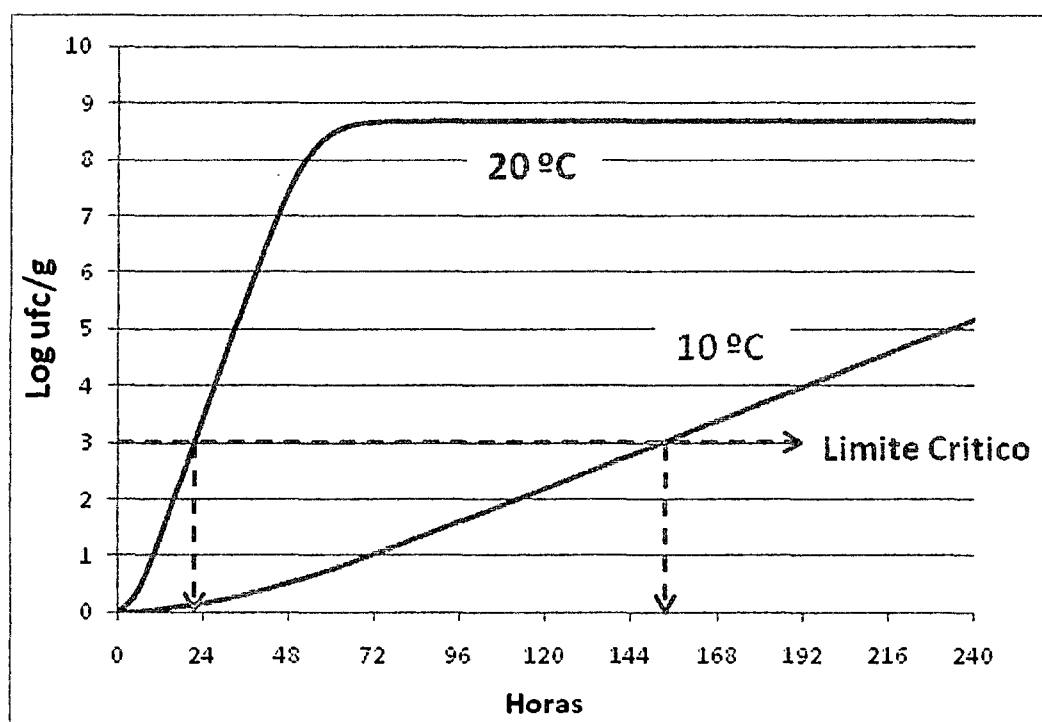
Grisius *et al*, y Hough *et al*, citados por López Orozco (2004), consideran además de los diversos factores que intervienen en la evaluación de la vida de anaquel en productos lácteos, a la cuenta microbiológica como un índice definitivo para determinar el tiempo de vida de anaquel final en estos productos.

En la figura N°5, se muestra un ejemplo para determinar la vida útil de un alimento que contiene 2% de NaCl, pH 6.2 y dos temperaturas de almacenamiento (10 y 20 °C), los crecimientos bacterianos fueron simulados con el ComBase Predictor (2010), tomando como indicador microbiológico las células *E. coli* presentes en el alimento, cuyo límite crítico considerado sería un recuento de  $10^3$  Ufc/g.

En esta simulación se puede observar que el tiempo de vida útil del alimento se determina trazando una perpendicular a las abscisas (Tiempo), desde el punto de intercepción de la curva de crecimiento y el límite crítico establecido. El crecimiento del *E. coli* a 20 °C determinó un tiempo de vida útil menor a 24 horas, mientras que el crecimiento del *E.*

*coli* a 10 °C permitió un tiempo de vida útil de 150 horas. Este ejemplo nos muestra que la temperatura de almacenamiento es fundamental para inhibir el crecimiento bacteriano y en particular para el *E. coli*.

**Figura N°5 Simulación de la estimación de la vida útil del queso fresco a determinadas condiciones de almacenamiento.**



Fuente: ComBase Predictor, 2010 (Versión en línea).

## **CAPITULO IV**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **A. LUGAR DE EJECUCIÓN**

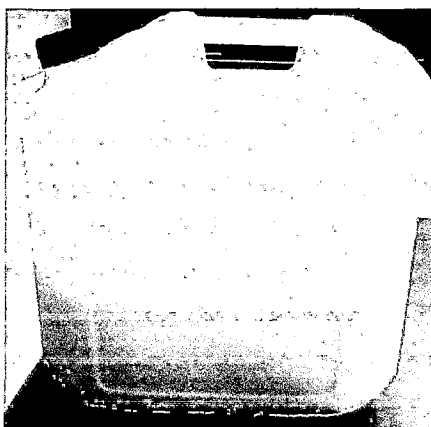
La presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Experimental Tecnológico de la Universidad Nacional del Callao (CET). La elaboración de los quesos frescos experimentales se realizó con técnicas artesanales, llevándose a cabo en la planta piloto del CET. Asimismo los análisis fisicoquímicos y microbiológicos necesarios para la realización de este trabajo, se efectuaron en los laboratorios de análisis microbiológicos y en el laboratorio de análisis químico del CET, entre los meses de enero y agosto del 2010.

#### **B. MATERIA PRIMA E INSUMOS**

##### **B.1 Materia prima**

La leche fresca de vaca fue adquirida del Establo Lima-Norte, ubicada en la Av. Chacra cerro S/N Carabaylo, el cual posee las instalaciones adecuadas de ordeño semiautomático, realizándose el ordeño dos veces al día (4 am y 5 pm). Posterior al ordeño la leche se mantuvo en un

depósito de almacenamiento refrigerado de acero inoxidable hasta el momento de su venta. El transporte de la leche al centro de producción fue en una galonera de capacidad 20 Litros, cuyo material fue polipropileno A/D blanco de primer uso (plástico virgen).



**Figura N° 6 Galonera para el transporte de la leche**

## **B.2 Cepas Experimentales**

El cepario de *Lactobacillus casei* ATCC 393™ y *Escherichia coli* ATCC 25922™, fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología de LA MOLINA CALIDAD TOTAL.

## **B.3 Insumos para la elaboración del queso fresco**

- Cuajo Marschall L75, marca DANISCO.
- Cloruro de calcio p.a. JM. Chemical.

- Sal común.

## **C. MATERIALES Y EQUIPOS**

### **C.1 Materiales**

- Matraces de 250 ml
- Pipetas de 1 y 10 ml.
- Probetas de 100 ml
- Placas Petri
- Bureta de 25 ml
- Vaso precipitado de 50 ml
- Luna de reloj
- Espátula de acero inoxidable
- Tubos de ensayo de 150 mm x 20 mm
- Bolsas estériles para Homogenizador Stomacher®

### **C.2 Equipos**

- Estufa esterilizadora, marca Memmert 20 °C a 250 °C (Alemania).
- Estufa incubadora, marca Memmert 20 °C a 50°C (Alemania).
- Equipo de Baño Maria, marca Memmert 20 °C a 120°C (Alemania).
- Balanza analítica, marca Ohaus modelo adventurer (USA).

- Contador de colonias tipo "Quebec", marca Karl Kolb (Alemania).
- Refrigeradora, marca Faeda.
- Homogenizador Stomacher® Mod.400 (Alemania).
- Potenciómetro, marca VWR Scientific Mod.8025 (Alemania)

### **C.3 Reactivos/Medios de Cultivo**

- Agua Peptonada Tamponada, Merck.
- Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS), Difco™.
- Agar Mac Conkey, Merck.
- Caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS), Britania®.
- Caldo Maltosa, Merck.
- Hidróxido de Sodio (NaOH). J.M Chemical.
- Alcohol Etilico comercial de ° 70.

### **4.1 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

La presente investigación se caracterizó por ser longitudinal estudiando la variable a lo largo del tiempo establecido, por ser éste el determinante en la relación causa efecto. Según el análisis y alcance de los resultados fue de tipo Experimental porque permitió manipular el factor causal para determinar el efecto deseado. Además fue Aplicada porque el fin de este

proyecto fue resolver un problema de naturaleza práctica permitiendo aplicar los resultados.

La investigación tuvo un diseño experimental, donde se estudiaron un grupo control y 3 tratamientos con 3 repeticiones cada una. Las variables estudiadas fueron la concentración (ufc/mL) de *Lactobacillus casei* ATCC 393™ y su efecto inhibitorio frente al crecimiento de las ufc/g de *Escherichia coli*.

Cada iteración se realizó cada 24 horas y quedó determinado el diseño de la investigación de la siguiente manera:

**Grupo control (C):** Queso fresco experimental, inoculado con *Escherichia coli* a una concentración de  $10^3$  ufc/mL

**Tratamiento Experimental 1 (T1):** Queso fresco experimental, inoculado con *Escherichia coli* a una concentración de  $10^3$  ufc/mL y con *Lactobacillus casei* ATCC 393™ a una concentración de  $10^3$  ufc/mL

**Tratamiento Experimental 2 (T2):** Queso fresco experimental, inoculado con *Escherichia coli* a una concentración de  $10^3$  ufc/mL y con *Lactobacillus casei* ATCC 393™ a una concentración de  $10^6$  ufc/mL

**Tratamiento Experimental 3 (T3):** Queso fresco experimental, inoculado con *Escherichia coli* a una concentración de  $10^3$  ufc/mL y con *Lactobacillus casei* ATCC 393™ a una concentración de  $10^9$  ufc/mL

**(\*)Vida útil del queso fresco:** Independiente de este diseño se elaboraron quesos frescos mediante técnicas artesanales, sin conservantes y sin inoculación de bacterias iniciadoras, ni experimentales. Estos quesos permitieron la estimación de su vida útil, en nuestras condiciones experimentales.

## 4.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

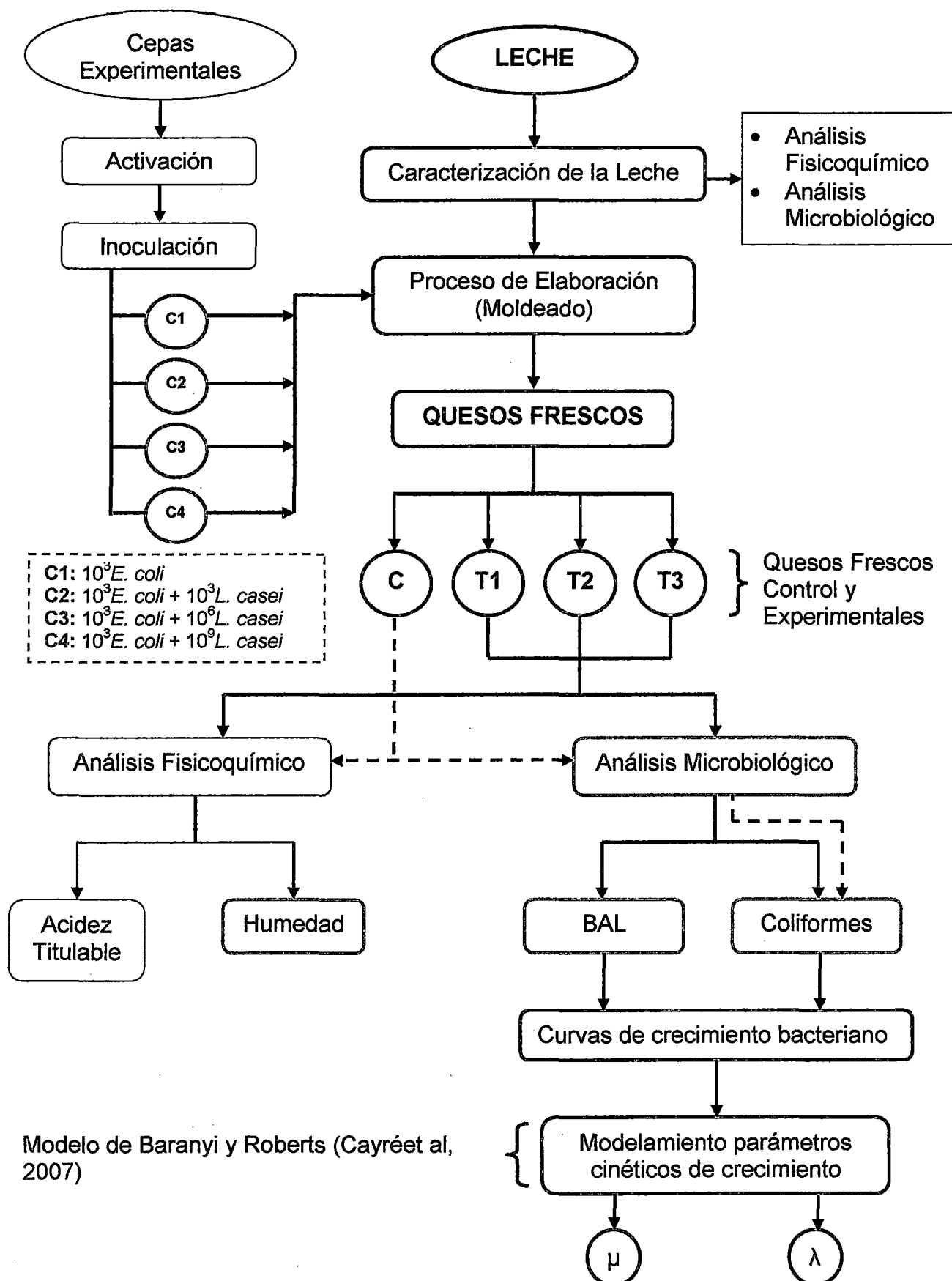
Los quesos frescos experimentales fueron elaborados e inoculados con las bacterias experimentales de acuerdo al diseño experimental, de los cuales se realizó un muestreo diariamente, la cual permitió su análisis correspondiente. El periodo de análisis fue de 10 días considerando el día de producción (día 0)

Posterior a su elaboración y al muestreo, el producto se mantuvo almacenado en refrigeración a una temperatura de  $8 \pm 2$  °C durante 10 días.

En la Figura N° 7 se esquematiza la secuencia del trabajo experimental.



Figura N° 7 Diseño experimental del estudio



## 4.3 METODOS DE ANALISIS

### 4.3.1 LECHE FRESCA

#### 4.3.1.1 Análisis Fisicoquímico

##### a. Determinación de pH (NMX-F-317-S: 1978)

La determinación de pH se realizó mediante un potenciómetro VWR Scientific. El cual se calibro con soluciones buffer de pH 7.01 y 4.01 a temperatura ambiente. Para la medición, se colocó una muestra de 20 ml en un vaso de precipitación de 50 ml. El electrodo del potenciómetro, previamente calibrado, se introdujo en la muestra por varios segundos, hasta que se estabilizó la lectura de pH en la pantalla.

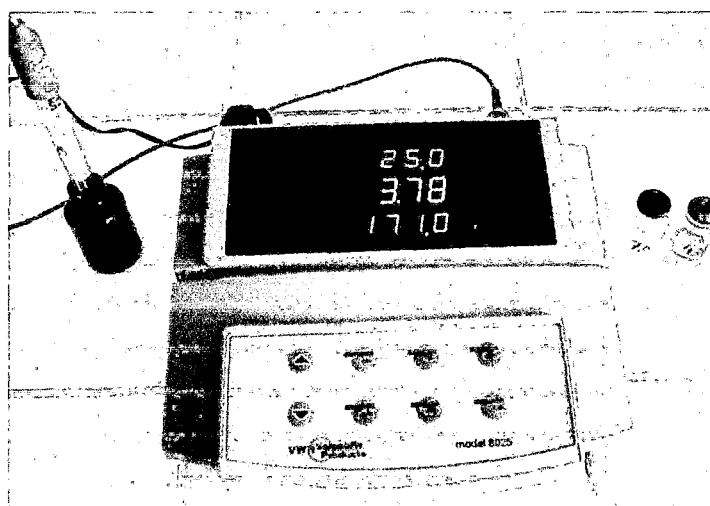
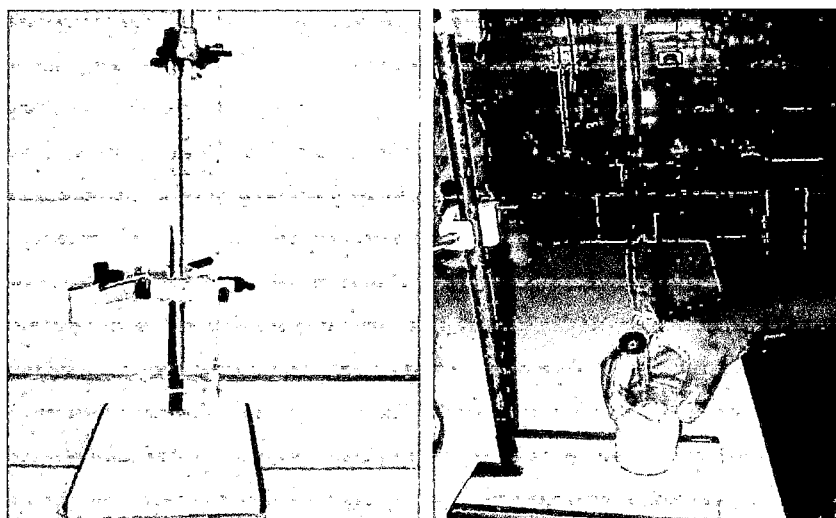


Figura N° 8 Equipo de Medición de pH

**b. Determinación de Acidez Titulable (AOAC 947.05:1998)**

Se colocó 20 ml de muestra de leche en un vaso precipitado de 250 ml, diluyéndose con agua destilada libre de  $\text{CO}_2$  al doble de su volumen. Se agrego tres gotas del indicador fenolftaleína al 1% y se procedió a titular con NaOH al 0.1N hasta obtener una coloración rosa muy tenue que se mantuvo por 30 segundos. Se reportó la acidez expresada en % de ácido láctico (1 mL NaOH 0.1N = 0.0090 g de ácido láctico).

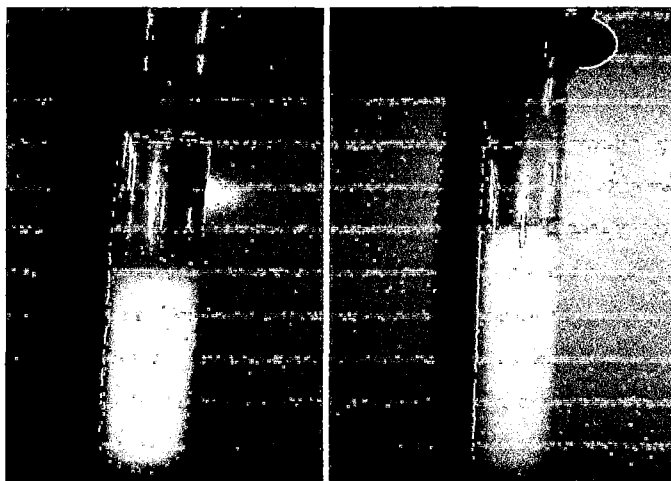


**Figura Nº 9 Titulación de la Leche**

**c. Prueba de estabilidad frente al alcohol (NTP 202.030:1998)**

Se colocó en un tubo de ensayo partes iguales de leche y alcohol etílico (68-70 %), se mezcló invirtiendo el tubo una o dos veces y sin agitar. Los

resultados se reportaron como positivos o negativos, siendo positivos si había presentado coagulación de la leche.



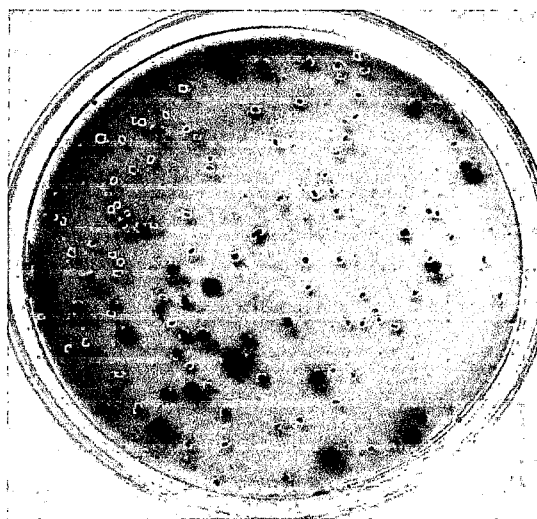
**Figura N° 10 Prueba de estabilidad frente al alcohol**

#### **4.3.1.2 Análisis Microbiológico**

##### **a. Recuento de Coliformes Totales (Páez, 2009)**

El recuento de coliformes totales se realizó mediante la técnica de recuento en placa por siembra en profundidad en Agar Mac Conkey. Para ello se tomó 10 mL de muestra y se colocó en un matraz de 250 mL, a la cual se le adicionó 90 mL de diluyente (agua Peptonada al 1%), se agitó la mezcla y se consideró la primera dilución, la cual permitió realizar las diluciones seriadas necesarias. Para la siembra se inoculó 1mL de cada dilución en una placa Petri estéril, adicionándose 12-15 ml de Agar Mac

Conkey, se procedió a homogenizar con movimientos circulares y en forma de numero 8. Luego de solidificado el agar, se incubó a 35 °C por 24 horas. El recuento se realizó con ayuda de un contador de colonias tipo "Quebec". Los resultados se expresaron en Ufc/mL.



**Figura N° 11 Colonias coliformes en Agar Mac Conkey**

#### **4.3.2 QUESO FRESCO EXPERIMENTAL**

##### **4.3.2.1 Análisis Fisicoquímico**

###### **a. Determinación de Acidez Titulable (AOAC 920.124:1998)**

A 10 g de muestra triturada se le adicionó agua destilada a 40 °C hasta el volumen de 105 ml, se homogenizó con la ayuda de un homogenizador

Stomacher® 400, por un tiempo de trabajo de 3-5 min, seguidamente se procedió a filtrar la mezcla homogénea. Se tomó una alícuota de 25 mL de la porción filtrada, la cual representó 2.5 g de muestra. Se procedió a titular la alícuota con NaOH 0.1 N, usando fenolftaleína como indicador. Los resultados se expresaron como % de ácido láctico (1 mL de NaOH = 0.0090 g ácido láctico).

**b. Determinación de Humedad (AOAC 948.12:1998)**

Se pesó 2-3 g de muestra triturada, en una placa para humedad con tapa. Se secó parcialmente con baño de vapor con la tapa destapada por un periodo de 15 min. Posteriormente se colocó la placa destapada en una estufa graduada a  $130 \pm 1$  °C por un periodo de 75 min. Finalizado el tiempo se tapó, se dejó enfriar en una campana desecadora y se pesó. El porcentaje de humedad se determinó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{W1-W2}{W1} \times 100\%$$

Donde:

W1: Peso de la muestra húmeda (Peso inicial)

W2: Peso de la muestra seca (Peso final)

#### 4.3.2.2 Análisis Microbiológico

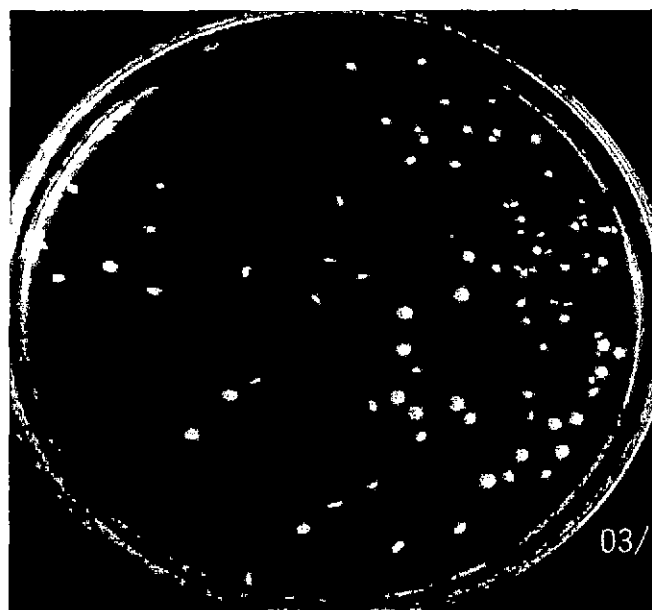
##### a. Recuento de *Escherichia coli* (Fangio et al, 2007)

Se pesó 10 g de muestra, la cual permitió el recuento de coliformes totales mediante la técnica de recuento en placa por siembra en profundidad en Agar Mac Conkey. Para ello se colocó la muestra y 90 mL de diluyente (Agua Peptonada) en una bolsa estéril y se procedió a homogenizar por 5-8 min en un homogenizador Stomacher® 400. La muestra ya homogénea se vertió aun matraz de 250 mL, representando la primera dilución, de la cual se realizaron las diluciones seriadas necesarias. Para la siembra se tomó 1 mL de cada dilución y se inoculó en una placa Petri estéril, incorporándose 12-15 mL de Agar Mac Conkey temperado a 40 °C, se homogenizó con movimientos circulares y en forma del numero 8. Las placas ya solidificadas fueron incubadas a 37 °C por 18-24 horas. Concluido el periodo de incubación se realizó la lectura con un contador de colonias tipo "Quebec". Los resultados fueron expresados en ufc/g.

##### b. Recuento de *Lactobacillus casei* (Ramírez et al, 2005)

Se pesó 10 g de muestra, la cual permitió el recuento de las bacterias ácido-lácticas (BAL) presentes en la muestra, mediante la técnica de

recuento en placa por siembra en profundidad en Agar MRS. Para ello se colocó la muestra y 90 mL de diluyente (Agua Peptonada) en una bolsa estéril y se procedió a homogenizar por 5-8 min en un homogenizador Stomacher® 400. La muestra ya homogénea se vertió aun matraz de 250 mL, representando la primera dilución, de la cual se realizaron las diluciones seriadas necesarias. Para la siembra se tomó 1 mL de cada dilución y se inoculó en una placa Petri estéril, incorporándose 12-15 mL de Agar MRS temperado a 40 °C, se homogenizó con movimientos circulares y en forma del numero 8. Las placas ya solidificadas fueron incubadas a 37 °C por 24 – 48 horas. Concluido el periodo de incubación se realizó la lectura con un contador de colonias tipo “Quebec”. Los resultados fueron expresados en ufc/g.



**Figura N° 12 Colonias de *Lactobacillus casei* en Agar MRS**



## **4.4 METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION**

### **4.4.1 ANALISIS DE LA MATERIA PRIMA**

Una vez recepcionada la leche se tomó una muestra de 200 ml que permitió la realización de las pruebas que determinó la calidad sanitaria y físico-química de la materia prima, considerándose los análisis descritos en el Apartado 4.3.1.

### **4.4.2 ACTIVACION DE LAS CEPAS EXPERIMENTALES**

La cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922™ y *Lactobacillus casei* ATCC 393™, se activaron previamente a la elaboración del queso y se realizó a partir de un cepario almacenado en refrigeración a 5-8°C, para lo cual se tomó una muestra o inoculó para cultivarlos en un tubo de ensayo de 180 mm x 20 mm con caldo Maltosa y Caldo MRS respectivamente, procediéndose a incubar a 37 °C por 24 horas. Luego se procedió a sembrarlos en placas Petri con Agar Mac Conkey y Agar MRS respectivamente, mediante el método de siembra por estrías con la finalidad de obtener colonias aisladas. Las placas sembradas con Agar Mac Conkey se incubaron a 37 °C por 18-24 horas, mientras que las placas sembradas con Agar MRS se incubaron a 37 °C por 24- 48 horas.

#### 4.4.3 INOCULACIÓN DE LAS CEPAS EXPERIMENTALES

Habiendo obtenido las colonias de *Escherichia coli* ATCC 25922™ y *Lactobacillus casei* ATCC 393™ aisladas en su Agar respectivo, se eligió de cada cepa una cantidad de colonias suficientes como para producir una densidad comparativa a la mostrada por la escala referencial de Mc Farland<sup>2</sup> (Ver Anexos). La inoculación y su densidad poblacional se realizaron de acuerdo al diseño de la investigación, habiéndose usado las escalas de Mc Farland  $10^3$ ,  $10^6$  y  $10^9$ .

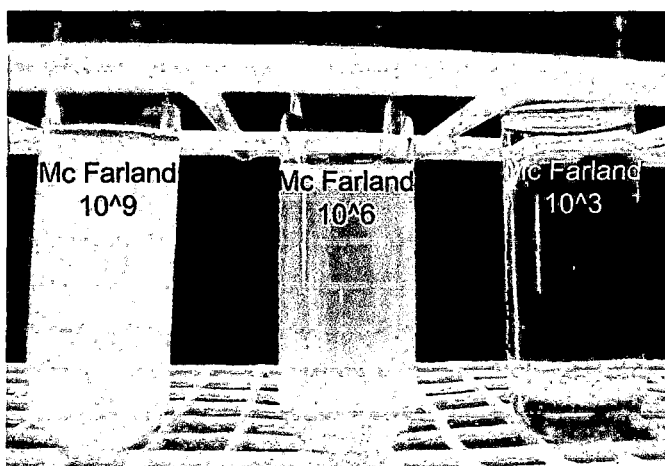


Fig. N° 13 Escalas Mc Farland utilizadas como referencia

La inoculación de las cepas experimentales se realizó durante el proceso de moldeado de la cuajada, la cual se realizó asépticamente y se realizó

---

<sup>2</sup> Patrón referencial que permite obtener una probable población inicial, la cual se corrobora mediante el recuento bacteriano en placas, posterior a la inoculación.

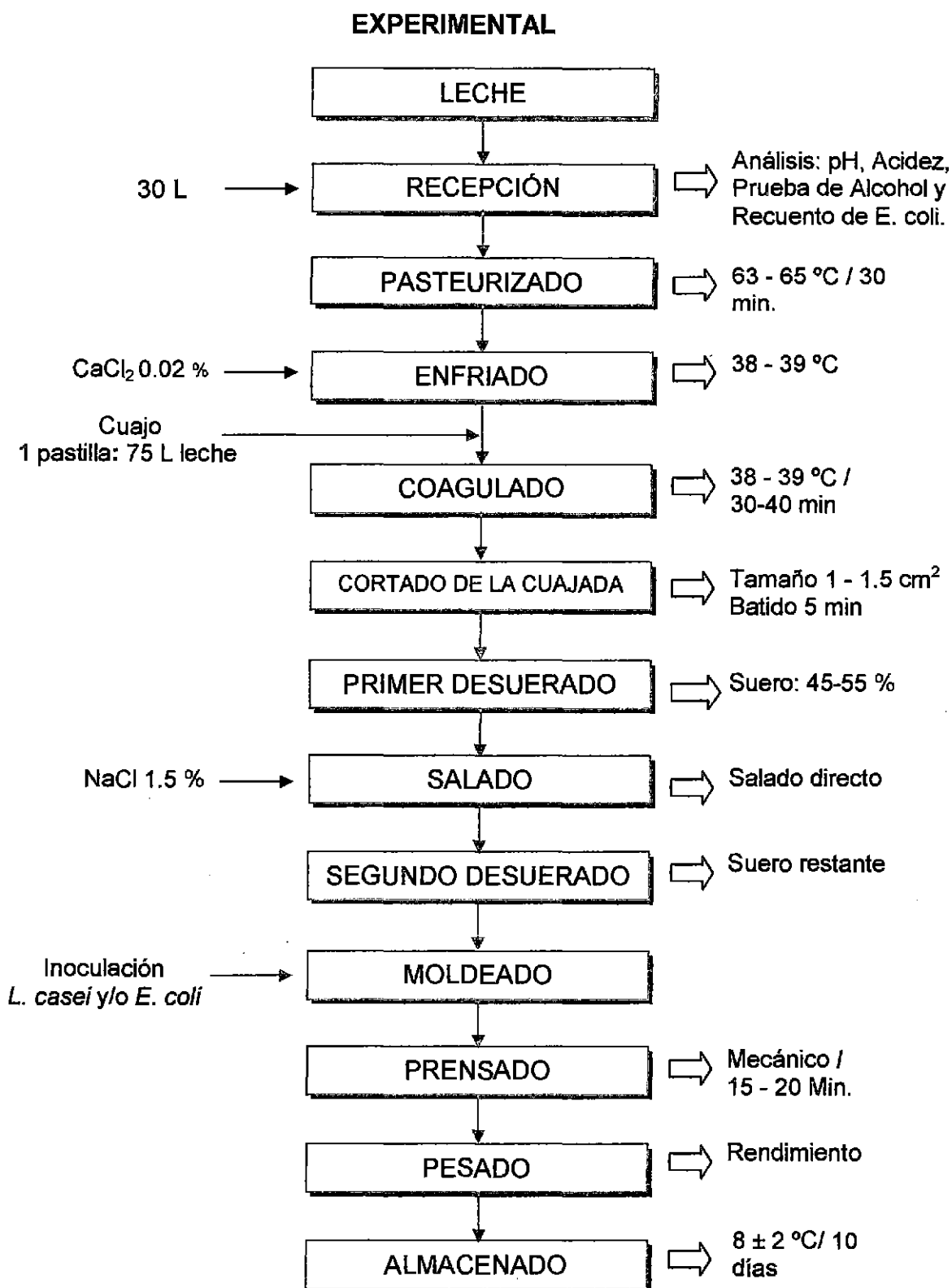
una distribución homogénea del inóculo a través de la mezcla/agitación de la cuajada.

#### **4.4.4 ELABORACION DEL QUESO FRESCO EXPERIMENTAL**

Se realizaron cinco producciones de quesos frescos experimentales mediante técnicas artesanales. Cada producción correspondía a cada grupo de estudio y para la elaboración de todos ellos, no se usó conservantes, ni cultivos iniciadores, y la variación entre cada uno de ellos estuvo determinada por la inoculación de bacterias experimentales de acuerdo al diseño de la investigación. El primer grupo de estudio correspondió al queso elaborado sin inoculación de bacterias experimentales, la cual nos permitió la estimación de su vida útil, y los cuatro grupos restantes correspondieron a los quesos elaborados con inoculación de bacterias experimentales correspondiente al diseño de la investigación.

Las etapas de elaboración se resumen en la Figura N° 14.

**Figura N° 14 DIAGRAMA DE ELABORACIÓN DEL QUESO FRESCO**



Fuente: Elaboración propia, para el presente estudio

Para garantizar la inocuidad en la elaboración del queso, se tomó como medida la esterilización de todos los materiales e insumos que se usaron en el proceso de elaboración (NaCl, CaCl<sub>2</sub>, paños, moldes de acero inoxidable, cuchillo y otros utensilios). La esterilización de estos materiales se realizó en una estufa a 150 °C por 2 horas.

#### **a. Recepción**

Se recibió 30 litros de leche fresca transportada en bidones de capacidad 20 L. Una vez medido el volumen de leche que entró a proceso, se filtró para eliminar cuerpos extraños que pudieran estar presentes en la leche. Posteriormente se tomó una muestra representativa que permitió determinar el estado de conservación de la leche (Apartado 4.3.1)

#### **b. Pasteurizado**

El pasteurizado se realizó calentando la leche a una temperatura de 63 – 65°C por 30 minutos, para eliminar los microorganismos patógenos y mantener las propiedades nutricionales de la leche.

### **c. Enfriado**

La leche pasteurizada se enfrió a una temperatura de 38-39 °C. Se agregó  $\text{CaCl}_2$  en una proporción del 0.02 % en relación a la leche. La adición de cloruro de calcio se realizó 10 min antes de la adición del cuajo.

### **d. Coagulado**

Se usó el porcentaje en peso de pastilla correspondiente para 30 L de leche (1 pastilla coagula 75 L de leche), disolviéndose previamente en agua hervida fría. Luego de la adición del cuajo se agitó la leche durante un minuto para su distribuir homogéneamente. Se dejó en reposo para que se produzca la coagulación, lo cual tomó entre 30-40 minutos, manteniendo la temperatura entre 38°C - 39 °C.

### **e. Cortado y Batido**

El corte de la cuajada se realizó de modo homogéneo, cortándose con un cuchillo estéril, en cuadrados de 1 – 2 cm de arista. Posterior al corte se batió la cuajada para favorecer a la sinéresis. La operación de corte y batido duró 10 minutos, posterior a ello se dejó reposar la masa por 5 min.

**f. Primer Desuerado**

Se realizó la separación del suero con ayuda de un utensilio previamente esterilizado (cucharón), separándose un 45-55 % del suero.

**g. Salado**

Se añadió de manera directa 1.5% de sal en relación al volumen de leche procesada, distribuyendo homogéneamente por toda la cuajada mediante agitación del suero no retirado en la etapa anterior. Se dejó reposar por 8-10 min, tiempo que permitió el ingreso de la sal a la cuajada.

**h. Segundo desuerado**

El salado favoreció la expulsión del suero del interior de la cuajada, el cual permitió retirar en el segundo desuerado el 80-90 % suero existente.

**i. Moldeado**

Previamente al moldeado se inoculó las bacterias experimentales, cuyo volumen a inocular se dio a razón de 1 ml de cepa activada con una densidad poblacional determinada por el diseño experimental (Mc Farland) por cada 100 g de cuajada. Se procedió a homogenizar la

cuajada mediante agitación siendo necesario la trituración de la cuajada para alcanzar una distribución homogénea del inóculo. Posteriormente, la cuajada fue colocada en moldes de acero inoxidable estériles cubiertos con un paño estéril, siendo necesario compactar la cuajada.

#### **j. Prensado**

Uno de los fines del prensado, fue la reducción del tiempo de desuerado tradicional en quesos frescos (3-4 horas). Así mismo, la trituración de la cuajada que permitió distribuir homogéneamente el inóculo hizo necesario el prensado mecánico por un periodo de 20 min, para compactar mejor la cuajada, permitiendo dar forma definida al queso y eliminar el suero restante retenido en la cuajada.

#### **k. Pesado**

Permitió llevar registros de pesos y rendimientos por molde de queso.

#### **l. Almacenado**

Se almacenó en refrigeración, a una temperatura de  $8 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 10 días. Temperatura que permitió el crecimiento adecuado de las bacterias experimental, sin causar el deterioro fisicoquímico del producto.



#### **4.4.5 EVALUACION DE LA VIDA UTIL DEL QUESO FRESCO EXPERIMENTAL**

Se utilizó 3 moldes de quesos frescos experimentales, elaborados con técnicas artesanales, sin presencia de cultivo iniciador, ni uso de conservantes; cuyo peso aproximado fue de 1 kg, a los cuales se les practicó los análisis fisicoquímicos y microbiológicos, posteriormente fueron almacenados a dos rangos de temperaturas ( $8 \pm 2$  °C y  $22 \pm 2$  °C).

Para la estimación de la vida útil del queso fresco experimental, se consideró como indicador la presencia de coliformes totales, cuyo límite crítico fue  $10^3$  ufc/g (recuento máximo permitido por la NTS N° 071 DIGESA/MINSA).

##### **4.4.5.1 Muestreo de los quesos frescos experimentales**

La toma de muestra y análisis de la misma se realizó diariamente por un periodo de diez días. Para el muestreo se usó una espátula estéril que permitió el corte del queso manteniendo la asepsia necesaria. El pesado de la muestra se realizó en una luna de reloj estéril, muestreándose 10 g de queso fresco para el análisis microbiológico y 20 g de queso fresco para las pruebas fisicoquímicas. Luego de haber obtenido la muestra para

los análisis, el queso experimental fue almacenado a dos rangos de temperatura ( $8 \pm 2$  °C y  $22 \pm 2$  °C).

#### **4.4.5.2 Análisis microbiológico**

Luego de obtenida la muestra de 10 g destinada al análisis microbiológico, se procedió a cuantificar los coliformes totales presentes en el queso. El recuento de coliformes totales se realizó por el método de siembra en profundidad con Agar Mac Conkey (Apartado 4.3.2.2).

#### **4.4.5.3 Análisis fisicoquímico**

Una vez obtenida la muestra aproximada de 20 g de queso, esta fue triturada y homogenizada con un Stomacher® 400, procediéndose a pesar 10 g para la determinación de la acidez titulable, y lo restante permitió el pesado de muestras para la determinación de la humedad (Apartado 4.3.2.1).

#### **4.4.6 EFECTOS DEL *Lactobacillus casei* ATCC 393™ SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Escherichia coli***

El efecto que presentó la inoculación de *Lactobacillus casei* ATCC 393™ sobre el crecimiento de *Escherichia coli* presente en el queso fresco

experimental, se midió a través de sus parámetros cinéticos de crecimiento (velocidad de crecimiento y Tiempo de latencia), que se obtuvo a partir de la curva de crecimiento obtenida mediante el recuento de células presentes en el producto durante los 10 días de estudio.

El efecto inhibitorio del *Lactobacillus casei* ATCC 393™ se presentó por una reducción en el recuento poblacional de *Escherichia coli*, representada por la disminución de la velocidad de crecimiento o decrecimiento acelerado (tasa de letalidad).

Para ello se utilizó 3 moldes de quesos frescos experimentales, de peso aproximado de 1 kg por tratamiento o grupo experimental, a los cuales se le practicó los análisis fisicoquímicos y microbiológicos de acuerdo al tratamiento en estudio.

#### **4.4.6.1 Muestreo de los quesos frescos experimentales**

La toma de muestra y análisis de la misma se realizó diariamente por un periodo de diez días. Para el muestreo se usó una espátula estéril que permitió el corte del queso manteniendo la asepsia necesaria. El pesado de la muestra se realizó en una luna de reloj estéril, muestreándose 10 g de queso para el análisis microbiológico y 20 g de queso para las pruebas fisicoquímicas. Luego de haber obtenido la muestra para los análisis, el

queso fue almacenado en una refrigeradora Faeda, a una temperatura de almacenamiento de  $8 \pm 2$  °C.

#### **4.4.6.2 Análisis microbiológico**

De acuerdo al tratamiento en estudio se realizaron los recuentos de las bacterias experimentales correspondientes.

##### **a. Grupo control (C)**

Los quesos elaborados correspondientes a este grupo, presentaron únicamente la inoculación de *Escherichia coli* ATCC 25922™ a una densidad poblacional de  $10^3$  ufc/ml, realizándose el recuento del *Escherichia coli*, por el método de siembra en profundidad con Agar Mac Conkey (Apartado 4.3.2.2). Este grupo experimental nos permitió determinar la cinética de crecimiento del *Escherichia coli* teniendo como sustrato, el queso.

##### **b. Tratamiento 1 (T1)**

Los quesos experimentales correspondientes a este tratamiento, presentaron la inoculación de *Escherichia coli* ATCC 25922™ a una densidad poblacional de  $10^3$  ufc/ml y *Lactobacillus casei* ATCC 393™ a

una densidad poblacional de  $10^3$  ufc/ml, realizándose el recuento del *Escherichia coli* por el método de siembra en profundidad con Agar Mac Conkey, y el recuento de *Lactobacillus casei* se realizó por el mismo método en Agar MRS (Apartado 4.3.2.2).

#### **c. Tratamiento 2 (T2)**

Los quesos experimentales correspondientes a este tratamiento, presentaron la inoculación de *Escherichia coli* ATCC 25922™ a una densidad poblacional de  $10^3$  ufc/ml y *Lactobacillus casei* ATCC 393™ a una densidad poblacional de  $10^6$  ufc/ml, realizándose el recuento del *Escherichia coli* por el método de siembra en profundidad con Agar Mac Conkey, y el recuento de *Lactobacillus casei* se realizó por el mismo método en Agar MRS (Apartado 4.3.2.2).

#### **d. Tratamiento 3 (T3)**

Los quesos experimentales correspondientes a este tratamiento, presentaron la inoculación de *Escherichia coli* ATCC 25922™ a una densidad poblacional de  $10^3$  ufc/ml y *Lactobacillus casei* ATCC 393™ a una densidad poblacional de  $10^9$  ufc/ml, realizándose el recuento del *Escherichia coli* por el método de siembra en profundidad con Agar Mac

Conkey, y el recuento de *Lactobacillus casei* se realizó por el mismo método en Agar MRS (Apartado 4.3.2.2).

#### **4.4.6.3 Análisis fisicoquímico**

Las pruebas fisicoquímicas realizadas fue la misma para todos los grupos o tratamientos experimentales. Para ello una vez obtenida la muestra de 20 g aproximadamente de queso, se trituró y homogenizó con un Stomacher® 400, procediéndose a pesar 10 g para la determinación de la acidez titulable, y lo restante permitió el pesado de muestras para la determinación de la humedad (Apartado 4.3.2.1).

#### **4.4.7 ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS**

La existencia de efectos de las concentraciones del *Lactobacillus casei* ATCC 393™ sobre el crecimiento de *Escherichia coli* para cada concentración experimental (UFC/mL) se midió a través de sus parámetros cinéticos de crecimiento y letalidad (velocidad de crecimiento ( $\mu_{max}$ ), Tiempo de latencia ( $\lambda$ ), Crecimiento poblacional ( $C$ ), Velocidad de muerte celular o letalidad ( $-K$ ) y reducción poblacional ( $R$ )), que se obtuvo de cada concentración durante los 10 días de estudio.

La semejanza o diferencia de cada curva de crecimiento se estableció mediante el análisis de varianza ANVA, con un nivel de significancia  $p=0.05$ , utilizando las iteraciones realizadas. El procesamiento de los datos se realizó con el programa DMFit<sup>3</sup>, que permitió ajustar los parámetros cinéticos de crecimiento de las bacterias de acuerdo al modelo de crecimiento poblacional propuesto por Baranyi y Roberts (Cayré et al, 2007).

La estimación del mejor efecto significativo de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* se obtuvo por las comparaciones múltiples que son posibles con 3 unidades repetitivas para 3 tratamientos, aplicando un diseño de Tuckey. El procesamiento de los datos se realizó con el programa estadístico XLSTAT 2010, complemento para Microsoft Office Excel 2007.

---

<sup>3</sup> DMFit, Herramienta predictiva online, 2009 (ComBase-USDA)

## CAPITULO V

### RESULTADOS

El presente estudio tuvo como objetivo utilizar al *Lactobacillus casei* ATCC 393™ para controlar el crecimiento del *Escherichia coli* ATCC 25922™ presente en el queso fresco experimental elaborado con técnicas artesanales, y se obtuvo los siguientes resultados:

5.1 La leche fresca utilizada como materia prima para la elaboración de los quesos frescos experimentales, fue analizada para determinar su calidad fisicoquímica y microbiológica. Los parámetros fisicoquímicos considerados fueron la acidez, pH y su estabilidad frente al alcohol. Los valores promedios fueron: acidez  $0.1516 \pm 0.074$  g ácido láctico/100 g leche, pH  $6.63 \pm 0.11$  y no presentó coagulación frente al alcohol en todos los tratamientos (Cuadro N° 1). En relación a la calidad microbiológica de la leche se realizó el recuento de Coliformes totales (CT), teniendo como recuento promedio  $5.8 \times 10^4 \pm 1.5$  ufc/ml, valor por encima de lo requerido por la NTP 202.001. Así mismo se practicó el recuento de CT posterior al proceso de pasteurización con el fin de determinar la eficiencia del tratamiento térmico, encontrándose ausencia de CT o en su defecto se encontró valores  $\leq 10$  ufc/ml (Cuadro N° 2).



**CUADRO N° 1**

**Resultados de las pruebas de estabilidad practicas a la leche  
destinada a la elaboración de quesos frescos experimentales**

<b>Tratamiento</b>	<b>Acidez g Ác. Láctico/100 g Leche</b>	<b>pH</b>	<b>Prueba del alcohol</b>
Vida Útil (V.U)	0.1575	6.80	No coaguló
C (control)	0.1507	6.50	No coaguló
T1	0.1530	6.62	No coaguló
T2	0.1575	6.65	No coaguló
T3	0.1395	6.58	No coaguló
<b>X ± D.S</b>	<b>0.1516 ± 0.074</b>	<b>6.63 ± 0.11</b>	<b>Estable</b>

**CUADRO N° 2**

**Recuento de coliformes totales (CT) practicado a la leche cruda y  
leche pasteurizada**

<b>Tratamiento</b>	<b>Leche Cruda ufc/ml</b>	<b>Leche Pasteurizada ufc/ml</b>
Vida Útil (V.U)	$4.5 \times 10^4$	$\leq 10$
C (control)	$5.4 \times 10^4$	$\leq 10$
T1	$4.8 \times 10^4$	$\leq 10$
T2	$6.0 \times 10^4$	$\leq 10$
T3	$8.5 \times 10^4$	$\leq 10$
<b>X ± D.S</b>	<b><math>5.8 \times 10^4 \pm 1.5</math></b>	<b><math>\leq 10</math></b>

5.2 Se estimó la vida útil del queso fresco experimental, el cual fue elaborado con técnicas artesanales, sin uso de conservantes, ni cultivos iniciadores; los cuales fueron almacenados a dos rangos de temperaturas ( $8 \pm 2$  °C y  $22 \pm 2$  °C). La evaluación de la vida útil se realizó a través del recuento de los coliformes totales (CT), que permitió determinar la curva de crecimiento y sus respectivos parámetros cinéticos de crecimiento, a estos dos rangos de temperaturas. El crecimiento de los coliformes totales (CT) en los quesos experimentales almacenados a  $8 \pm 2$  °C, se manifestó posterior a las 24 horas de su elaboración, no habiéndose detectado población inicial ( $N_0 = 0$  log ufc/g). Así mismo, el crecimiento de los CT presentó un tiempo de latencia ( $\lambda$ ) de  $27.45 \pm 5.40$  horas y una velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{M\acute{a}x}$ ) de  $0.06 \pm 0.01$  log ufc.g<sup>-1</sup>/hora, alcanzando una población máxima ( $N_{M\acute{a}x}$ ) de  $5.83 \pm 0.22$  log ufc/g. Por otro lado, el crecimiento de los coliformes totales (CT) en los quesos experimentales almacenados a  $22 \pm 2$  °C, se inició con una población ( $N_0$ ) de 0 log ufc/g, presentando un tiempo de latencia ( $\lambda$ ) de  $3.88 \pm 1.23$  horas y una máxima velocidad de crecimiento ( $\mu_{M\acute{a}x}$ ) de  $0.09 \pm 0.01$  log ufc.g<sup>-1</sup>/hora, alcanzando una población máxima ( $N_{M\acute{a}x}$ ) de  $9.59 \pm 0.33$  log ufc/g (Cuadro N° 3, Grafica N° 1).

### CUADRO N° 3

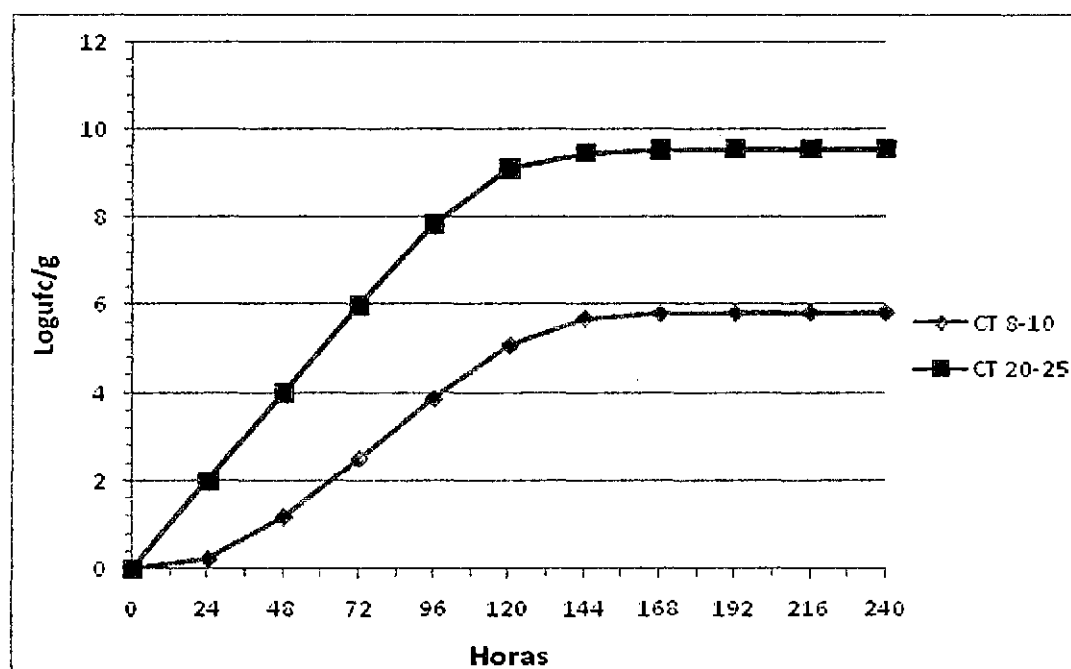
Parámetros cinéticos promedios del crecimiento de coliformes totales (CT) en quesos experimentales, almacenados a dos rangos de temperaturas:  $8 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $22 \pm 2^\circ\text{C}$

Parámetro	$8 \pm 2^\circ\text{C}$	$22 \pm 2^\circ\text{C}$
No [log ufc/g]	$0.00^a \pm 0.00$	$0.00^a \pm 0.00$
$N_{\text{Máx}}$ [log ufc/g]	$5.83^a \pm 0.22$	$9.59^b \pm 0.33$
$\mu_{\text{Máx}}$ [(log ufc/g)/horas]	$0.06^a \pm 0.01$	$0.09^b \pm 0.01$
$\lambda$ [horas]	$27.45^a \pm 5.40$	$3.88^b \pm 1.23$

Superíndices diferentes en una misma fila indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

### GRAFICA N° 1

Curvas de crecimiento promedio de coliformes totales (CT) del queso experimental, almacenado a dos rangos de temperaturas:  $8 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $22 \pm 2^\circ\text{C}$



La comparación de los parámetros cinéticos de crecimiento de los CT obtenidos a dos rangos de temperaturas ( $8 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) presentó diferencias estadísticamente significativas  $P_{0.05} < \alpha = 0.05$  (t-student para  $\mu$ :  $t_C = 4.35 > t_T = 2.92$  y para  $\lambda$ :  $t_C = 5.25 > t_T = 2.92$ ), De acuerdo a las condiciones y técnicas de elaboración del queso experimental, la temperatura es considerada como la única barrera de inhibición bacteriana, siendo esta la causante de la diferencia entre los parámetros cinéticos de crecimiento de CT de los quesos almacenados a dos rangos de temperatura.

La estimación de la vida útil del queso fresco experimental se realizó en función de la máxima población permitida por la norma sanitaria vigente (NTS N° 071 DIGESA/MINSA), cuya máximo recuento permitido de CT es  $10^3 \text{ ufc/g}$  ( $3.0 \text{ log ufc.g}^{-1}/\text{hora}$ ). Este valor crítico permitió trazar una perpendicular al punto de intercepción de la máxima población permitida y cada curva de crecimiento, permitiendo estimar los tiempos de vida útil para cada queso fresco almacenado a cada rango de temperatura (GRAFICA N° 2). De esta manera se estimó la vida útil de los quesos almacenados a  $8 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ , encontrándose un tiempo de vida útil promedio de  $78.68 \pm 4.52$  horas, mientras que la vida útil estimada para los quesos almacenados a  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  fue de  $37.09 \pm 3.70$  horas (Cuadro N° 4). La estimación de la vida útil a estos dos rangos de temperaturas presentó diferencia estadísticamente significativa  $P < 0.05$  ( $t_C = 69.22 > t_T = 2.92$ ).

### CUADRO N° 4

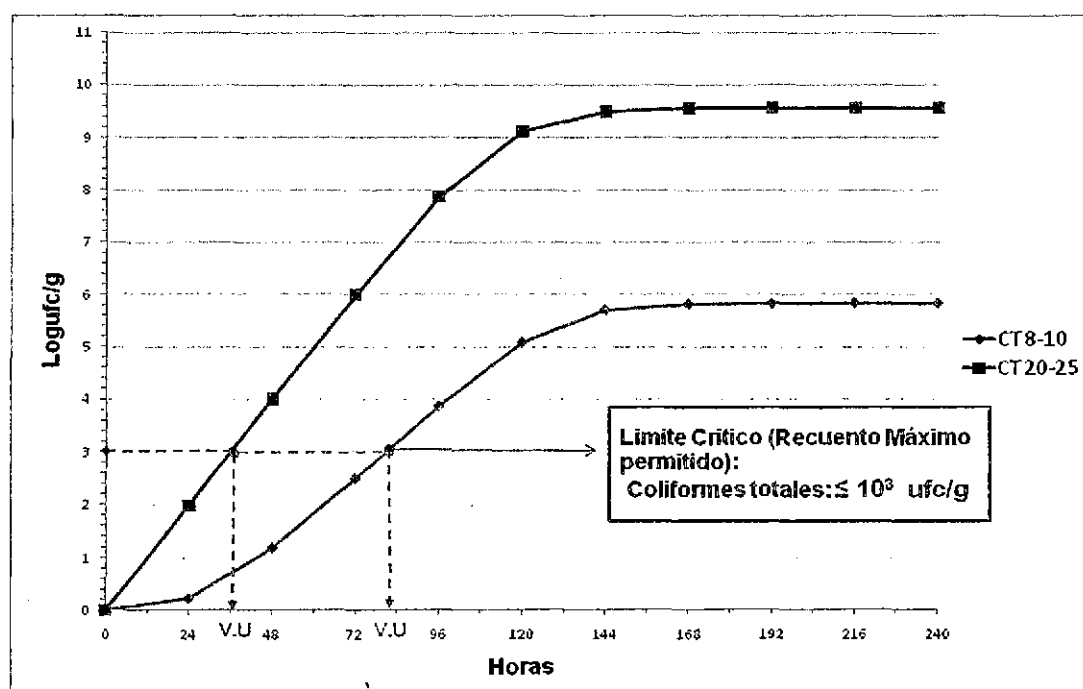
Tiempo de vida útil estimado para el queso fresco experimental almacenado a dos rangos de temperaturas:  $8 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$

Repetición	V.U a $8 \pm 2$ Horas	V.U a $22 \pm 2$ Horas
1	83.80 <sup>a</sup>	41.35 <sup>b</sup>
2	76.97 <sup>a</sup>	35.08 <sup>b</sup>
3	75.26 <sup>a</sup>	34.83 <sup>b</sup>
$X \pm D.S$	$78.68^s \pm 4.52$	$37.09^b \pm 3.70$

Superíndices diferentes en una misma fila indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

### GRAFICA N° 2

Estimación de la vida útil del queso fresco experimental almacenado a dos rangos de temperaturas:  $8 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$



Además del recuento de CT para la estimación de la vida útil del queso fresco experimental, se realizó el recuento de bacterias ácido lácticas (BAL) nativas del queso, para determinar sus parámetros cinéticos de crecimiento y el posible efecto inhibitorio de estas sobre el crecimiento de los CT que se pudieron desarrollar en el queso experimental (Cuadro 6, Grafica 3). El crecimiento de las BAL en los quesos experimentales almacenados a  $8 \pm 2$  °C se caracterizó por tener una población inicial ( $N_0$ )  $0.05 \pm 0.03$  log ufc/g, presentando un tiempo de latencia ( $\lambda$ ) de  $47.68 \pm 10.56$  horas y una velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{M\acute{a}x}$ ) de  $0.07 \pm 0.01$  log ufc.g<sup>-1</sup>/hora, alcanzando una población máxima ( $N_{M\acute{a}x}$ ) de  $9.82 \pm 0.25$  log ufc/g. Por otro lado, el crecimiento de las BAL en los quesos almacenados a  $22 \pm 2$ °C, se caracterizó por no presentar tiempo de latencia ( $\lambda$ ), tuvo una población inicial ( $N_0$ ) de  $0.08 \pm 0.04$  log ufc/g, una velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{M\acute{a}x}$ ) de  $0.071 \pm 0.004$ log ufc.g<sup>-1</sup>/hora, alcanzando una población máxima ( $N_{M\acute{a}x}$ ) de  $9.59 \pm 0.01$  log ufc/g. En la comparación de los parámetros cinéticos de crecimiento ( $N_{M\acute{a}x}$  y  $\mu_{M\acute{a}x}$ ) a estos dos rangos de temperaturas, no se encontró diferencias estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ). Se encontró diferencia estadísticamente significativa en la población inicial ( $N_0$ ) y el tiempo de latencia ( $\lambda$ ) de las BAL presentes en los quesos almacenados a estos dos rangos de temperatura  $P < 0.05$  (Para  $\lambda$ :  $t_c = 7.82 > t_T = 2.92$ ), siendo la causa de la diferencia la temperatura de almacenamiento.

Como se puede observar en la Grafica N° 3 y Grafica N° 4, el crecimiento de las BAL nativas del queso, no presentó efecto inhibitorio sobre la población de CT del queso fresco experimental, solo la temperatura de almacenamiento limitó el crecimiento de los CT presentes en el producto.

### CUADRO N° 5

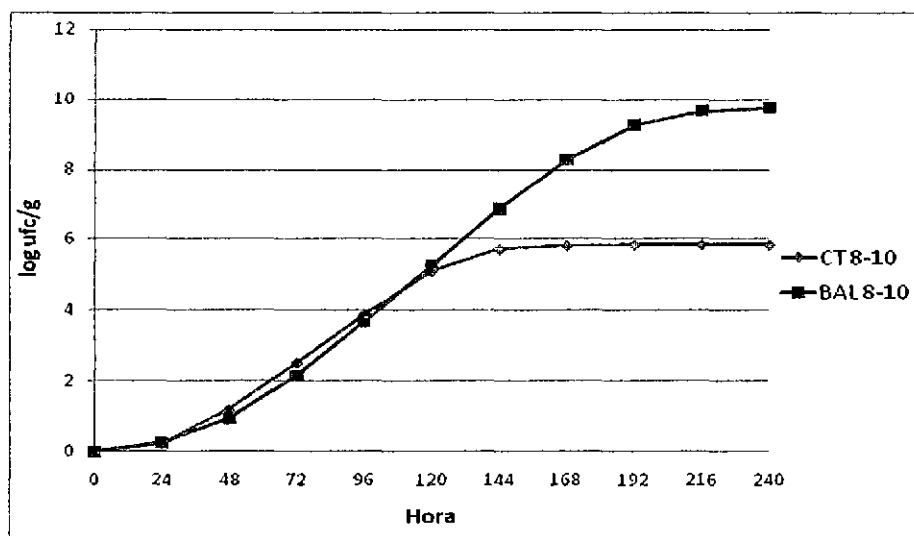
**Parámetros cinéticos de crecimiento de las Bacterias Acido Lácticas del queso experimental almacenado a  $8 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $22 \pm 2^\circ\text{C}$**

Parámetro	$8 \pm 2^\circ\text{C}$	$22 \pm 2^\circ\text{C}$
$N_o$ [log ufc/g]	$0.05^a \pm 0.03$	$0.08^a \pm 0.04$
$N_{M\acute{a}x}$ [log ufc/g]	$9.82^a \pm 0.25$	$9.59^a \pm 0.01$
$\mu_{M\acute{a}x}$ [log ufc.g <sup>-1</sup> /horas]	$0.07^a \pm 0.01$	$0.071^a \pm 0.004$
$\lambda$ [horas]	$47.68^a \pm 10.56$	$0.00^b \pm 0.00$

Superíndices diferentes en una misma fila indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

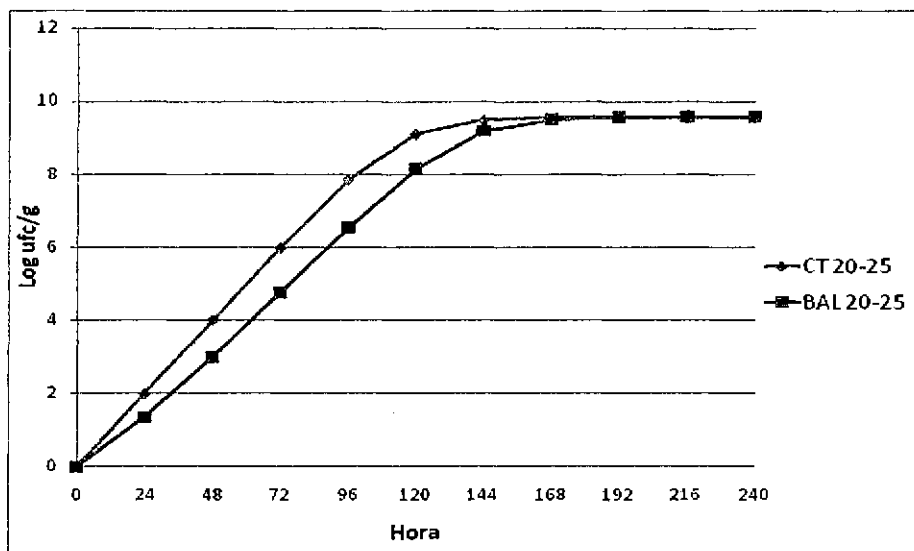
### GRAFICA N° 3

Curva de crecimiento de Coliformes Totales (CT) y Bacterias Ácido Lácticas (BAL), presentes en el queso fresco almacenado a  $8 \pm 2^\circ\text{C}$ .



### GRAFICA N° 4

Curva de crecimiento de Coliformes Totales (CT) y Bacterias Ácido Lácticas (BAL), presentes en el queso fresco almacenado a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ .





5.3 Para determinar el efecto inhibitorio de las concentraciones de *Lactobacillus casei* ATCC 393™ sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, inicialmente se determinó la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* (EC) en queso fresco experimental, para ello se inoculó una población de  $10^3$  ufc/ml tomando como referencia la escala de Mc Farland (C: Grupo control). El queso fresco experimental elaborado se mantuvo en refrigeración a  $8 \pm 2$  °C durante los 10 días de experimentación. La Grafica N° 5, muestra la curva promedio de crecimiento de EC presente en el queso experimental, cuyo parámetros cinéticos de crecimientos promedios fueron los siguientes: población inicial ( $N_0$ )  $2.256 \pm 0.198$  log ufc/g, tiempo de latencia ( $\lambda$ )  $21.97 \pm 4.19$  horas y la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu$ )  $0.054 \pm 0.005$  log ufc.g<sup>-1</sup>/hora, alcanzando una población máxima ( $N_{Max}$ ) de  $5.70 \pm 0.21$  log ufc/g (Cuadro N° 6).

### CUADRO N° 6

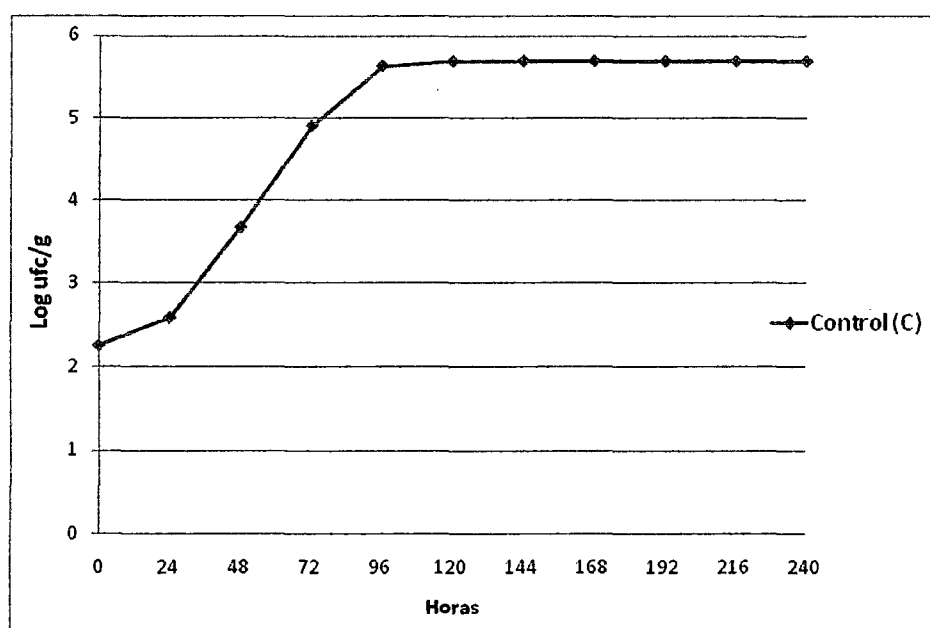
**Parámetros cinéticos de crecimiento del *Escherichia coli* (EC) en el queso fresco experimental (Grupo control: C)**

Parámetro	Media	Desviación Estándar
$N_0$ [log Ufc/g]	2.256	0.198
$N_{Max}$ [log Ufc/g]	5.70	0.21
$\mu_{Max}$ [log ufc.g <sup>-1</sup> /horas]	0.054	0.005
$\lambda$ [horas]	21.97	4.19
C [log ufc/g] (*)	3.45	0.16

(\*) Crecimiento poblacional, en la fase de crecimiento ( $C = N_{Max} - N_0$ )

### GRAFICA N° 5

Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* (EC) inoculado en el queso fresco experimental (Grupo control: C)

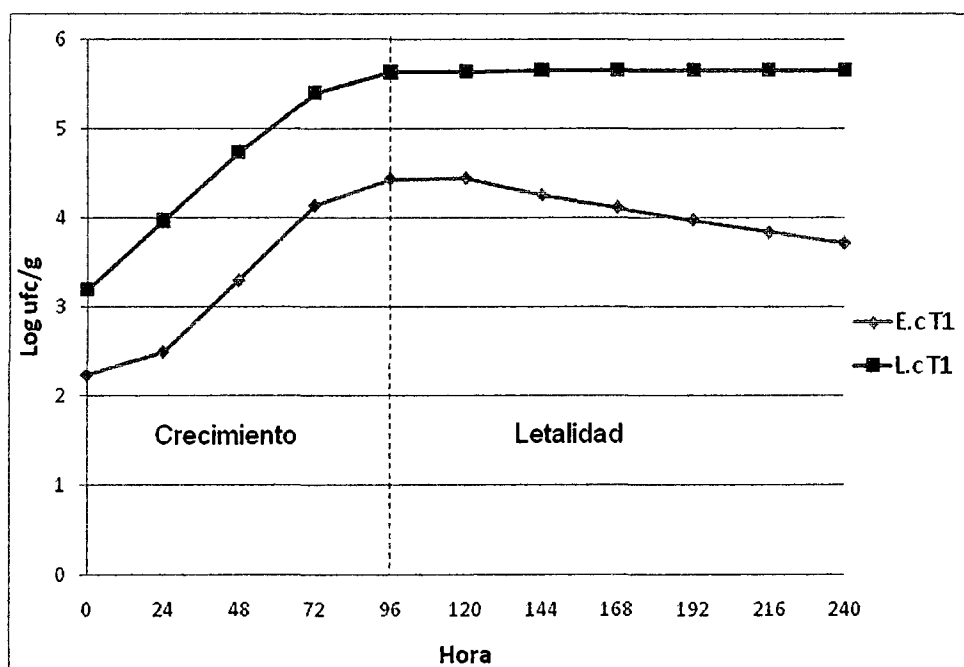


5.4 Se midió el efecto inhibitorio de una población de  $10^3$  ufc/ml de *Lactobacillus casei* ATCC 393™ sobre el crecimiento de una población de  $10^3$  ufc/ml de *Escherichia coli* (EC), inoculados conjuntamente al queso fresco experimental (Tratamiento 1). Para determinar el efecto de la población inoculada de *Lactobacillus casei* (LC), se consideró el comportamiento de la curva de crecimiento y los parámetros cinéticos de crecimiento alcanzados en el desarrollo del EC. Dichos valores promedios fueron los siguientes: población inicial ( $N_0$ )  $2.26 \pm 0.32$  log ufc/g; tiempo de latencia ( $\lambda$ )  $23.61 \pm 7.28$  horas y la velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{Max}$ )  $0.041 \pm 0.004$  log ufc.g<sup>-1</sup>/hora. Esta velocidad permitió que la

población máxima ( $N_{Max}$ ) de  $4.44 \pm 0.17$  log ufc/g se alcance a las 96 horas, momento en el cual empieza una reducción poblacional a razón de  $-0.007 \pm 0.001$  log ufc.g<sup>-1</sup>/hora, que permitió reducir la población máxima en  $0.67 \pm 0.09$  log ufc/g, en un periodo de 144 horas (Grafica N° 6). Así mismo, el crecimiento del *Lactobacillus casei* (LC) se caracterizó por no presentar tiempo de latencia, iniciando su crecimiento con una población ( $N_0$ ) de  $3.20 \pm 0.09$  log ufc/g, su máxima velocidad de crecimiento ( $\mu_{Max}$ ) fue  $0.033 \pm 0.003$  log ufc.g<sup>-1</sup>/hora, lo cual permitió se logre una población máxima ( $N_{Max}$ ) de  $5.65 \pm 0.07$  log ufc/g (Cuadro N° 7).

#### GRAFICA N° 6

**Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* (EC) y *Lactobacillus casei* (LC), inoculados en el queso fresco experimental (Tratamiento 1)**



## CUADRO N° 7

Parámetros cinéticos de crecimiento y letalidad del *Escherichia coli*  
(EC) y *Lactobacillus casei* (LC) en el queso fresco experimental  
(Tratamiento 1)

Crecimiento	EC	LC
$N_0$ [log Ufc/g]	$2.26^a \pm 0.32$	$3.20^b \pm 0.09$
$N_{Max}$ [log Ufc/g]	$4.44^a \pm 0.17$	$5.65^b \pm 0.07$
$\mu_{Max}$ [log ufc.g <sup>-1</sup> /horas]	$0.041^a \pm 0.004$	$0.033^a \pm 0.003$
$\lambda$ [horas]	$23.61^a \pm 7.28$	$0.00^b \pm 0.00$
C [log ufc/g]	$2.18^a \pm 0.23$	$2.46^a \pm 0.07$
Letalidad		
- K [log ufc.g <sup>-1</sup> /horas] (*)	$-0.007 \pm 0.001$	-
$N_f$ [log ufc/g]	$3.71 \pm 0.14$	-
R [log ufc/g] (**)	$0.67 \pm 0.09$	-

Superíndices diferentes en una misma fila indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

(\*) Velocidad máxima de letalidad o muerte celular, en la fase de declive.

(\*\*) Reducción poblacional, en la fase de declive ( $R = N_{Max} - N_f$ ).

5.5 Se midió el efecto inhibitorio de una población de  $10^6$  ufc/ml *Lactobacillus casei* ATCC 393™ sobre el crecimiento de una población de  $10^3$  ufc/ml de *Escherichia coli* (EC), inoculados conjuntamente al queso fresco experimental (Tratamiento 2). Para determinar el efecto de la población inoculada de *Lactobacillus casei* (LC), se consideró el comportamiento de la curva de crecimiento y los parámetros cinéticos de crecimiento alcanzados en el desarrollo del EC. Dichos valores promedios fueron los siguientes: población inicial ( $N_0$ )  $2.42 \pm 0.25$  log ufc/g; tiempo de latencia ( $\lambda$ )  $18.69 \pm 2.94$  horas y la velocidad máxima de crecimiento  $0.013 \pm 0.009$  log ufc.g<sup>-1</sup>/hora, permitió que se alcance a las 96 horas la

población máxima ( $N_{Max}$ ) de  $3.04 \pm 0.09$  log ufc/g. El crecimiento de EC presentó una reducción poblacional a partir de las 96 horas de experimentación, a razón de  $-0.005 \pm 0.002$  log ufc.g<sup>-1</sup>/hora, que permitió reducir la población máxima en  $0.65 \pm 0.12$  log ufc/g, en un periodo de 144 horas (Grafica N° 7). Por otro lado, el crecimiento de *Lactobacillus casei* (LC) se inició con una población ( $N_0$ ) de  $5.66 \pm 0.21$  log ufc/g, presentando un tiempo de latencia ( $\lambda$ ) de  $51.61 \pm 7.20$  horas y la máxima velocidad de crecimiento ( $\mu_{Max}$ )  $0.059 \pm 0.004$  log ufc.g<sup>-1</sup>/hora, permitió que alcance una población máxima ( $N_{Max}$ ) de  $7.95 \pm 0.04$  log ufc/g (Cuadro N° 8).

### CUADRO N° 8

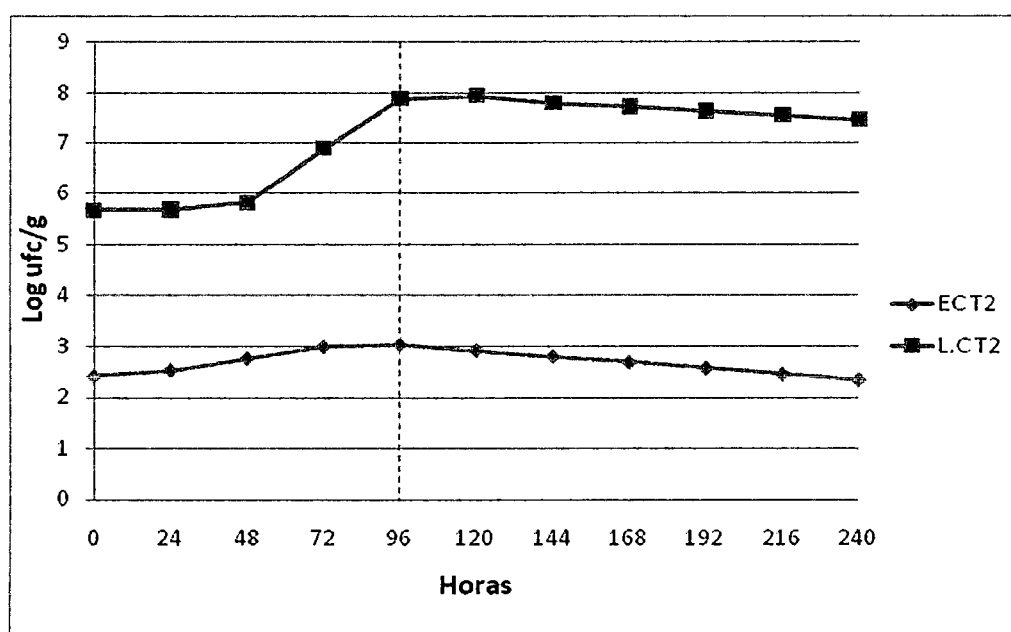
**Parámetros cinéticos de crecimiento y letalidad del *Escherichia coli* (EC) y *Lactobacillus casei* (LC) en el queso fresco experimental (Tratamiento 2)**

Crecimiento	EC	LC
$N_0$ [log ufc/g]	$2.42^a \pm 0.25$	$5.66^b \pm 0.21$
$N_{Max}$ [log ufc/g]	$3.04^a \pm 0.09$	$7.95^b \pm 0.04$
$\mu_{Max}$ [log ufc.g <sup>-1</sup> /horas]	$0.013^a \pm 0.009$	$0.059^b \pm 0.004$
$\lambda$ [horas]	$18.69^a \pm 2.94$	$51.61^b \pm 7.20$
$C$ [log ufc/g]	$0.61^a \pm 0.17$	$2.28^b \pm 0.24$
Letalidad		
$-K$ [log ufc.g <sup>-1</sup> /horas]	$-0.005^a \pm 0.002$	$-0.003^a \pm 0.001$
$N_f$ [log ufc/g]	$2.38^a \pm 0.07$	$7.47^b \pm 0.12$
$R$ [log ufc/g]	$0.65^a \pm 0.12$	$0.47^a \pm 0.15$

Superíndices diferentes en una misma fila indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

## GRAFICA N° 7

Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* (EC) y *Lactobacillus casei* (LC), inoculados en el queso fresco experimental (Tratamiento 2)



5.6 Se midió el efecto inhibitorio de una población de  $10^9$  ufc/ml *Lactobacillus casei* ATCC 393™ sobre el crecimiento de una población de  $10^3$  ufc/ml de *Escherichia coli*, inoculados conjuntamente al queso fresco experimental (Tratamiento 3). Para determinar el efecto de la población inoculada de *Lactobacillus casei* se consideró el comportamiento de la curva de crecimiento y los parámetros cinéticos de crecimiento alcanzados en el desarrollo del EC. El crecimiento del EC se inició con una población ( $N_0$ ) de  $2.53 \pm 0.19$  log ufc/g y se caracterizó por no presentar tiempo de latencia ( $\lambda=0$ ). La velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{Max}$ )  $0.017 \pm 0.002$  log ufc.g<sup>-1</sup>/hora, permitió que alcance una población

máxima ( $N_{Max}$ ) de  $3.29 \pm 0.25$  log ufc/g a las 48 horas de experimentación. El crecimiento de EC presentó una reducción poblacional a partir de las 72 horas de experimentación, a razón de  $-0.029 \pm 0.005$  log ufc.g<sup>-1</sup>/hora, que permitió reducir la población máxima en  $3.06 \pm 0.19$  log ufc/g, en un periodo de 168 horas (Grafica N° 8). Por otro lado, el crecimiento de *Lactobacillus casei* (LC) presentó una población inicial ( $N_0$ ) de  $8.49 \pm 0.12$  log ufc/g, un tiempo de latencia ( $\lambda$ ) de  $21.21 \pm 1.56$  horas y su máxima velocidad de crecimiento ( $\mu_{Max}$ )  $0.003 \pm 0.001$  log ufc.g<sup>-1</sup>/hora, permitió que se logre una población máxima ( $N_{Max}$ ) de  $8.84 \pm 0.08$  log ufc/g (Cuadro N° 9).

### CUADRO N° 9

**Parámetros cinéticos de crecimiento y letalidad del *Escherichia coli* (EC) y *Lactobacillus casei* (LC) en el queso fresco experimental**

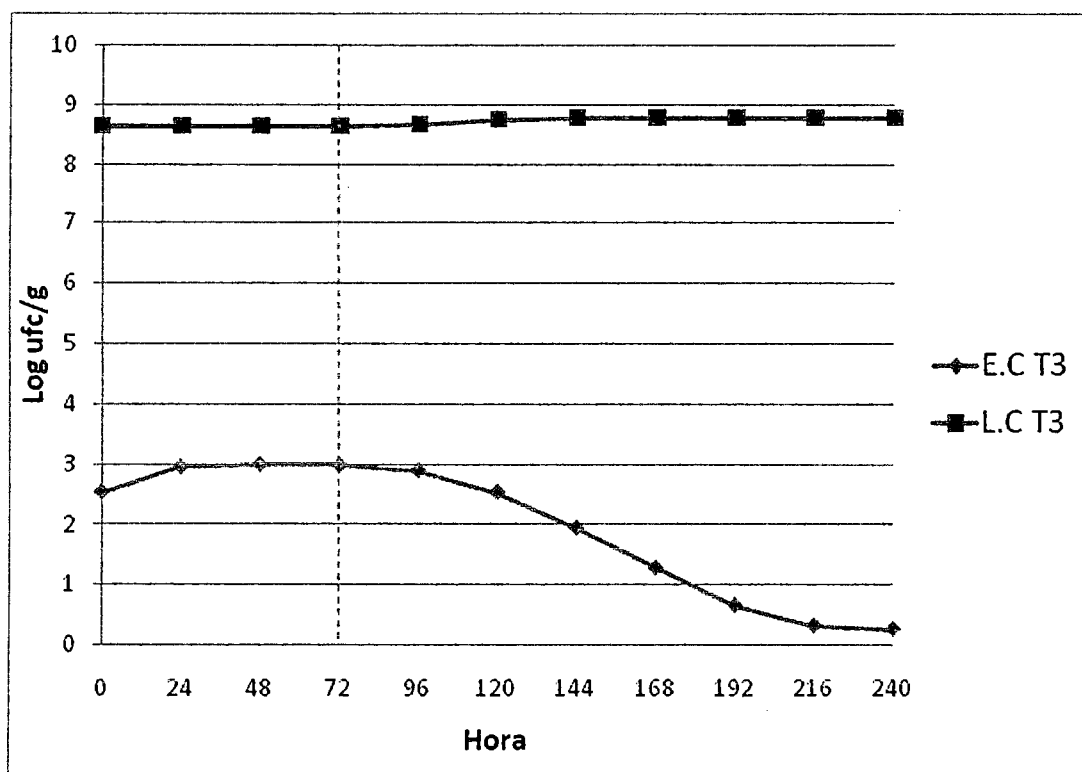
**(Tratamiento 3)**

Crecimiento	EC	LC
$N_0$ [log ufc/g]	$2.53^a \pm 0.19$	$8.49^b \pm 0.12$
$N_{Max}$ [log ufc/g]	$3.29^a \pm 0.25$	$8.84^b \pm 0.08$
$\mu_{Max}$ [log ufc.g <sup>-1</sup> /horas]	$0.017^a \pm 0.002$	$0.003^b \pm 0.001$
$\lambda$ [horas]	$0.00^a \pm 0.00$	$21.21^b \pm 1.56$
C [log ufc/g]	$0.75^a \pm 0.13$	$0.35^a \pm 0.14$
Letalidad		
- K [log ufc.g <sup>-1</sup> /horas]	$-0.029 \pm 0.005$	-
$N_f$ [log ufc/g]	$0.22 \pm 0.06$	-
R [log ufc/g]	$3.06 \pm 0.19$	-

Superíndices diferentes en una misma fila indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

## GRAFICA N° 8

Curvas de crecimiento de *Escherichia coli* (EC) y *Lactobacillus casei* (LC), inoculados en el queso fresco experimental (Tratamiento 3)



5.6 Con los parámetros cinéticos obtenidos del crecimiento de *Escherichia coli* (EC) en los cuatro tratamientos, se procedió a determinar el mejor tratamiento o concentración de inoculación de *Lactobacillus casei* (LC) que permitió lograr la inhibición de la población inicial de EC en el queso fresco experimental. El Cuadro N° 10, presenta los parámetros de crecimiento/letalidad del EC de los 4 tratamientos que nos permitió determinar el mejor tratamiento.



## CUADRO N° 10

**Parámetros cinéticos de crecimiento y letalidad del *Escherichia coli*  
(EC) de los cuatro tratamientos**

	CRECIMIENTO			LETALIDAD	
	C log ufc/g	$\mu_{Max}$ log Ufc.g <sup>-1</sup> /h	$\lambda$ horas	-K log Ufc.g <sup>-1</sup> /h	R log ufc/g
C	3.45 <sup>a</sup> ± 0.16	0.054 <sup>a</sup> ± 0.005	21.97 <sup>a</sup> ± 4.19	-	-
T1	2.18 <sup>b</sup> ± 0.23	0.041 <sup>a-b</sup> ± 0.004	23.61 <sup>a</sup> ± 7.28	-0.007 <sup>a</sup> ± 0.001	0.67 <sup>a</sup> ± 0.09
T2	0.61 <sup>c</sup> ± 0.17	0.013 <sup>b</sup> ± 0.009	18.69 <sup>a</sup> ± 2.94	-0.005 <sup>a</sup> ± 0.002	0.65 <sup>a</sup> ± 0.12
T3	0.75 <sup>c</sup> ± 0.13	0.017 <sup>b</sup> ± 0.002	0.00 <sup>b</sup> ± 0.00	-0.029 <sup>b</sup> ± 0.005	3.06 <sup>b</sup> ± 0.19

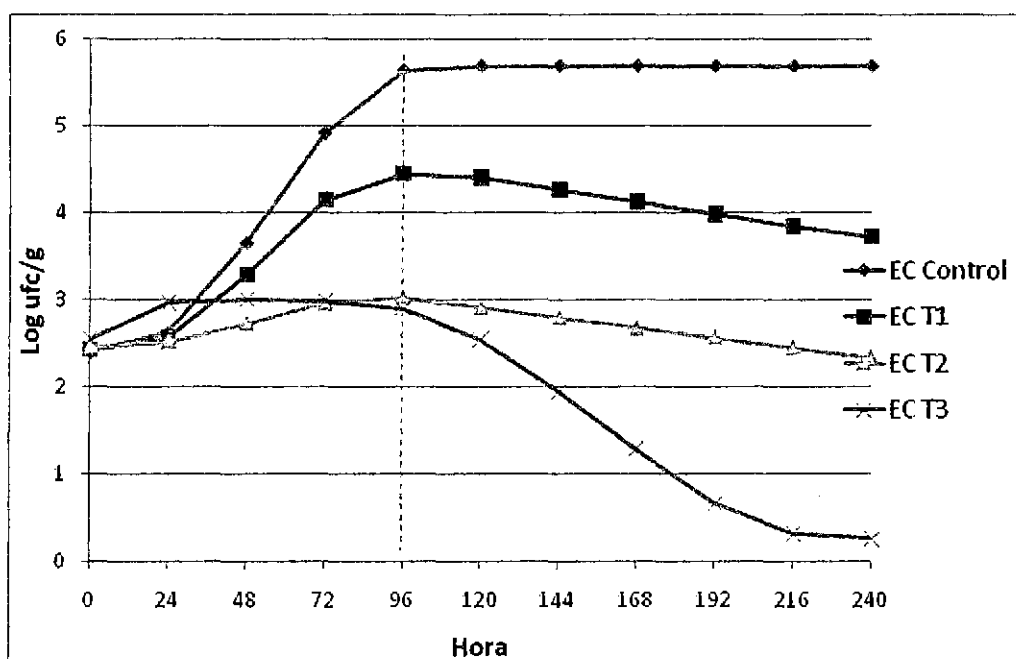
Superíndices diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (P<0.05).

Los parámetros cinéticos de crecimiento para los grupos o tratamientos experimentales presentados en el Cuadro N° 10, evidenciaron que los tratamientos 1, 2 y 3, los cuales fueron expuestos a la acción de *Lactobacillus casei* (LC), presentaron menor crecimiento poblacional (C) y menor velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{Max}$ ), que el grupo control (C). Entre los tratamiento 1, 2 y 3, los Tratamientos 2 y 3, presentaron un menor crecimiento poblacional (C) y menor velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{Max}$ ). Entre estos últimos, el tratamiento 2 permitió obtener un mayor tiempo de latencia ( $\lambda$ ), lo que indica que la inoculación de LC a una concentración de 10<sup>6</sup> ufc/ml en queso fresco, presenta un “efecto conservante” por prolongar el tiempo de latencia del EC y permitir un

mínimo crecimiento poblacional, consiguiendo inhibir el crecimiento por un tiempo ( $\lambda$ ) de  $18.69 \pm 2.94$  horas, limitando su crecimiento con una menor velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{Max}$ )  $0.013 \pm 0.009$  log ufc.g<sup>-1</sup>/hora, lo cual se manifestó en un menor crecimiento poblacional (C)  $0.61 \pm 0.17$  log ufc/g, en 96 horas de experimentación (Grafica N° 9). La comparación de los parámetros cinéticos de crecimiento del EC del grupo control y los tres tratamientos, indican que existe diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de velocidad máxima de crecimiento y crecimiento máximo poblacional ( $P \leq 0.05$ ), siendo la causa de la diferencia, la concentración inicial de *Lactobacillus casei* inoculada al queso fresco experimental.

### GRAFICA N° 9

#### Curvas de crecimiento promedio de EC de los grupos o tratamientos



Los parámetros cinéticos de muerte celular o letalidad (fase de declive) presentados en el Cuadro N° 11, permitió determinar el mejor tratamiento para la inhibición del EC, a través de la velocidad de muerte celular ( $-K$ ) y de la reducción poblacional ( $R$ ). La comparación de los parámetros cinéticos de letalidad de los tres tratamientos experimentales, indicó que existe diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros  $-K$  y  $R$  de los tres tratamientos ( $P \leq 0.05$ ), siendo la causa de la diferencia la concentración inicial de *Lactobacillus casei* inoculada al queso fresco experimental. Así mismo, el tratamiento 3, el cual presentó la inoculación de LC a una concentración de  $10^9$  ufc/ml, permitió una mayor inhibición de la población existente de EC ("efecto inhibitorio"), logrando una mayor velocidad de muerte celular ( $-K$ )  $-0.029 \pm 0.005 \log \text{ ufc.g}^{-1}/\text{hora}$ , que permitió una reducción poblacional de  $3.06 \pm 0.19 \log \text{ ufc/g}$ , en 168 horas de experimentación. Estos valores fueron superiores a los valores obtenidos en los tratamientos 1 y 2. Por otro lado, la comparación del efecto inhibitorio de los tratamientos experimentales fue medido a través de sus parámetros de letalidad ( $-K$  y  $R$ ), mostrando que existen diferencia significativa entre las medias de los parámetros del tratamiento 3 y los tratamientos 1 y 2 (Cuadro N° 11). La diferencia en el efecto inhibitorio del tratamiento 3 respecto a los tratamientos 1 y 2, fue debido a que esta presento mayor concentración de *Lactobacillus casei* y permitió ser considerado como el mejor tratamiento experimental para la inhibición de *Escherichia coli*.

### CUADRO N° 11

**Prueba de Tukey (HSD) entre los tratamientos, con un intervalo de confianza de 95%**

Contraste	Diferencia entre las Medias Estimadas	
	-K	R
T3 vs T2	0.025 <sup>a</sup>	2.407 <sup>a</sup>
T3 vs T1	0.023 <sup>a</sup>	2.393 <sup>a</sup>
T1 vs T2	0.002 <sup>b</sup>	0.013 <sup>b</sup>

(<sup>a</sup>) Diferencia significativa. (<sup>b</sup>) Diferencia no significativa.

5.7 Finalmente se evaluó los parámetros fisicoquímicos de acidez y humedad de los quesos con tratamientos experimentales, grupo control y vida útil. En el Cuadro N° 12 y la Grafica N° 10, se presenta los valores de humedad inicial, final y la pérdida de humedad que presentaron los quesos durante los 10 días de evaluación fisicoquímica.

### CUADRO N° 12

**Valores de humedad de los quesos frescos correspondientes a vida útil y tratamientos experimentales**

	%H <sub>0</sub> (Día 0)	%H <sub>f</sub> (Día 10)	Perdida %H
V.U	58.89 ± 0.60	54.96 ± 0.09	3.93 <sup>a</sup> ± 0.69
Control	54.50 ± 0.71	51.12 ± 0.35	3.38 <sup>a</sup> ± 0.35
T1	60.44 ± 0.89	55.99 ± 0.36	4.45 <sup>a</sup> ± 0.54
T2	58.95 ± 0.14	53.84 ± 0.21	5.11 <sup>a</sup> ± 0.07
T3	61.87 ± 0.98	58.04 ± 0.12	3.84 <sup>a</sup> ± 0.86

Superíndices diferentes en una misma columna indican diferencias significativas (P<0.05).

El porcentaje de humedad inicial (Día 0) de todos los quesos frescos experimentales analizados, estuvieron entre 54.50 % y 61.87 % de humedad, valores por encima del requisito mínimo de humedad exigido por la NTP 202.195, el cual indica una humedad  $\geq 46$  %. La evaluación del porcentaje de humedad durante los 10 días de experimentación en los quesos frescos del grupo control, tratamientos experimentales y vida útil, permitió determinar la pérdida de humedad, donde el queso fresco destinado a la evaluación de vida útil presentó una pérdida de humedad (3.93 %), mientras que la pérdida de humedad de los quesos con tratamiento experimental, presentaron reducciones desde 3.38 % hasta 5.11 %, este último correspondiente al Tratamiento 2. Así mismo, la comparación entre tratamientos no encontró diferencias estadísticamente significativas entre los valores de pérdida de humedad de los quesos con tratamientos experimental, grupo control y vida útil ( $P > 0.05$ ).

Por otro lado, se realizó la evaluación de la producción de ácido láctico a través de la determinación de acidez titulable. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro N° 13 y Grafica N° 11, donde se puede apreciar que la acidez inicial obtenida en todos quesos analizados, mostró un mismo valor 0.108 g ácido láctico/100 g queso y la mayor producción de ácido láctico se presentó en los quesos correspondientes al Tratamiento 2, con una acidez final de 0.288 g ácido láctico/100 g queso. La comparación de los valores de producción de ácido láctico de los

tratamientos experimentales, grupo control y vida útil, indicó que existe diferencia significativas entre los valores obtenidos ( $P < 0.05$ ), esta diferencia se debió principalmente a la diferencia en la población inicial de *Lactobacillus casei* presente en el queso fresco experimental, y como consecuencia los Tratamientos 2 y 3 presentaron una producción de ácido láctico significativamente mayor que el grupo control, tratamiento 1 y vida útil.

### CUADRO N° 13

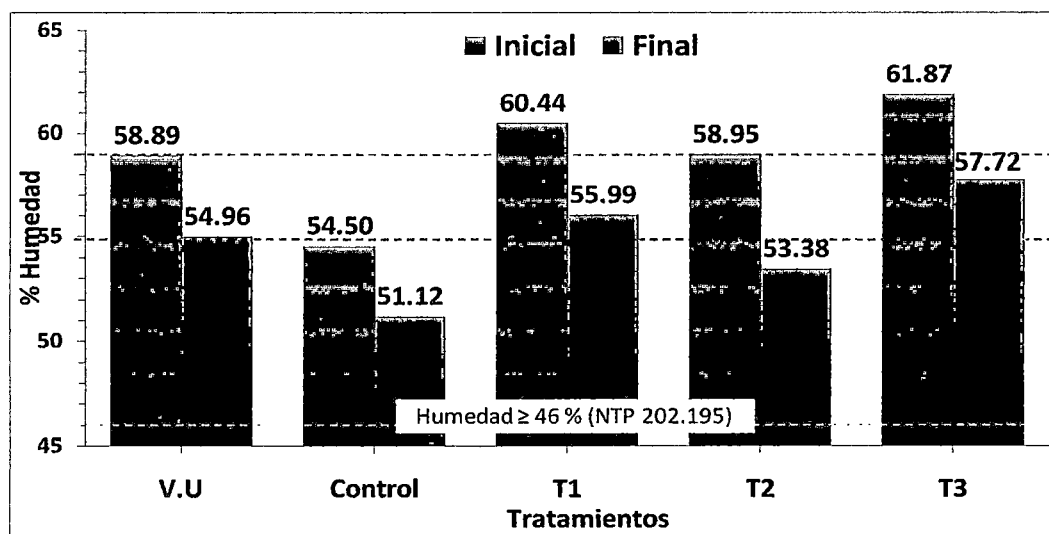
**Valores de acidez titulable de los quesos frescos experimentales correspondientes a vida útil, control y tratamientos experimentales (expresado en g ác. láctico/100g queso)**

	Acidez inicial	Acidez final	Producción
V.U	0.108 ± 0.00	0.153 ± 0.01	0.045 <sup>a-e</sup> ± 0.01
Control	0.108 ± 0.00	0.135 ± 0.01	0.027 <sup>b</sup> ± 0.01
T1	0.108 ± 0.00	0.144 ± 0.00	0.036 <sup>b-e</sup> ± 0.00
T2	0.108 ± 0.00	0.288 ± 0.00	0.180 <sup>c</sup> ± 0.00
T3	0.108 ± 0.00	0.270 ± 0.00	0.162 <sup>d</sup> ± 0.00

Superíndices diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

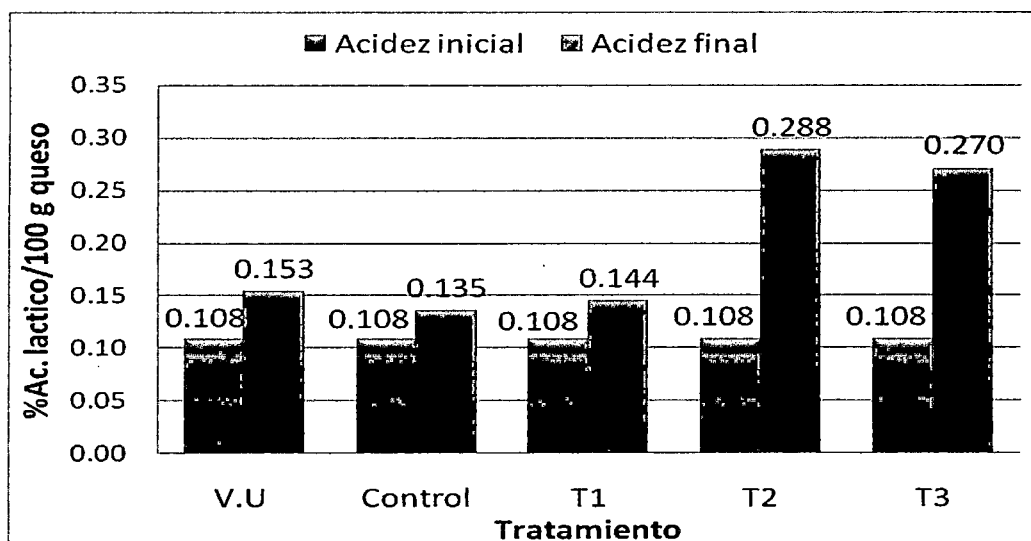
GRAFICA N° 10

Evaluación de la humedad en los quesos frescos correspondientes a vida útil, control y tratamientos experimentales



GRAFICA N° 11

Evaluación de la acidez titulable en los quesos frescos correspondientes a vida útil, control y tratamientos experimentales



## CAPITULO VI

### DISCUSIÓN

5.1 La leche fresca utilizada como materia prima para la elaboración de los quesos frescos experimentales, reportó buena calidad fisicoquímica, cumpliendo con los valores de acidez y su estabilidad frente al alcohol establecidos por la NTP 202.001, cuyo rango de acidez requerida es de 0.14-0.18 g ácido láctico/100 g leche. Así mismo, el pH se encontró dentro del rango de pH 6.5-6.8, que es reportado por Zambrano (2010). Los resultados fisicoquímicos óptimos de la leche se debieron principalmente a las condiciones de almacenamiento posterior al ordeño, en razón de que el establecimiento posee un tanque de almacenamiento refrigerado que permitió que la leche mantenga sus propiedades adecuadas hasta el expendio. Por otro lado, la leche que ingresó a proceso presentó un elevado recuento de coliformes totales  $\leq 10^5$  ufc/ml, el cual superó el requisito microbiológico de la NTP 201.001; no obstante el análisis microbiológico posterior a la pasteurización confirmó la eficiencia del tratamiento térmico encontrándose poblaciones de coliformes totales  $\leq 10$  ufc/ml. Resultados semejantes fueron reportados por López Díaz (2006), quien encontró en la leche cruda destinada a la elaboración de queso colonial (Brasil), una población de *E. coli* de  $10^5$  ufc/ml, y el recuento posterior a la pasteurización lenta en tanque abierto, fue  $10^0$  ufc/ml. Ambos



resultados permitieron la reducción del 99.9% de la carga inicial de coliformes, lo mismo expresado por Frazier y Westhoff (2000), el cual indica que la pasteurización lenta de la leche a 65 °C por 30 minutos es eficiente en la eliminación de la flora patógena inicial de la leche.

5.2 El estudio de vida útil estuvo basado en estimar el tiempo en la cual el queso fresco experimental, elaborado con técnicas artesanales (libre de conservantes y sin presencia de cultivos iniciadores) mantenía su calidad microbiológica almacenado a dos rangos de temperatura, donde se consideró como indicador la presencia de coliformes totales, cuyo límite crítico  $10^3$  ufc/g, el cual está establecido en la norma sanitaria NTS N° 071 DIGESA/MINSA (2008). El tiempo estimado de vida útil para el queso fresco experimental almacenado a  $8 \pm 2$  °C fue  $78.68 \pm 4.52$  horas, considerándose una vida útil mayor que la estimada en el queso almacenado a  $20 \pm 2$  °C. Cabe mencionar que el corto tiempo de vida útil estimada para los quesos frescos experimentales se debió a la técnicas y condiciones de elaboración de los quesos experimentales y sobre todo a la temperatura a la cual fue almacenada el queso, considerando que el rango de temperatura adecuada para la conservación del queso y sugerido por diversos autores está entre 2 – 6 °C, rango de temperatura que permite no solo mantener las características físicas y químicas del producto, sino que constituye la principal barrera para la inhibición del crecimiento bacteriano influyendo en la cinética de crecimiento de los

coliformes totales, y por consecuencia en el tiempo de vida útil estimado. Si bien existe escasa literatura relacionada a determinar la vida útil del queso fresco elaborado sin conservantes o cultivos iniciadores, existen autores que han estimado la vida útil del queso fresco elaborado en otras condiciones y técnicas de elaboración como: Zambrano (2010), quien estimó la vida útil de un queso fresco probiótico (*Lactobacillus acidophilus*) y utilizando cultivos iniciadores, en 21 días, manteniendo el producto a temperaturas comprendidas entre 4-8 °C. Así mismo, López Orozco (2004), estimó la vida útil de un queso fresco de pasta blanda tipo “ranchero”, en 15 días. En su estudio considero la pasteurización, uso de conservantes químicos y un exhaustivo control de higiene de los manipuladores y de equipos para garantizar este periodo de vida en anaquel, considerando la conservación del producto entre 2 y 4 °C. Como se observa, la vida útil del queso fresco depende mucho de las condiciones de elaboración, uso de conservantes y sobre todo la aplicación interrumpida de la cadena de frío, lo que permitiría alargar el tiempo de vida útil del queso elaborado en condiciones inocuas.

Por otro lado, el recuento de bacterias ácido-lácticas (BAL) nativas del queso fresco, no tuvo efecto inhibitorio sobre los coliformes nativos del producto. Al respecto Cristóbal y Maurtua (2003), reportaron resultados similares al evaluar la calidad bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados a nivel ambulatorio, cuya temperatura de

almacenamiento estuvo entre 14-22 °C. En dicho estudio encontraron que el 97.4 % de las muestras analizadas estuvieron fuera de los valores establecidos por la NTP vigente, y que la presencia elevada de *Lactobacillus* sp. ( $10^6$  ufc/g), no favoreció a la reducción de bacterias coliformes ni patógenas como el *Escherichia coli*. Estos resultados se deben a que no todas las bacterias ácido-lácticas aisladas de quesos frescos poseen propiedades inhibitorias y las que poseen se encuentran en poblaciones insuficientes para alcanzar el efecto deseado.

5.3 En cuanto al efecto inhibitorio de los tratamientos experimentales, el queso fresco experimental sin inoculación de *Lactobacillus casei* (Grupo Control), mostró un crecimiento acelerado del *Escherichia coli*, debido a que no estuvo expuesto a conservantes o inhibidores de crecimiento bacteriano, sólo la temperatura de almacenamiento limitó su crecimiento por 24 horas. En tanto, el crecimiento del *Escherichia coli* en el queso experimental con tratamiento 1 ( $10^3$  ufc/ml de *Lactobacillus casei*), se vio afectado cuando el *Lactobacillus casei* alcanzó su población máxima, dando inicio a su fase estacionaria a las 96 horas de experimentación. Al respecto Madrid (1996), indica que es en esta etapa donde se alcanza niveles inhibitorios producto de la acumulación de desechos metabólicos de las propias bacterias. La producción de ácidos orgánicos,  $H_2O_2$ , bacteriocinas y otros compuestos por parte de

*Lactobacillus casei*, son los que afectan y limitan el crecimiento del *Escherichia coli*.

Los quesos frescos con tratamiento 2 y 3, presentaron una mayor inhibición que el tratamiento 1, teniendo como principal factor causal del efecto inhibitorio la concentración inicial de *Lactobacillus casei*. En el queso fresco experimental con tratamiento 2 ( $10^6$  ufc/ml de *Lactobacillus casei*), se encontró un mínimo crecimiento de *Escherichia coli*, y la población máxima mostró una ligera reducción poblacional a partir de las 96 horas de experimentación. Los resultados obtenidos demostraron un control en el crecimiento poblacional del *Escherichia coli* durante los 10 días de experimentación, determinando que la inoculación de  $10^6$  ufc/ml de *Lactobacillus casei* presentó un “efecto bacteriostático” frente a la población de *Escherichia coli*. Así mismo, el desarrollo del *Escherichia coli* en el queso fresco experimental con tratamiento 3, fue claramente inhibido a partir de las 72 horas de experimentación, reduciendo la población inicial de 2.53 log ufc/g a 0.22 log ufc/g de *Escherichia coli* en 10 días de experimentación. Si bien no se obtuvo una inhibición completa de la carga inicial, el efecto inhibitorio permitió tener un recuento final dentro de los valores establecidos por la norma sanitaria vigente. La inoculación de  $10^9$  ufc/ml de *Lactobacillus casei* en queso fresco experimental, presentó un “efecto bactericida” frente a la población inicial de *Escherichia coli*, pudiéndose alcanzar la inhibición completa en un

tiempo mayor, sobre todo en quesos que sufren un proceso de maduración prolongado o superior a 10 días. Resultados semejantes fueron encontrados por Mejía et al (2007), quienes inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 con la presencia de 10% de sobrenadante de cultivo de cepas *Lactobacillus* aisladas de heces de niños lactantes y muestras vaginales, logrando una inhibición del crecimiento por un periodo de 8 horas. A las 24 horas el crecimiento alcanzó valores cercanos al control. Sin embargo, al utilizar el 50% del sobrenadante, no sólo se produjo la inhibición del crecimiento si no que luego de 3 horas de incubación hubo una reducción de la población. Al respecto los autores indican que aparentemente, a bajas concentraciones el efecto es bacteriostático afectando tan solo a un cierto número de células, las restantes crecerían lentamente hasta alcanzar un número equivalente al control, mientras que a 50%, todas las células presentes fueron afectadas y no sólo se impidió el crecimiento, sino que se provocó su lisis celular, indicando que a esta proporción de sobrenadante, el agente responsable de la muerte celular actuó como un agente bacteriolítico. Al respecto Larrea et al (2007), determinaron el efecto bacteriostático y bactericida del *Lactobacillus casei* frente a *Escherichia coli*, a través de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de la suspensión de esta cepa en condiciones de laboratorio, encontrando que para obtener un efecto bacteriostático del *Lactobacillus casei* sobre el *Escherichia coli* se

necesita un CMI de 64  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , mientras que para obtener un efecto bactericida se necesitó un CMB de 256  $\mu\text{L}/\text{mL}$  capaz de lograr una lisis celular y una reducción del 99.99% de la población inicial. Ambos estudios indican que para obtener un mayor efecto en la inhibición del *Escherichia coli*, depende de la concentración de *Lactobacillus* o su sobrenadantes, a la cual se expone al patógeno, encontrando que a bajas concentración se puede obtener un efecto bacteriostático, mientras a concentración superiores, el efecto puede presentarse como bactericida, causando la lisis celular. La determinación de esta última permitiría la aplicación en diferentes alimentos con el fin de garantizar la inocuidad del producto y permitiría extender el periodo de vida útil.

5.4 La producción de ácido láctico por parte del *Lactobacillus casei*, fue significativamente mayor en los quesos con tratamientos 2 y 3, principalmente se debió a que estos tratamientos presentaron poblaciones iniciales superior al tratamiento 1. La máxima producción de ácido láctico se observó en el queso con tratamiento 2, con una producción de 0.180 g ácido láctico/100 g queso, en 10 días de experimentación. No obstante, la producción de ácido láctico en los tratamientos 2 y 3, no permitió determinar si ejercían un efecto inhibitorio considerable puesto que el *Escherichia coli* es una bacteria que puede soportar un valor de pH de 4.0 (Frazier y Westhoff, 2000). Al respecto, Fuller citado por Rodríguez (1994), afirma que el crecimiento del *Escherichia coli* se puede inhibir en leche

acidificada con ácido láctico a un pH de 4,2. La acidez en el queso fresco puede ser un factor inhibitorio, si el ácido láctico se encuentra en concentraciones elevadas capaces de reducir el pH del medio donde se desarrolla la bacteria. Para Cristóbal (2008), quien aisló cepas de *Lactobacillus casei* que presentaron actividad inhibitoria frente al organismo indicador (*L. acidophilus*) después de su ajuste a pH 6.5 con NaOH 2.5N, indica que la acción inhibitoria de los *Lactobacillus* no es debida a la producción de ácidos orgánicos, entre ellos el ácido láctico. Así mismo Mejía et al (2007), descartaron que el efecto inhibitorio de los sobrenadantes de cepas *Lactobacillus* se debía a la producción de ácido láctico, exponiendo a los microorganismos patógenos de prueba al crecimiento en un medio con una máxima concentración de ácido láctico (0.25 %), encontrando que el crecimiento de bacterias patógenas se vieron afectadas pero no en la magnitud que se produjo en presencia del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus*, además en ninguno de los casos se observó lisis celular.

Finalmente, la humedad inicial de los quesos frescos del grupo control, tratamientos experimentales y vida útil, se encontraron por encima del requisito mínimo de humedad exigido por la NTP 202.195, el cual indica una humedad  $\geq 46$  %. No se encontró diferencia significativa en la pérdida de humedad de los quesos frescos experimentales evaluados. La diferencia entre la humedad inicial de los quesos elaborados se debió

principalmente a que no se pudo controlar la presión ejercida a los quesos y la pérdida de humedad dada por la sinéresis en el queso (pérdida de humedad durante el almacenamiento), se debió por qué no se considero un tiempo prudente de desuerado en refrigeración antes del análisis correspondiente, ya que la refrigeración previa al desmoldado permite que el queso logre su punto final de textura y presentación, ayudando a la eliminación casi total del lactosuero retenido en la cuajada del queso. A pesar de estas condiciones de trabajo, la humedad inicial se encontró entre 54.50% y 61.87 %, valores similares a los reportados por Zambrano (2010), quien reportó un porcentaje de humedad promedio de 64.16% para quesos frescos probióticos, lo cual coincidió con lo establecido por López Orozco (2004), quien indica que la humedad del queso fresco rancharo (México), se encuentra entre 47 y 57%.



## CAPITULO VII

### CONCLUSIONES

El almacenamiento de los quesos frescos experimentales por encima del rango de temperatura recomendada (2-6 °C), permitieron un adecuado crecimiento de las bacterias experimentales, y nos permitió afirmar que no hubo inhibición del crecimiento del *Escherichia coli* debido a la temperatura de almacenamiento, sino posiblemente por la influencia de *Lactobacillus casei*. Así mismo, se evidencio que la producción de ácido láctico por parte del *Lactobacillus casei*, no fue el responsable de la inhibición del *Escherichia coli*.

La aplicación de las concentraciones de *Lactobacillus casei* ATCC 393™ inoculadas al queso fresco, determinó que es necesario la presencia de esta bacteria en poblaciones por encima de  $10^6$  ufc/ml para obtener un efecto considerable en la inhibición de *Escherichia coli*. Siendo así, la inoculación de  $10^6$  ufc/ml de *Lactobacillus casei* al queso fresco, permitió controlar la población presente de *Escherichia coli* durante los 10 días de experimentación mostrando un efecto bacteriostático. Mientras que la inoculación de  $10^9$  ufc/ml de *Lactobacillus casei* ATCC 393™, permitió la reducción poblacional de *Escherichia coli* presente en el producto hasta

valores permitido por la NTS N° 071 DIGESA/MINSA, mostrando un efecto de tipo bactericida.

La estimación de la vida útil del queso fresco experimental elaborado con técnicas artesanales, sin uso de cultivos iniciadores y sin conservantes, resulto muy corta ( $78.68 \pm 4.52$  horas, almacenado a  $8 \pm 2$  °C), a pesar de ser está mayor a la vida útil estimada para los quesos almacenados a  $22 \pm 2$  °C ( $37.09 \pm 3.7$  horas), los resultados nos permiten confirmar la importancia de la cadena de frío como una técnica de conservación de alimentos perecederos. No obstante, los resultados obtenidos se debieron por las condiciones y técnicas de elaboración, así como también la ausencia de cultivos iniciadores y conservantes, que son las primeras barreras de inhibición bacteriana.

## CAPITULO VIII

### RECOMENDACIONES

- Se recomienda el aislamiento, purificación, caracterización y la evaluación de las bacteriocinas secretadas por el *Lactobacillus casei* ATCC 393™, en diferentes dosificaciones, sustratos y frente a otras cepas patógenas de prueba, a fin de que esta pueda ser aplicada y considerada como un aditivo alimentario.
- Se recomienda el estudio de esta cepa probiótica en conjunto con otras cepas probióticas o iniciadores, que permitan lograr mejores efectos inhibitorios y mejorar a su vez la calidad sensorial del producto.
- Se recomienda la evaluación de la vida útil del queso fresco probiótico, considerando no sólo la evaluación microbiológica y fisicoquímica, sino también la realización de pruebas complementarias como perfil de textura y el análisis organoléptico del producto.
- Se recomienda el estudio de costos de aplicación de esta cepa a la industria quesera. El estudio de factibilidad económica permitiría conocer la rentabilidad de la aplicación de esta cepa en comparación con los conservantes tradicionales.

## CAPITULO IX

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALVARADO GALLARDO, Blanca Andrea. *Efecto del Lactobacillus paracasei subs. paracasei y de la Inulina sobre los parámetros reológicos de queso gauda semidescremado*. Tesis de pre grado. Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile, 2008.

AOAC INTERNATIONAL. *Métodos Oficiales de Análisis*. 16va Edición. 4ta revisión. Maryland-USA.1998.

ARTAVIA PORRAS, Walner. *Elaboración de queso ricotta a partir de suero lácteo*. Guácimo-Costa Rica, 1999. Memoria presentada en la Escuela de agricultura de la región tropical húmeda (EARTH), para optar al título de ingeniero agrónomo.

AMERICAN TYPE CULTURECOLLECTION. *ATCC: Escherichia coli 25922* [en línea]. [Ref. 04 de Junio del 2011].Disponible en Web: <[www.atcc.org/SearchCatalogs/linkin/?id=25922](http://www.atcc.org/SearchCatalogs/linkin/?id=25922)>

BARANYI, J.; ROBERTS, T. "A dynamic approach to predicting bacterial growth in food". *Revista Internacional de Microbiología de Alimentos*. Vol. 23, Nº 3-4, 1994, p. 277-294.

CABEZA HERRERA, Enrique Alfonso. *Manual de Prácticas de Microbiología Predictiva*. Pamplona-Colombia, 2008. Universidad de Pamplona. 133 p.

CALLE DAVALOS, M.; SOLANO CASTRO, A. *Elaboración de queso fresco*. Proyecto: Formación y fortalecimiento de una red de microproductores rurales DETALLAMAC-CAJAMARCA. Ed., Junio 2004. Comisión de promoción de la pequeña y microempresa, PROMPYME. Lima, PERÚ. 83 p.

CARRILLO, M.; ZAVALA, D.; ALVARADO, B. "Modelado del Efecto de la Temperatura, Actividad de Agua y pH sobre el Crecimiento de *Rhizopus oryzae*". *Información Tecnológica*. Vol. 18, Nº 4, 2007. p. 57-62.

CARTES TIRONI, Paula Andrea. *Viabilidad de las Cepas de *Lactobacillus casei shirota* y *Bifidobacterium lactis* en un Postre de Leche con Salsa de Cranberry*. Tesis de pre grado. Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile, 2005.

CAYRÉ, María; VIGNOLO, Graciela; GARRO, Oscar. "Selección de un Modelo Primario para Describir la Curva de Crecimiento de Bacterias Lácticas y *Brochothrix thermosphacta* sobre emulsiones cárnicas cocidas". *Información Tecnológica*. Vol. 18, Nº 3, 2007.p. 23-29.

CERÓN CARRILLO, Teresa Gladys. *Evaluación de la viabilidad de Lactobacillus casei encapsulado*. Tesis magistral. Universidad de las Américas Puebla. Puebla-México, 2008.

COMBASE, USDA-ARS/IFR/FSC. *ComBase Modelling Toolbox: Herramientas predictivas en respuestas microbianas en el ambiente de los alimentos* [en línea]. [Ref. 15 de agosto del 2010]. Disponible en Web: <<http://modelling.combase.cc>>

COLLAZOS, Carlos, et al. *Tablas peruanas de composición de los alimentos*. 7ma Edición. Lima, Perú: Editora Gráfica Acuario, 1996. 86 p.

CRISTÓBAL, Ruth; MAURTUA, Dora. "Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Perú, y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus sp.*". *Revista Panamericana de Salud Pública*. Vol. 14, Nº 3, 2003. p. 158-164.

CRISTÓBAL DELGADO, Ruth. *Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias*. Lima – Perú, 2008. Tesis magistral. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

DIGESA. *Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humanos*. NTS N° 071-MINSA/DIGESA-V.01. Lima – PERÚ, 2008.

DOYLE, M.; BEUCHAT, L.; MONTVILLE, T. *Microbiología de los Alimentos: Fundamentos y Fronteras*. Zaragoza – España: Editorial Acribia, 1997. p. 581-597.

DMFit. *Software de modelamiento dinámico edición on-line*. Modelo predictivo de ComBase, 2009. [Ref. 10 de agosto del 2010]. Disponible en web: <<http://modelling.combase.cc/DMFit.aspx>>

DOS SANTOS EDUARDO, Agatângelo Joaquim. *Estudio del Comportamiento Cinético de Microorganismos de Interés en Seguridad Alimentaria con Modelos Matemáticos*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona–España, 2007.

FANGIO, M.; IURLINA, M.; FRITZ, R. "Actividad antimicrobiana de mieles del sudeste de la provincia de Buenos Aires frente a *Escherichia coli*". *Revista Argentina de Microbiología*. Vol. 39, 2007. p. 120-123. ISSN: 0325 – 7541.

FAO/WHO. *Codex Alimentarius. Norma Codex para el queso no madurado, incluido el queso fresco*. Codex Stan 221, 2001.

FERNÁNDEZ, Fernanda; BARBÉS, Covadonga; RODRIGUEZ, Ana. *Queso artesanal probiótico: un ejemplo de queso funcional*. Oviedo-España, 2004. Universidad de Oviedo. 7 p.

FUNDACIÓN PARA LA INNOVACIÓN AGRARIA. *Elaboración de productos con leche de cabra*. Santiago, 2000. Ministerio de Agricultura de Chile. 111 p.

FRANCIA, O; SANTA CRUZ, J. "Bacterias Lácticas productoras de Bacteriocinas aisladas de quesos frescos de preparación artesanal, Lambayeque 1999". *Revista científica: Avances en Ciencia y Tecnología*. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Vol. 3 Nº 1, 2002.

FRANCO C. M., et al. "Evolución de *L. monocytogenes* y *L. innocua* durante la elaboración y maduración del queso tipo *Arzúa*: Efecto del



tratamiento con Sorbato potásico". *Revista: Ciencia y Tecnología Alimentaria*. Vol. 3, Nº 4, 2002. p. 236-240. ISSN 1135-8122.

FRAZIER, C.; WESTHOFF, C. *Microbiología de los Alimentos*. Zaragoza – España: Editorial Acribia, 2000. 680 p.

GONZÁLEZ, Blanca; GÓMEZ, Marivel; JIMÉNEZ, Zacarias. "Bacteriocinas de probióticos". *Revista Salud Pública y Nutrición* [en línea]. Vol. 4, Nº 2, 2003. Disponible en Web:

< <http://www.respyn.uanl.mx/iv/2/ensayos/bacteriocinas.htm> >

GUTIÉRREZ, Luz, et al. "Evaluación de la viabilidad de una cepa probiótica nativa de *Lactobacillus casei* en queso crema". *Revista Lasallista de Investigación*. *Revista Lasallista de Investigación*. Vol. 4, Nº 2, 2007. p. 37-42. ISSN 1794 – 4449.

HELLER J., Knut. "Bacterias probióticas en alimentos fermentados: características de los productos y organismos iniciadores". *Revista Mundo Lácteo y Cárnico*. Edición Julio/Agosto 2008. p. 23-30.

HERNÁNDEZ, Manuel, et al. *Tratado de nutrición*. Madrid, España: Editorial Días de santos, 1999. p. 456-457.

IIAC – Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.  
*Cadena Agroindustrial del Queso Fresco*. Proyecto IIAC/JICA. Nicaragua,  
2004. 64 p.

INDA CUNNINGHAM, Arturo. *Optimización del rendimiento y Aseguramiento de Inocuidad en la Industria de Quesería*. Proyecto OEA/GTZ de Gestión de la Calidad en la Pequeña y Mediana Empresa (PYMEs), 2000. 155 p.

INDECOPI. *Leche y productos lácteos. Leche cruda .Requisitos*. Norma Técnica Peruana: NTP 202.001. 5ta edición. Lima, 2010.

INDECOPI. *Leche y productos lácteos. Queso fresco. Requisitos*. Norma Técnica Peruana: NTP 202.195. 2da edición. Lima – PERÚ, 2004.

INDECOPI. *Leche y productos lácteos. Leche cruda. Ensayos preliminares: ebullición, alcohol y alizarol*. Norma Técnica Peruana: NTP 202.030. 2da edición. Lima – PERÚ, 1998.

JONSON, Mark; PAULUS, Karen. "La operación de salado del queso". *Revista Mundo Lácteo y Cárnico*. Edición Septiembre/octubre 2005. p. 14-16.

LARREA C., Hernani, et al. "Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas". *Revista Horizonte Médico*. Vol. 7, N° 1, 2007. p. 16-22.

LÓPEZ DÍAZ, Álvaro. *Alternativas para fabricar queso colonial artesanal seguro para el consumidor* [en línea]. Portal Lechero, 2006. [Ref. 22 de Marzo del 2010]. Disponible en Web: <<http://www.portalechero.com>>

LÓPEZ OROZCO, Melva. *Mejoramiento de vida de anaquel en queso tradicional ranchero y queso de pasta hilada (Oaxaca)*. Tesis de magístral. Universidad iberoamericana. México D.F. 2004.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. Brock, *Biología de los microorganismos*. 8va edición. Madrid, España: Editorial Prentice Hall Iberia, 1999.

MADRID VICENTE, Antonio. *Curso de Industrias Lácteas*. 1era Edición. Madrid, España: Editorial Mundi-Prensa, 1996. 604 p.

MÁRQUEZ, José; GARCIA, Carmen. "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*. Vol. 27, N° 2, 2007. p. 108-111.

MARTEGANI, Héctor. *Elaboración general de quesos* [en línea]. Portal Lechero, 2006. [Ref. Marzo del 2009]. Disponible en Web: <<http://www.portalechero.com>>

MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, Beatriz. *Bacteriocinas de Lactococcus lactis aislados de quesos asturianos: nisina z y lactococina 972*. Oviedo – España, 1996. Tesis doctoral. Universidad de Oviedo.

MEJÍA R., José, et al. "Obtención de cepas de *Lactobacillus*: Caracterización IN-VITRO como potencial probióticas". *Revista Científica*. Vol. 17, N° 2, 2007. p. 178-185. ISSN 0798-2259.

MONROY D., María del Carmen, et al. "Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas". *Revista científica Contactos*. Vol. 73, edición julio/septiembre, 2009. p. 63 –72.

MUÑOS ROJAS, Jesús. *Bacteriocinas: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano*. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuernavaca, 2003. 20 p.

NAVARRETE MONTECINOS, Carolina Edith. *Efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* sobre la maduración de *Gauda reducido en grasa**. Tesis de pre grado. Universidad Austral de Chile. Valdivia–Chile, 2007.

NORMA OFICIAL MEXICANA. *Determinación de pH en alimentos*. NMX-F-317-S-1978. México. Secretaria de Salud, 1978.

NOVOA, F.; LÓPEZ, C. "Evaluación de la vida útil sensorial del queso doble crema con dos niveles de grasa". *Revista Medica Veterinaria y Zootecnia CES*. Vol. 55, 2008. p. 91-99.

PÁEZ DELGADO, Claudia. *Determinación de coliformes fecales y totales en expendio de alimentos en establecimientos formales en el macrodistrito centro de la ciudad de La Paz*. Tesis de pre grado. Universidad Mayor de San Andres. La Paz – Bolivia, 2009.

NUÑEZ, Griselda, et al. 2007. "Efectividad y modo de acción de Nisina sobre *Lactobacillus fructivorans*". *Revista Mundo Lácteo y Cárnico*. Edición Marzo/Abril 2007. p. 28-30.

RAMÍREZ, Socorro, et al. *Aislamiento y Detección de la Actividad Antimicrobiana de Bacterias Ácido Lácticas (BAL) Aisladas de Quesos*. VII

Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos. 13va edición. Guanajuato – México, 2005. p. 279-284.

REVILLA, Aurelio. *Tecnología de la leche. Procesamiento, Manufactura y Análisis*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 2da edición. San José – Costa Rica, 1982. 400 p.

RODRÍGUEZ MEMBIBRE, María Luisa. *Bacterias productoras de ácido láctico: efectos sobre el crecimiento y la flora intestinal de pollos, gazapos y lechones*. Tesis de pre grado. Universidad Complutense de Madrid. Madrid – España, 1994.

ROJAS, Carolina; VARGAS, Pedro. "Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria". *Revista Tecnología en Marcha*. Vol. 21, Nº 2, edición Abril-Junio, 2008. p. 9-16.

SCHLIMME, E.; BUCHHEIM, W. *La leche y sus componentes: Propiedades químicas y físicas*. Traducción: López Buesa, Pascual. Zaragoza – España: editorial Acribia, 2002. 120 p. ISBN 84-200-0992-X.

URI, Joseph. "Is Escherichia coli ATCC 25922 a colicin producing strain?". Departamento de Microbiología e Inmunología. Colegio de

Medicina Osteopática. Philadelphia – EEUU. *Acta Microbiol Immunol Hung.* Vol. 41, N° 2, 1994. p. 215-219.

VALENCIA, Francia, et al. “Estimación de la vida útil fisicoquímica, sensorial e instrumental de queso crema bajo en calorías”. *Revista Lasallista de Investigación.* Vol. 5, N° 1, edición enero-junio, 2008. p. 28-33. ISSN 1794-4449.

VARNAM, A.; SUTHERLAND, J. *Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología.* Zaragoza – España: editorial Acribia, 1994.

VILLEGAS DE GONTE, Abraham. *Tecnología de alimentos de origen animal: Manual de prácticas.* México D.F: editorial Trillas, 2009. 184 p.

ZAMBRANO DÁVALOS, María. *Elaboración de queso fresco con la utilización de un fermento probiótico (Lactobacillus acidophilus).* Tesis de pre grado. Escuela Politécnica Nacional. Quito – Ecuador, 2010.

# ANEXOS

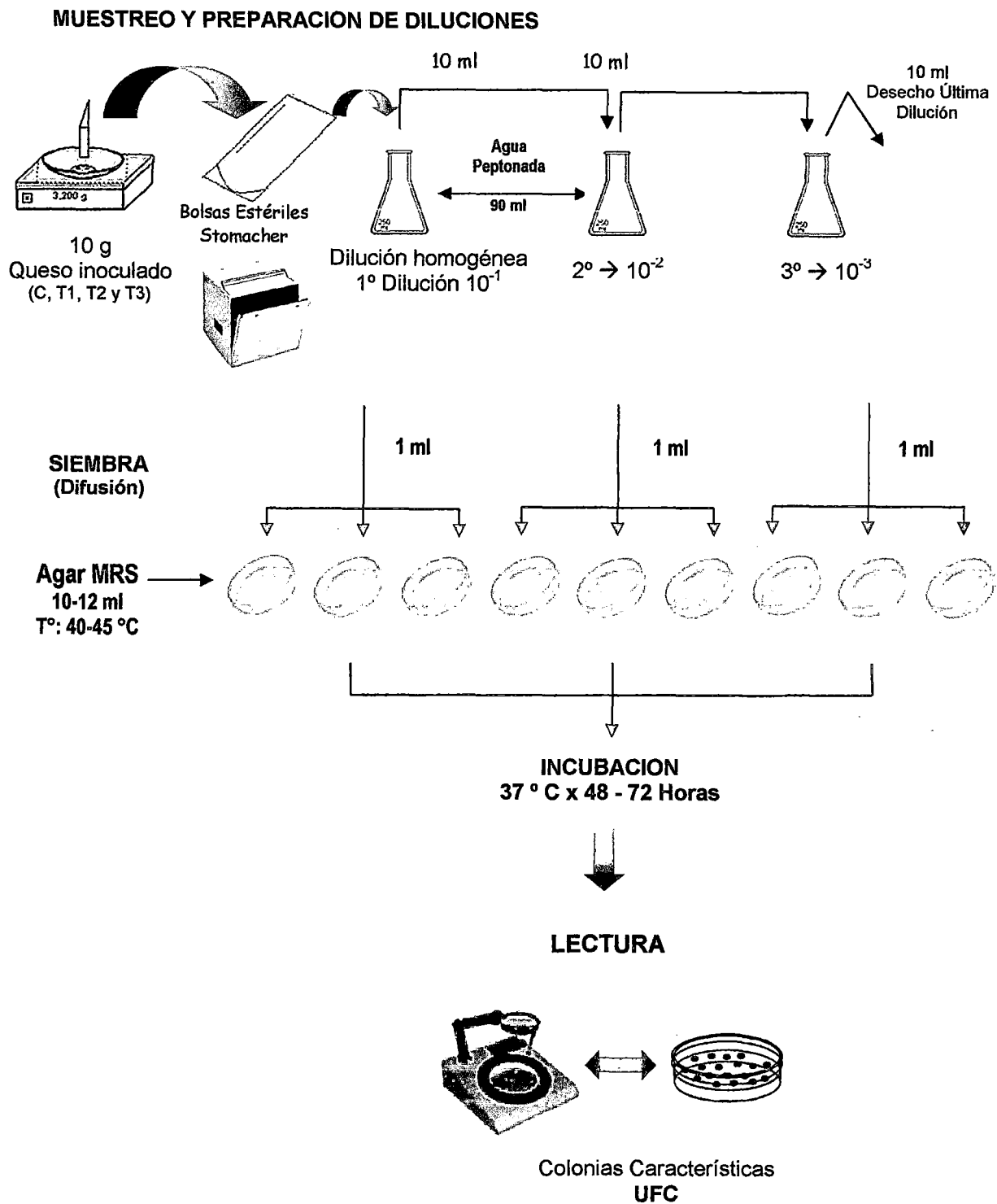


## ANEXO N° 1

**NORMA SANITARIA QUE ESTABLECE LOS CRITERIOS  
MICROBIOLÓGICOS DE CALIDAD SANITARIA E INOCUIDAD PARA  
LOS ALIMENTOS Y BEBIDAS DE CONSUMO HUMANO  
(NTS N° 071 – MINSA/DIGESA-V.01. Página 8)**

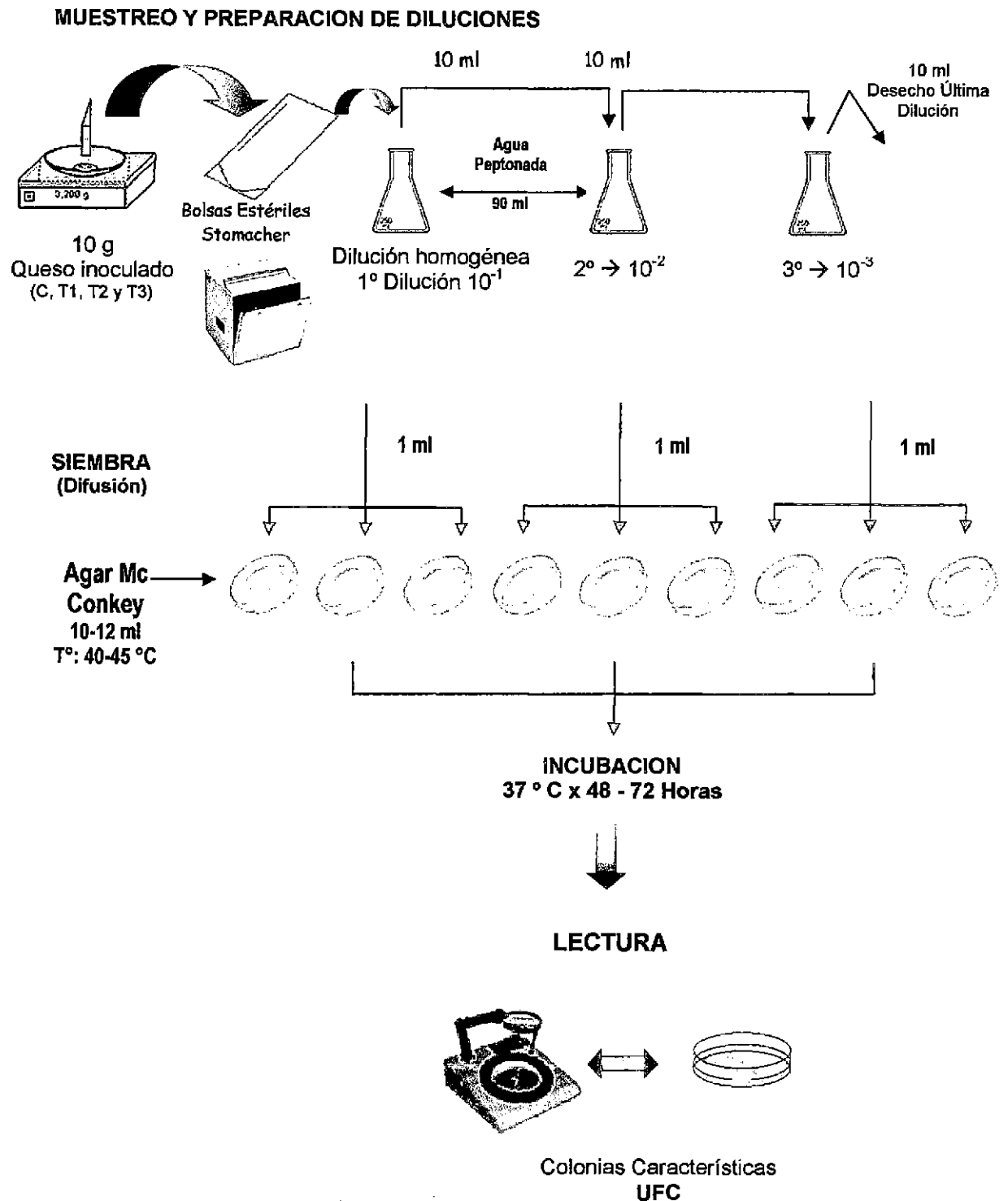
1.8 Quesos no madurados (queso fresco, mantecoso, ricotta, cabaña, crema, petit suisse, mozzarella, ucayalino, otros).						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g	
					m	M
Coliformes	5	3	5	2	$5 \times 10^2$	$10^3$
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	3	5	2	10	$10^2$
<i>Escherichia coli</i>	5	3	5	1	3	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g	—
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g	—
1.9 Quesos madurados (camembert, brie, roquefort, gorgonzola, cuartirolo, cajamarca, tilsit, andino, majes, characato, sabandía, dambo, gouda, edam, paria, emmental, gruyere, cheddar, provolone, amazónico, parmesano, otros).						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g	
					m	M
Coliformes	5	3	5	2	$2 \times 10^2$	$10^3$
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	3	5	1	10	$10^2$
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g	—
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g	—
1.10 Quesos procesados (fundidos: laminados, rallados, en pasta, en polvo).						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g	
					m	M
Coliformes	6	3	5	1	10	$10^2$
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	3	5	1	10	$10^2$

## ANEXO N° 2

PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE *Lactobacillus casei*

Fuente: Ramirez et al, 2005.

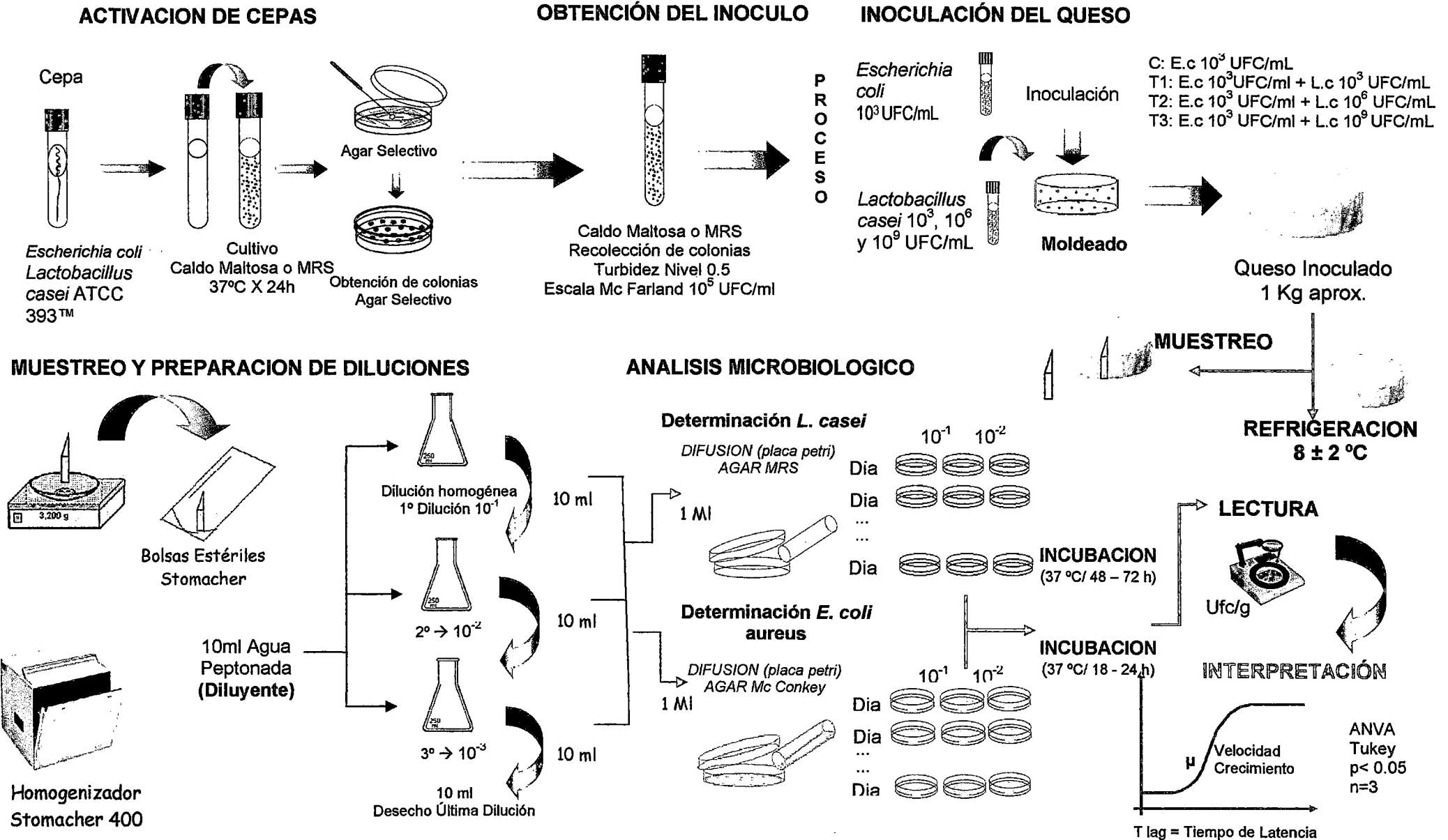
## ANEXO N° 3

PROTOCOLO DE DETERMINACIÓN DE *Escherichia coli*

Fuente: Fangio et al, 2007.

ANEXO N° 4

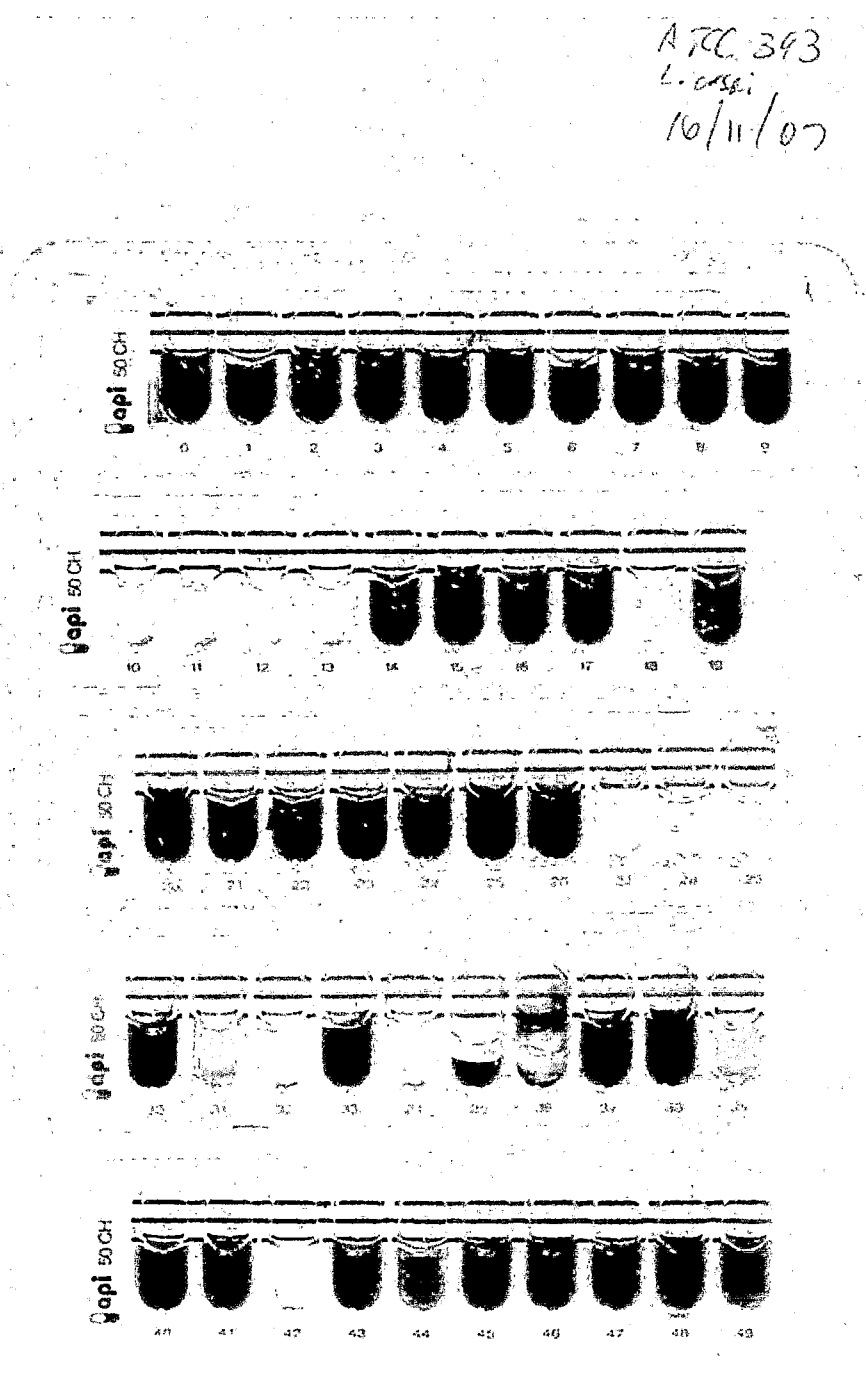
DIAGRAMA EXPERIMENTAL DE LA INVESTIGACION



ANEXO N° 5

IDENTIFICACION DE *Lactobacillus casei* ATCC 393™, MEDIANTE EL SISTEMA DE IDENTIFICACION API

ATCC 393  
*L. casei*  
10/11/07



## ANEXO N° 6

CERTIFICADO DE CALIDAD DE *Lactobacillus casei* ATCC 393™

ATCC NUMBER: 393

ORGANISM: *Lactobacillus casei*

LOT: 2652436

EXPIRATION DATE: 2028-01

PRODUCT DESCRIPTION: Bacterial cells suspended in an appropriate cryoprotectant.

STORAGE: -2°C to -8°C for freeze-dried cultures

-20°C or lower for frozen cultures

Note: Do not store in freezers with a defrost cycle. This will expose the vials to increased temperatures. -80°C or vapor-phase liquid nitrogen (-196°C) is preferred for long-term storage, more than one month.

## QUALITY REQUIREMENTS:

After preservation, sample vials are opened and evaluated for the following attributes:

- Gram stain and cell morphology
- Colony characteristics, as appropriate
- Purity
  - Sample vials are opened and grown using non-selective media. Culture is examined visually and by staining methods after at least 48 hours incubation.
- Viability
  - Sample vials are opened and checked for growth with a concentration of  $>10^4$  cfu/vial.
- Biochemical reactions
  - Sample vials are opened and evaluated with a defined battery of biochemical tests.
- Additional tests including rapid identification schemes and biomolecular analyses may be performed.

All results passed ATCC specifications.

Date: November 10, 2005



Director, Collection Sciences

ATCC hereby represents and warrants that the material provided under this certificate has been subjected to the tests and procedures specified and that the results described, along with any other data provided in this certificate, are true and correct to the best of ATCC's knowledge and belief.

© ATCC, 2005. All rights reserved.

ATCC® is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans.

American Type Culture Collection  
P.O. Box 1549  
Manassas, VA 20108 UE  
www.atcc.org

800-638-6597 or 703-366-2709

Fax: 703-366-2750

E-mail: tech@atcc.org

Or contact your local distributor.

Post-It® Fax Note	1871	Date	11/10	# of pages	3
To	ELENA RAU	From	Tanya		
On Fax					

## ANEXO N° 7

### ESCALA DE McFARLAND<sup>4</sup>

#### Fundamento

El patrón o la escala de McFarland consiste en una serie de tubos herméticamente cerrados, previamente calibrados y con una densidad óptica diferente originada por la aparición de un precipitado de sulfato de bario ( $\text{SO}_4\text{Ba}$ ) resultante de la reacción entre el cloruro de bario ( $\text{Cl}_2\text{Ba}$ ) al 1,175% (0,048 M) y el ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 1% (0,36N). Esta turbidez puede interpretarse ópticamente o por métodos espectrofotométricos y cada una de ellas se corresponde a una concentración conocida de bacterias/mL. Para cada cepa bacteriana hay que establecer la equivalencia entre la turbidez de cada tubo y la masa o la concentración de bacterias (cél/mL) que genera una turbidez similar.

#### Conservación

El estándar de McFarland puede ser almacenado hasta por 6 meses en la oscuridad y a temperatura ambiente entre 22° a 25°C. Sin embargo, se recomienda almacenarse a ser posibles en refrigeración.

#### Cuidados

---

<sup>4</sup> Cabeza H. Enrique. (2008). "Manual Teórico Practico de Microbiología Predictiva".

Descartar después de 6 meses o antes si su volumen es menor. Antes de cada uso, debe agitarse muy bien usando un shaker, hasta que el precipitado blanco de sulfato de bario se haya disuelto en todo el medio. Para asegurar la densidad del estándar de McFarland así preparado puede ser chequeado usando un espectrofotómetro con una celda de cuarzo de 1-cm; para el estándar 0,5 de McFarland, la absorbancia a una longitud de onda de 625 nm puede estar entre 0,08 a 0,1. Alternativamente, el aseguramiento del estándar de McFarland puede ser verificado por ajuste de una suspensión de una cepa control (por ejemplo, *E. coli* ATCC 25922) a la misma turbidez, preparando diluciones seriadas 1:10, y realizando el respectivo recuento en placa. La suspensión así ajustada puede tener un conteo de  $1,5 \times 10^8$  ufc/ml. Para levaduras el estándar 0,5 de McFarland es equivalente a una suspensión de  $10^6$  ufc/ml.

### **Preparación**

Se adicionan cantidades crecientes (o decrecientes según corresponda) de  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 1,175% (p/v) en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 1% (v/v) de acuerdo a la siguiente tabla para obtener la equivalencia deseada:

Los estándares de turbidez se prepararán en tubos similares a los que se emplearan para preparar la suspensión del inoculo. Después, el tubo



debe ser bien tapado usando una tapa rosca con teflón, Parafilm, o algún otro medio que evite la evaporación del mismo. Esta escala de  $3 \times 10^8$  a  $3 \times 10^9$  bacterias por mL es de gran utilidad en cuanto que, en la mayoría de los experimentos, los conteos quedarán dentro de estos límites, excepto en los casos de muy bajo crecimiento.

Escala de McFarland	BaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (0.048M)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.36N)	mL final	[ ] celular
1	0,1	9,9	10,0	$3 \times 10^8$
2	0,2	9,8	10,0	$6 \times 10^8$
3	0,3	9,7	10,0	$9 \times 10^8$
4	0,4	9,6	10,0	$12 \times 10^8$
5	0,5	9,5	10,0	$15 \times 10^8$
6	0,6	9,4	10,0	$18 \times 10^8$
7	0,7	9,3	10,0	$21 \times 10^8$
8	0,8	9,2	10,0	$24 \times 10^8$
9	0,9	9,1	10,0	$27 \times 10^8$
10	1,0	9,0	10,0	$30 \times 10^8$