



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**“ADICIÓN DE NISINA A QUESO FRESCO ARTESANAL PARA DISMINUIR LA  
CARGA MICROBIANA”**

**TESINA**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**ESPECIALISTA EN TECNOLOGÍA E INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

ING. ALIMENTOS. ANDREA ANGÉLICA ROMERO HESQUIO

**DIRECTOR (A):**

D. C. IVONNE PÉREZ XOCHIPA

**CODIRECTOR (A):**

D. C. LAURA MORALES LARA

MARZO, 2019.



**BUAP**

**ESPECIALIDAD EN TECNOLOGÍA E INOCUIDAD DE ALIMENTOS**

**Dr. Jorge Raúl Cerna Cortez**  
**Director de la Facultad de Ciencias Químicas**  
**PRESENTE:**

Con toda atención comunico que el alumno de la Especialidad en Tecnología e Inocuidad de los Alimentos:

**I.A. Andrea Angélica Romero Hesiquio**  
**(217670794)**

Toda vez que cuenta con la aprobación del maestro:


D.C. Ivonne Pérez Xochipa  
D.C. Laura Morales Lara

Se autoriza su proyecto de **Tesina** denominado:

**"Adición de nisina a queso fresco artesanal para disminuir la carga microbiana."**

Con esta fecha queda registrada en la Dirección de esta Facultad para los fines legales que al interesado convengan.

**Atentamente**  
**"Pensar bien, para vivir mejor"**  
**H. Puebla de Z., a 20 de junio de 2018**

  
**D.C. Ivonne Pérez Xochipa**  
**Coord. de la Especialidad en Tecnología e Inocuidad de los Alimentos**



**BUAP**

ESPECIALIDAD EN TECNOLOGÍA E INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS

M.C. Gloria León Tello

D.C. Juan Carlos Benítez Serrano

M.C. Gonzalo A. Flores Mendoza

**Docentes de la Especialidad en Tecnología e Inocuidad de los Alimentos.  
PRESENTE:**

Con toda atención comunico a Uds. que el comité académico de la especialidad, consideró proponerlos como integrantes de la Comisión Revisora de la alumna:

**I.A. Andrea Angélica Romero Hesiquio**

Cuyo proyecto de **TESINA** se denomina:

“Adición de nisina a queso fresco artesanal para disminuir la carga microbiana”

Solicitándoles que en el término de una semana emitan el dictamen correspondiente.

**Atentamente**

“Pensar bien, para vivir mejor”

H. Puebla de Z., a 12 de febrero de 2019.

D.C. Ivonne Pérez Xochipa

Coord. de la Especialidad en Tecnología e Inocuidad de los Alimentos





**BUAP**

**ESPECIALIDAD EN TECNOLOGÍA E INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS**

**Dr. Jorge Raúl Cerna Cortez**  
**Director de la Fac. de Cs. Químicas**  
**PRESENTE:**

Los que suscriben, integrantes de la comisión revisora de la **Tesina** del alumno del posgrado  
Especialidad en Tecnología e Inocuidad de los Alimentos:

**I.A. Andrea Angélica Romero Hesiquio**

Comunican a usted la aprobación de la misma con la siguiente redacción:

**"Adición de nisina a queso fresco artesanal para disminuir la carga microbiana"**

Con esta fecha queda registrada en la Dirección de esta Facultad para los fines legales que  
al interesado convengan.

**M.C. Gloria León Tello**

**D.C. Juan Carlos Benítez Serrano**

**M.C. Gonzalo A. Flores Mendoza**

**Atentamente**  
**"Pensar bien, para vivir mejor"**  
**H. Puebla de Z., a 21 de marzo de 2018**



**BUAP**

**MTRA. MARIA ELENA RUIZ VELASCO  
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E**

Por este medio me permito saludarle y a su vez comunicarle los nombres de los integrantes del **H. Jurado de Examen de Grado** que sustentará la **I.A. ANDREA ANGÉLICA ROMERO HESQUIO**, pasante de la **Especialidad en Tecnología e Inocuidad de los Alimentos**. El cual se realizará el día 09 de Abril de 2019 a las 16:00 horas en el Salón de Usos Múltiples de la Facultad de Ciencias Químicas.

**JURADO**

M.C. GLORIA LEON TELLO  
D.C. JUAN CARLOS BENITEZ SERRANO  
M.C. GONZALO A. FLORES MENDOZA

Se extiende la presente para los fines que haya lugar.

**ATENTAMENTE**  
**"PENSAR BIEN PARA VIVIR MEJOR"**  
**H. PUEBLA DE Z., A 22 DE MARZO DE 2019**

**DR. JORGE RAÚL CERNA CORTEZ  
DIRECTOR**



Facultad  
de Ciencias  
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9  
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel  
Puebla, Pue. C.P. 72540  
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390 y 01 (222) 244 31 06

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
I. RESUMEN .....	1
II. INTRODUCCIÓN .....	2
III. ANTECEDENTES .....	4
3.1 Queso fresco artesanal .....	4
3.1.1 Proceso de elaboración del queso fresco artesanal .....	5
3.1.2 Control de calidad en la industria láctea .....	6
3.1.3 Factores que influyen en el crecimiento microbiano en el queso.....	7
3.1.4 Presencia de microorganismos en alimentos .....	7
3.1.5 Principios de control microbiológico de los alimentos .....	9
3.2 Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	9
3.2.1 Bacterias lácticas en la conservación .....	10
3.3 Bacteriocinas.....	10
3.3.1 Bacteriocinas en la industria alimentaria.....	11
3.4 Nisina .....	12
3.4.1 pH de un queso fresco con nisina.....	14
3.5 Almacenamiento en frío .....	15
3.6 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA).....	15
3.6.1 Causas y tipos de ETA .....	16
IV. JUSTIFICACIÓN.....	18
V. OBJETIVOS.....	19
5.1 General .....	19
5.2 Específicos.....	19
VI. DIAGRAMA DE TRABAJO .....	20

VII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
7.1 Material .....	21
7.1.1 Material biológico .....	21
7.2 Métodos .....	21
VIII. METODOLOGÍA .....	22
8.1 Elaboración de queso fresco artesanal .....	22
8.2 Determinación de pH .....	23
8.3 Análisis microbiológico .....	23
8.3.1 Vertido en placa para coliformes totales .....	24
8.3.2 Técnica de NMP para <i>Escherichia coli</i> .....	25
8.3.3 Técnica de extensión en superficie para <i>Staphylococcus aureus</i> .....	26
8.3.4 Técnica de vertido en placa para mohos y levaduras .....	26
8.3.5 Inoculación intencionada de <i>Salmonella</i> entérica ATCC 14028 .....	27
8.3.5.1 Evaluación de <i>Salmonella</i> entérica ATCC 14028 .....	28
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
9.1 Análisis microbiológico de queso fresco artesanal a 7 días de su producción .....	29
9.1.1 Coliformes totales .....	31
9.1.2 <i>Escherichia coli</i> .....	33
9.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	34
9.1.4. <i>Salmonella</i> entérica ATCC 14028 .....	35
9.1.5 Mohos y levaduras .....	38
9.2 Evaluación de la influencia del pH.....	40
X. CONCLUSIONES .....	41
XI. RECOMENDACIONES .....	42
XII. REFERENCIAS .....	43

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
Cuadro 1. Bacteriocinas utilizadas en la industria alimentaria.....	12
Cuadro 2. Aplicación de la nisina en la industria alimentaria. ....	14
Cuadro 3. Determinación de pH en queso fresco artesanal.....	23
Cuadro 4. Métodos para la determinación microbiológica del queso fresco artesanal...23	
Cuadro 5. Evaluación microbiológica realizada a quesos frescos artesanales con y sin nisina, realizadas a los 7 días de su producción. ....	30
Cuadro 6. Evaluación de coliformes totales en quesos frescos artesanales con y sin nisina, realizadas a los 7, 14 y 21 días de su producción. ....	32
Cuadro 7. Evaluación de <i>Salmonella</i> ATCC 14028 en quesos frescos artesanales con y sin nisina, realizadas a los 7, 14 y 21 días de su producción. ....	37
Cuadro 8. Evaluación de Mohos y levaduras en quesos frescos artesanales con y sin nisina, realizadas a los 7, 14 y 21 días de su producción. ....	39
Cuadro 9. Evaluación del pH en quesos frescos artesanales, a los 7, 14 y 21 días de su producción.....	40

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Proceso de elaboración de queso fresco artesanal. (Gunasekaran et al., 2003) .....	6
Figura 2. Estructura primaria de la nisina (Cotter et al., 2005). .....	13
Figura 3. Diagrama de proceso de elaboración de queso fresco artesanal (100 g). .....	22
Figura 4 Técnica de vertido en placa para coliformes totales.....	24
Figura 5 Técnica de NMP para búsqueda de <i>Escherichia coli</i> . .....	25
Figura 6 Técnica de extensión en superficie para <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	26
Figura 7 Técnica de vertido en placa para mohos y levaduras. ....	26
Figura 8 Estándar 0.5 de McFarland. ....	27
Figura 9 Diagrama de proceso para inoculación intencionada de <i>Salmonella</i> ATCC 14028 a queso fresco artesanal. ....	27
Figura 10 Técnica modificada para el recuento de <i>Salmonella</i> ATCC 14028. ....	28
Figura 11. Evaluación de coliformes totales a quesos frescos artesanales. ....	33
Figura 12. <i>Escherichia coli</i> en medio EC MUG, con prueba de indol negativa. ....	34
Figura 13. <i>Staphylococcus aureus</i> , resultado negativo. ....	35
Figura 14. Evaluación de <i>Salmonella</i> ATCC 14028 en quesos frescos artesanales. ....	38
Figura 15. Evaluación de mohos y levaduras en quesos frescos artesanales. ....	39

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a Dios por cuidarme, darme salud, brindarme apoyo, tener fé en él y las bendiciones que me ha dado.

Agradezco profundamente a mis padres principalmente por acompañarme siempre a lo largo de mis estudios, por ser mi fortaleza en momentos de debilidad, por cuidarme, apoyarme en cada meta que me propongo y darme la oportunidad de tener una excelente educación, por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias, fé, felicidad y amor hacía lo que realizo cada día.

A mi hermano, pues me ha apoyado en los momentos más difíciles desde siempre, motivándome a ser una mejor persona y además de ser mi consejero. Te quiero y siempre voy a estar para ti, gran parte de ti es que se cumple esta meta.

Gracias a la Dra. Ivonne Pérez Xochipa, Dra. Laura Morales Lara y a la Maestra Laura Martínez Pérez, por brindarme apoyo durante la realización de mi proyecto, quienes me han guiado en el complicado proceso. Es cierto, no ha sido nada fácil, ni mucho menos, sin embargo, gracias a su ayuda, esto ha parecido un tanto menos complicado. Que lo que he aprendido de ustedes me servirá en un futuro. Que dios las bendiga.

A mis compañeros por brindarme su apoyo, cariño y amistad, así pase el tiempo, siempre los recordare como buenos amigos. Me los llevare siempre en el corazón y les deseo mucho éxito en las metas que planeen a futuro.

Gracias a todos por que por ustedes estoy en la etapa final de una meta más de mi vida.

## I. RESUMEN

La leche constituye un excelente sustrato para la proliferación de microorganismos debido a su alto contenido de nutrientes, el consumo de los productos artesanales que derivan de ella pueden representar riesgos para la salud pública al ser un vector para la transmisión de toxiinfecciones alimentarias, que son enfermedades transmitidas por los alimentos, causadas ya sea por microorganismos patógenos o por las toxinas que estos producen y por lo que este trabajo tuvo como objetivo reducir la carga microbiana presente mediante la adición de nisina, un antimicrobiano obtenido por bacterias ácido lácticas, así como evaluar su efecto en la vida de anaquel en los quesos elaborado de manera artesanal.

Quesos frescos artesanales fueron elaborados con nisina a tres concentraciones (0.93, 0.62 y 0.31 mg), al identificar la concentración que disminuyó la carga microbiana de manera más eficiente, el producto elaborado fue analizado durante 21 días para evaluar la efectividad del antimicrobiano para inhibir el desarrollo de microorganismo patógenos, para lo cual se realizaron pruebas microbiológicas para la determinación de Coliformes totales, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* entérica ATCC 14028 y mohos y levaduras cada 7 días durante un periodo de 21 días de su producción. Los resultados mostraron que el antimicrobiano fue efectivo para disminuir la carga microbiana de Coliformes totales y *Salmonella*, adicionándolo al producto elaborado a una concentración de 0.93 mg, valor permitido por el CODEX Alimentarius.

Cabe mencionar que no hubo presencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y en cuanto mohos y levaduras no hubo disminución de UFC. Como conclusión de este trabajo, se demostró que la nisina disminuyó considerablemente la carga microbiana, dando como resultado la efectividad del antimicrobiano y que es una opción factible para parte de la preservación de alimentos que no se sometan a un tratamiento térmico.

## II. INTRODUCCIÓN

El queso fresco artesanal es un derivado lácteo que predomina en la dieta de los mexicanos y de acuerdo con la PROFECO y FAO/OMS está considerado como producto lácteo obtenido por medio de coagulación del cuajo u otros agentes coagulantes en relación (proteína-caseína), facilitando la concentración de sólidos y produciendo el suero de leche, con alto valor nutritivo en proteínas y grasa la cual aporta energía, sabor suave y con un elevado contenido de humedad, por lo que su periodo de vida de anaquel es corto y así mismo expuesto al rápido crecimiento de microorganismo patógenos.

Los quesos frescos pueden ser vehículo de microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* ATCC 14028, *Clostridium botulinum* y *Listeria monocytogenes* (Vázquez *et al.*, 2009), debido a las condiciones sanitarias en las que se desarrolla el proceso artesanal, por lo que la leche puede ser un producto riesgoso para el consumidor por ser una fuente de contaminación.

Existen diversos factores que causan modificaciones en las propiedades del queso fresco artesanal, como la calidad de la materia prima, el tipo de proceso, las condiciones de almacenamiento y alteraciones por microorganismos que puedan causar efecto negativo al consumidor; por lo que es factible la adición de un conservador natural como la nisina (E-234), una bacteriocina obtenida de las bacterias ácido lácticas (BAL). Las BAL son bacterias Gram positivas, no formadoras de esporas, sin motilidad, tienen forma de cocos o bacilos, microaerófilicos o anaerobios facultativos y sintetizan ácido láctico durante su fermentación (Monroy *et al.*, 2009). Las bacteriocinas se definen como péptidos de origen proteico sintetizadas por BAL que a bajas concentraciones inhiben a microorganismos patógenos, mismos que alteran la calidad y seguridad del alimento. La nisina producida por *Lactococcus lactis*, es la bacteriocina (clase I lantibióticos) termorresistente más importante y aprobada por la FDA para la conservación y mejora de alimentos, así mismo, impidiendo una ETA y prolongando el tiempo de vida útil.

La conservación del almacenamiento en frío a temperatura de 4°C también permite preservar alimentos para inhibir o retardar el crecimiento microbiano, controlando factores como  $A_w$ , crecimiento microbiano, pH, etc.

En este proyecto se aumentó la vida de anaquel y preservó el producto higiénicamente fresco, al disminuir la carga microbiana en presencia de nisina.

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 Queso fresco artesanal

El queso fresco de acuerdo con el *Codex Alimentarius*, es un producto sólido, semisólido, su valor con respecto a la relación suero proteína/caseína no supera al de la leche, y es obtenido por coagulación total o parcial de la leche por medio de la acción del cuajo o de otros agentes coagulantes adecuados, con un escurrido parcial del lactosuero (Scott, 1998).

Desde el aspecto fisicoquímico el queso es un sistema tridimensional tipo gel, formado básicamente por la caseína integrada en un complejo caseinato fosfato cálcico, que por coagulación engloba glóbulos de grasa, agua, lactosa, albúminas, globulinas, minerales y otras sustancias menores de la leche, las cuales permaneces absorbidas en el sistema o se mantienen en la fase acuosa retenida (Walstra, 2006).

La humedad del queso fresco es de 46 - 57%, contiene 18 - 29 % de grasa, 17% de proteína, sal 1 – 3% y pH mayor a 6.1. Se le conoce con distintos nombres, se vende en diferentes presentaciones, según la región se conocen diferentes técnicas de elaboración. De acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-243-SSA1-2010 el queso se caracteriza por su contenido elevado de humedad, sabor suave y un corto periodo de vida anaquel, por lo que debe ser refrigerado resultando un alimento altamente perecedero; es un derivado lácteo que no ha sufrido del proceso de maduración por lo que puede tener un sabor a leche fresca o acidificada (Hwang y Gunasekaran, 2001).

Las propiedades físicas del queso pueden verse afectadas como consecuencia de procesos bioquímicos, tales como proteólisis y lipólisis. Las enzimas involucradas en estos procesos pueden estar presentes en el cuajo, la leche o ser producidas por microorganismos. Entre los principales factores que afectan al producto lácteo están la Aw contenida, el pH, contenido de nutrientes, temperatura y oxígeno disponible para el desarrollo de microorganismos patógenos (Sousa, 2001).

El queso es un alimento con alto contenido de calcio (73%), aporta 9% de calorías, 31% de riboflavina, 33% de fósforo, 19% de proteínas, 16% de magnesio, 21% de cobalamina, 17% de vitamina A, 10% de vitamina B6, 6% de tiamina, vitamina D y B3, por lo que los lácteos son conocidos como alimentos “ricos” o “fuente de muchos nutrientes” (Mahaut *et al.*, 2003).

### **3.1.1 Proceso de elaboración del queso fresco artesanal**

Lo primero en el proceso es la recepción de la leche cruda o bronca, llamada así ya que es recién ordeñada y no ha tenido un tratamiento térmico como el pasteurizado; seguido de un pretratamiento que consiste en la estandarización de la leche (proceso donde se separa la grasa de la leche), la homogenización, el tratamiento térmico, es decir, pasteurización de 65°C durante 30 min con el fin de destruir microorganismos patógenos, después seguido del enfriamiento de la leche a 40°C, llegado a la temperatura adecuada se le adiciona el cultivo iniciador (cuajo) y se incorpora calcio para disminuir las pérdidas de rendimiento y permite obtener una cuajada más firme, a la vez que permite acortar el tiempo de coagulación, se homogeniza por un minuto y se deja reposar para la coagulación (30 min).

Una vez coagulada la leche se corta la cuajada para desuerar, se cuela para empezar a obtener el sólido restante que será el queso, una vez obtenido el sólido total de la cuajada se hace un salado después se moldea y prensa y al final se empaca para la preservación del producto terminado. En la figura 1 se puede observar el proceso de elaboración de queso fresco adaptado por Gunasekaran *et al.*, (2003).

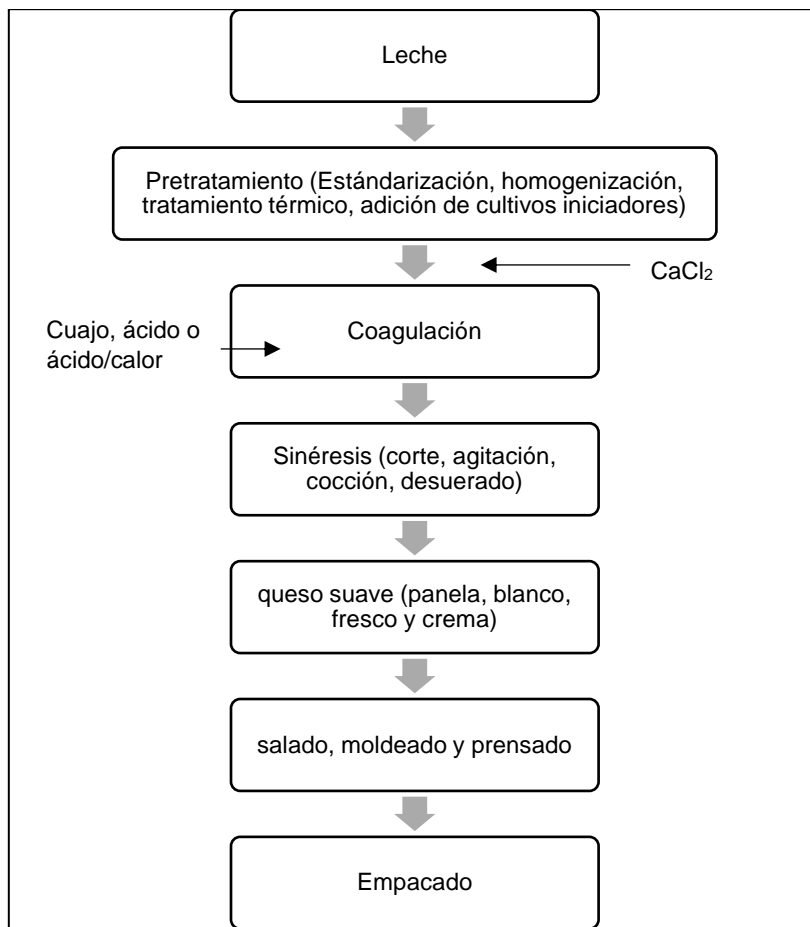


Figura 1. Proceso de elaboración de queso fresco artesanal. (Gunasekaran *et al.*, 2003)

### 3.1.2 Control de calidad en la industria láctea

A través de los años, el hombre se ha obsesionado y preocupado por mantener la salud del consumidor y los adecuados caracteres organolépticos de los alimentos recolectados o procesados. En el siglo anterior se registró un cambio de importancia en estos objetivos a partir de los descubrimientos de Appert y Pasteur, quienes lograron diseñar los primeros métodos de reducción de patógenos y aumento de la conservación de los alimentos. Posteriormente se realizó la industrialización de los procesos de elaboración, más el agregado de “nuevas” tecnologías, tales como la congelación, refrigeración, deshidratación controlada, envasado aséptico, etc. Como consecuencia de ello, la industria, los centros de investigación y los organismos estatales se vieron impulsados a

desarrollar diversos estándares que pudieran definir la clasificación, denominación y condiciones de seguridad que deben presentar los alimentos en sus diferentes presentaciones (Castillo, 2005).

### **3.1.3 Factores que influyen en el crecimiento microbiano en el queso**

De acuerdo con Beresford *et al.*, (2001) el crecimiento de microorganismos en el queso depende de parámetros físicos como humedad, cantidad de sal, aditivos (conservadores),  $A_w$ , pH, ácidos grasos, temperatura de conservación y tipo de envasado. En el crecimiento microbiano influyen factores biológicos como la disponibilidad de nutrientes para el metabolismo microbiano y la interacción en el producto.

El valor de  $A_w$  en los quesos después del saldado depende de la cantidad de sal administrada y el grado de desuerado ya que suelen ser inferiores a 0.98. Al adicionar sal, existe un descenso de la  $A_w$  que inhibe a microorganismos que alteran la vida de anaquel del queso (Martín, 2002).

Los quesos frescos pueden ser vehículo de microorganismos patógenos como Coliformes totales, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, Mohos y levaduras, *Clostridium botulinum* y *Listeria monocytogenes*, debido a que la leche es un alimento rico en nutrientes y una fuente de contaminación por las malas condiciones higiénicas del proceso artesanal por lo que puede ser un producto riesgoso para el consumidor (Vázquez *et al.*, 2009).

### **3.1.4 Presencia de microorganismos en alimentos**

Los alimentos pueden ser contaminados por microorganismos patógenos durante su producción, recolección o a través del uso de utensilios que fueron previamente utilizados para preparar alimentos, lo que puede llevar a una contaminación cruzada. Los microorganismos pueden ser de origen endógeno, es decir, que se encuentran en el

interior del alimento, por ejemplo: *Salmonella*, *Vibrio* spp., *Staphylococcus aureus*, entre otros. Y de origen exógeno cuando se incorporan al alimento durante su manipulación y procesado, un ejemplo de ello es cuando los operarios manipulan el producto durante todas las etapas del procesado, obtención, transformación, almacenaje y distribución (Larrañaga, 2009).

En particular la *Salmonella* es un patógeno importante que se ha encontrado en quesos frescos de leche cruda y pasteurizados, llega a éstos por diversos medios y constituye un problema serio en la calidad de este producto.

En ese sentido a través de la reglamentación oficial, Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, formula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba., se ha insistido en que la problemática en la producción artesanal dañe a los procesos de elaboración de queso pueden llevar a la falta de inocuidad en el producto, así como a las malas prácticas agropecuarias, de manufactura, de distribución del producto e incluso en la venta, y en la cadena de distribución que pueden generar contaminación de los quesos artesanales.

Por lo anterior existe la necesidad de buscar una alternativa a la pasteurización de la leche con que se elaboran los quesos, una de ellas podría ser la fermentación ácido láctica generada por las bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en la microflora nativa de la leche puede inhibir a un patógeno como *Salmonella* spp. (Scaramelli *et al.*, 2007). Bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de quesos artesanales mexicanos y de otros países, han tenido efectos inhibitorios contra diversos patógenos incluido *Salmonella typhi*. (Del Campo *et al.*, 2008).

Las bacterias ácido lácticas se encuentran presentes en la leche de manera natural, además se ha encontrado que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos como *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, a través de diferentes compuestos generados en la fermentación, siendo el ácido láctico el principal y las bacteriocinas el más efectivo (Piña *et al.*, 2011).

### **3.1.5 Principios de control microbiológico de los alimentos**

La cuantificación de microorganismos indicadores como coliformes totales, permite analizar la calidad microbiológica de los alimentos ya que estos son destruidos por tratamientos de pasteurización, térmicos, y químicos como clorado del agua y con otras opciones de mejora obtenidas de manera natural como el uso de bacterias ácido lácticas. Por esto la presencia de microorganismos patógenos indica fallo en el proceso de elaboración o conservación que pueda ser un problema de salud pública para el consumidor.

Por lo anterior se entiende que debemos atender la seguridad y calidad de los productos alimentarios con el fin de garantizar que los alimentos sean llevados a los consumidores en buen estado. El procedimiento basado en el análisis de riesgo a través de los aspectos de seguridad alimentaria, son importantes ya que se concentra en la prevención de errores en el proceso de elaboración, lo que elimina riesgos de contaminación además de cumplir con las normas de control de calidad (Board, 2006).

### **3.2 Bacterias Ácido Lácticas (BAL)**

Las BAL incluyen cocos y bacilos Gram positivos, ácido tolerantes, la mayoría crece a un pH entre 4.0 y 4.5, generalmente inmóviles, no esporulados, su característica principal es la producción de ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Feria, 2007).

Las BAL son microorganismos utilizados en la industria alimentaria debido a que confieren características sensoriales como textura, olor, sabor agradable y reológicas deseables en los productos lácteos y tienen la capacidad de conservar al alimento de forma natural debido a la producción de diversos metabolitos como el ácido láctico, peróxido de hidrógeno, diacetilo, entre otros (Siamansouri *et al.*, 2013; O'Bryan *et al.*, 2015).

### 3.2.1 Bacterias lácticas en la conservación

Estos microorganismos son generalmente utilizados como cultivos iniciadores en la elaboración y conservación de productos lácteos tales como el yogurt, leche acidificada, mantequilla, crema y quesos; así también como en el procesamiento de carnes, bebidas alcohólicas y vegetales (Tiwari *et al.*, 2010). Las bacterias lácticas se agrupan en homofermentadoras y heterofermentadoras, el primer grupo produce ácido láctico como el producto principal de la fermentación de la glucosa, el segundo grupo convierte hexosas a pentosas produciendo ácido láctico y cantidades significativas de acetato, etanol y CO<sub>2</sub> (Monroy *et al.*, 2009). Entre las principales funciones de las BAL se encuentran: la producción de ácidos, inhibición de microorganismos indeseables, reducción de riesgos higiénicos, coagulación de la leche, reducción del contenido de azúcares, formación de aromas como los producidos por el diacetilo y acetaldehído en la mantequilla, producción de gas requerido para la formación de hoyos en ciertos tipos de quesos y proteólisis necesaria para la maduración de los mismos, además de que disminuyen la lipólisis, lo cual evita la rancidez en los productos lácteos (Jeevaratnam *et al.*, 2010). No obstante, estas bacterias también producen otras sustancias antagonistas dentro de las cuales se destacan el diacetilo, peróxido de hidrógeno, acetaldehído, compuestos no proteicos de bajo peso molecular y las bacteriocinas (Dabes *et al.*, 2009).

### 3.3 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos conformados por un promedio de 34 aminoácidos producidas por BAL, tienen la capacidad de inhibir microorganismos patógenos. El uso de bacteriocinas en los alimentos son importantes para mejorar la biopreservación de los alimentos, prolongar su vida útil, disminuir o eliminar microorganismos patógenos presentes en los alimentos, los cuales afectan sus características organolépticas. Cabe mencionar que bacterias patógenas como *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, entre otros., pueden causar enfermedades en el consumidor. Las bacteriocinas comprenden

un grupo grande y diverso de proteínas o péptidos con actividad antimicrobiana y de origen bacteriano (Monroy *et al.*, 2009).

Las bacteriocinas por parte de las BAL son de interés para la industria alimentaria, ya que son microorganismos seguros para la salud del consumidor y tienen efecto benéfico para la población y en general si son del género *Lactobacillus* por su capacidad para la bioconservación de los alimentos. Las características principales de las bacteriocinas es que son termorresistentes y tolerantes a pH ácido, este vínculo está relacionado debido a que un incremento del pH reduce la estabilidad al calor. Las bacteriocinas son destruidas a pH mayor de 10. La alta tolerancia al calor les permite mantener su actividad después de tratamientos térmicos, pero son parcialmente destruidas a temperaturas mayores de 100°C (Chen y Hoover, 2003).

### **3.3.1 Bacteriocinas en la industria alimentaria**

Actualmente hay una demanda creciente de alimentos mínimamente procesados o de cuarta generación que se basa en el uso de aditivos naturales o que tengan una reducida adición de sustancias artificiales, por lo que la industria alimentaria ha considerado el uso de bacteriocinas producidas por BAL y su potencial antimicrobiano, teniendo en cuenta que es considerado como conservador natural o biopreservador. Se ha observado un gran potencial en la preservación de carne, productos lácteos, alimentos enlatados, pescado, bebidas alcohólicas, ensaladas, huevo, productos de panificación, vegetales fermentados, entre otros., ya sea solos o combinados con otros métodos, algunas de las bacteriocinas utilizadas en la industria se observan en el cuadro 1. Las bacteriocinas pueden ser utilizadas de la siguiente manera: a) Como iniciadores en alimentos fermentados, b) Adicionadas directamente al producto, purificadas o semipurificadas, y c) Como un ingrediente en la elaboración de alimentos (aditivos) (Yost, 2014).

De acuerdo con Gautham y Sharma (2009), las bacteriocinas que serán suministradas en alimentos deben cumplir con ciertos criterios de regulación:

- a) La cepa productora debe estar dentro de la clasificación GRAS (Generally Recognized As Safe), es decir, no asociada a proveer algún riesgo para la salud.
- b) Deben ser reconocidas y aceptadas para su uso en alimentos por una autoridad reguladora.
- c) Deben cumplir con un espectro de inhibición que pueden incluir microorganismos patógenos o tener actividad contra uno en particular.
- d) Su adición en los productos debe de presentar efectos benéficos, tales como mejorar la seguridad, calidad y/o sabor.
- e) Tener una alta actividad antimicrobiana a bajas concentraciones.

Cuadro 1. Bacteriocinas utilizadas en la industria alimentaria.

BAL	Bacteriocina	Microorganismo	Alimento
<i>Enterococcus</i>	Duracina GL	<i>Listeria monocytogenes</i> SCOTTA	Queso artesanal
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Curvaticina FS47	<i>Listeria monocytogenes</i>	Carne molida
<i>Enterococcus</i>	Enterocina AS-48	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Bacillus cereus</i>	Jugo de lechuga. Purés, sopas de vegetales Alimento. infantil a base de arroz
<i>Lactococcus lactis</i>	Nisina	<i>Staphylococcus aureus.</i> <i>Listeria innocua</i> Bacterias Gram positivas y Gram negativas	Leche, productos lácteos
<i>Enterococcus faecalis</i>	Enterocina 226 NWC	<i>Listeria monocytogenes</i>	Queso mozzarella

Beristain, 2012.

### 3.4 Nisina

La nisina (figura 2) es producida por cepas de BAL del género *Lactococcus lactis*, pertenece a la clase I está conformada por lantibióticos de amplio espectro, de bajo peso molecular, con modificaciones post-traduccionales, resistentes a altas temperaturas y con aminoácidos no comunes en su estructura, tales como lantionina, metillantionina, dehidroxilamina y dehidrobutirina (Naghmouchia *et al.*, 2007).

La aplicación de nisina es considerada buena para los alimentos ya que tiene efecto bioconservante y está aprobada por la **FAO**, su dosis aceptable podría ser superior a los 12.5 mg/kg. De acuerdo con el *Codex Alimentarius* está registrada como aditivo (E-234) y se utiliza en alimentos como cárnicos, lácteos, etc. Para la producción de quesos la nisina está permitida a una concentración de 12.5 mg/kg de acuerdo con el Codex Stan 283 (Cotter *et al.*, 2005).

El efecto que tiene la nisina en alimentos como el queso es el de inhibir microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Clostridium* spp., entre otros. Los alimentos que son altamente frescos son propensos a desarrollo de patógenos por lo que en la industria alimentaria es necesario la adición de conservadores y aditivos que puedan erradicar la presencia de dichos microorganismos. La adición de nisina en dosis recomendadas es una alternativa tecnológica para la preservación, inocuidad y calidad de los alimentos.

La acción de la nisina en las bacterias que se encuentran sensibles se realiza en la membrana citoplasmática; esta forma poros que afectan a variables como la fuerza motriz de protones, el pH, la pérdida de iones y la hidrólisis del ATP resultando así la muerte celular, además de que se ha encontrado en estudios científicos que las bacterias Gram negativas son insensibles a la acción de la nisina mediante la adición de agentes quelantes. Este conservador se utiliza para prolongar la vida útil de los alimentos (cuadro 2), evitando la alteración de microorganismos termófilos, disminuyendo la intensidad del tratamiento térmico en alimentos enlatados, sin afectar las propiedades fisicoquímicas y características organolépticas del alimento (Sierra, 2012).

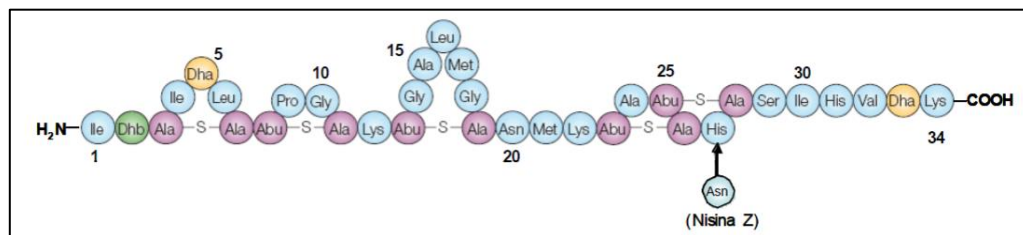


Figura 2. Estructura primaria de la nisina (Cotter *et al.*, 2005).

Cuadro 2. Aplicación de la nisina en la industria alimentaria.

Alimento	Concentración	Microorganismo susceptible
Cerveza	>100 mg/L	<i>Acetobacter aceti</i> CCT2565
	0.8 mg/L	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 9649
	>200 mg/L	<i>Saccharomyces diastaticus</i>
Jugo de manzana y zanahoria	10 UI/ml	<i>Escherichia coli</i> K12
Jugo de naranja	100 UI/ml	<i>Salmonella Typhimurium</i>
Queso cheddar	300 UI/g	<i>Listeria innocua</i>
	300 UI/g	<i>Listeria monocytogenes</i> V7
	300 UI/g	<i>Staphylococcus aureus</i> 196 E <i>Clostridium sporogenes</i> PA 3679

Beristain, 2012.

### 3.4.1 pH de un queso fresco con nisina

De acuerdo con Alonso D. (2002), el control de pH es muy importante en la elaboración de productos alimentarios, tanto como indicador de las condiciones higiénicas como para el control de procesos de transformación. El pH, como la temperatura y la humedad, son de vital importancia para la conservación de alimentos, específicamente el queso fresco, este producto se caracteriza por ser un producto de alto contenido de agua, poco fermentado y con un bajo porcentaje de sal; con un alto potencial en la coagulación láctica o ácida por lo que las bacterias presentes en la leche cruda o procedentes del fermento, transforman la lactosa en ácido láctico haciendo descender el pH de la leche lo que produce la alteración de la caseína hasta la formación de un coágulo. Las bacterias al estar en la leche aumentan su acidez y provocan la disminución del pH al adicionar nisina estamos provocando una inhibición de la actividad bacteriana que se puede relacionar con el pH, lo cual podría contribuir a que el producto lácteo no fermente con rapidez y como resultado prolongue su tiempo de vida de anaquel.

### **3.5 Almacenamiento en frío**

La refrigeración o almacenamiento en frío consiste en la conservación de productos alimenticios a bajas temperaturas: 0°C a 5°C (4°C óptimo), deteniendo el crecimiento de microorganismos termófilos como *Bacillus* y *Clostridium*, mohos y mesófilos. El objetivo de refrigerar los productos alimenticios es mantener la calidad y prolongar el tiempo de vida de anaquel manteniendo la temperatura del producto en un punto donde el deterioro metabólico y microbiológico sea mínimo. Las bacterias patógenas, cuando el alimento no se está en buenas condiciones de almacenamiento, tienden a desarrollar y deteriorar el alimento, causando olores, sabores y texturas desagradables y no aptas para el consumo humano (USDA, 2014). Por lo tanto, un descenso de la temperatura produce un retraso de cambios en los alimentos logrando un buen producto dependiendo las condiciones de almacenamiento y la temperatura a la que este expuesto. El tiempo de refrigeración permite conocer el tiempo necesario para que un producto alcance una temperatura dada en su centro térmico partiendo de una temperatura inicial (Umaña y Eduardo, 2017).

### **3.6 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)**

Las ETA son aquellas enfermedades que se originan por la ingestión de alimentos infectados con contaminantes en cantidades suficientes para afectar la salud del consumidor. Existen numerosos tipos de ETA que presentan diferentes sintomatologías, dependientes del tipo de contaminación y de la cantidad de alimento contaminado consumido. Los signos más comunes son vómitos y diarreas, pero también pueden presentarse dolores abdominales, dolor de cabeza, fiebre, síntomas neurológicos, visión doble y otros. Además, ciertas ETA pueden generar enfermedades crónicas a largo plazo tales como daños renales, artritis, meningitis, aborto y, en casos extremos, la muerte. Las enfermedades de transmisión alimentaria constituyen un grave problema de salud pública a nivel mundial; entre sus causas más frecuentes se encuentran los patógenos bacterianos, los cuales generan desde síntomas gastrointestinales hasta complicaciones que pueden conducir a la muerte (Steniner, 2013).

### 3.6.1 Causas y tipos de ETA

La contaminación, en este contexto, se define como la presencia de cualquier materia anormal en el alimento que comprometa su calidad para el consumo humano o animal. La naturaleza de estos contaminantes es amplia y heterogénea, tanto, que se han descrito más de 250 tipos de ETA (Nyenje y Ndip, 2013). Los contaminantes pueden ser químicos (compuestos inorgánicos tóxicos, antimicrobianos, promotores del crecimiento, aditivos alimentarios tóxicos, lubricantes y tintas, toxinas naturales, desinfectantes, metales pesados, pesticidas y sustancias empleadas en agricultura que no pueden eliminarse con un lavado, o se han sometido al mismo de forma insuficiente), físicos (fragmentos de vidrio, metal, madera, u otros que puedan ocasionar daño al consumidor) o biológicos (bacterias, parásitos, e incluso abióticos como virus y priones). Aunque más del 50 % de estas enfermedades tienen una etiología viral, la mayoría de las hospitalizaciones y muertes se deben a una amplísima gama de representantes bacterianos, responsables de las denominadas toxiinfecciones alimentarias (TIA) (Rodríguez et al., 2011). Las TIA se manifiestan poco después (horas o días) de haber consumido alimentos o bebidas no aptas a ese fin por estar contaminados con microorganismos o sus toxinas. Esto ha posibilitado que se les diferencie de la siguiente forma:

**Infecciones alimentarias:** cuando en el alimento está presente un patógeno que se establece y multiplica en el consumidor. Tiene dos variantes: a) infecciones invasivas: caracterizadas porque el microorganismo coloniza tejidos y órganos del afectado. Este grupo comprende virus, protozoos parásitos y bacterias como *Salmonella*, *Aeromonas*, *Campylobacter*, *Shigella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia* y *Escherichia coli* enteroinvasivas (EIEC) (Barreto et al., 2007). b) Toxiinfecciones: ocasionadas por bacterias no invasivas, pero capaces de colonizar y multiplicarse en el tracto intestinal del hospedero, donde excretan sus toxinas, tal es el caso de: *Vibrio cholerae*, *Bacillus cereus* (cepas productoras de enterotoxinas), *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* y las variantes enteropatógenas de *E. coli* productoras de enterotoxinas, verotoxinas, o ambas (Schmidt et al., 2013).

**Intoxicaciones alimentarias:** debidas a las toxinas producidas por bacterias que se han multiplicado hasta una cierta concentración en el alimento, aspecto controlado por las mismas a través de un mecanismo denominado quorum sensing (Hentzer y Givskov, 2014). Un mayor conocimiento del fenómeno posibilitará la adopción de medidas futuras para el control de esta modalidad de ETA. Las intoxicaciones, en general, se manifiestan más rápidamente, que las infecciones alimentarias. Los microorganismos tipo son: *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* (cepas productoras de la toxina emética) y *Staphylococcus aureus* (Schmidt et al., 2013). Se puede concluir que en las infecciones alimentarias el agente se potencia numéricamente en el consumidor, mientras que en las intoxicaciones alimentarias prevalece en los alimentos. Estas invariantes resultan útiles al estudiar los casos y brotes de ETA.

#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

Los alimentos son contaminados con diferentes tipos de agentes (físicos, químicos y biológicos), la contaminación biológica es la más estudiada, ya que los microorganismos causan la mayoría de las enfermedades transmitidas por alimentos de las cuales se clasifica en infecciones e intoxicaciones alimentarias, causadas ya sea por microorganismos patógenos o por las toxinas que estos producen. La leche constituye un excelente sustrato para la proliferación de microorganismos debido a su alto contenido de nutrientes. Por ello, es de importancia fundamental determinar la calidad higiénica y sanitaria de la leche y sus derivados, entre ellos el queso por ser uno de los de mayor consumo popular en la dieta de los mexicanos.

Por lo que en este trabajo se pretende disminuir y/o eliminar la carga microbiana del queso fresco artesanal con la adición de nisina, debido a que es una bacteriocina con actividad antimicrobiana, es decir, que inhibe o elimina microorganismos patógenos responsables del deterioro inmediato del alimento; está aprobada por la FDA y es la bacteriocina más usada en la preservación de alimentos.

## V. OBJETIVOS

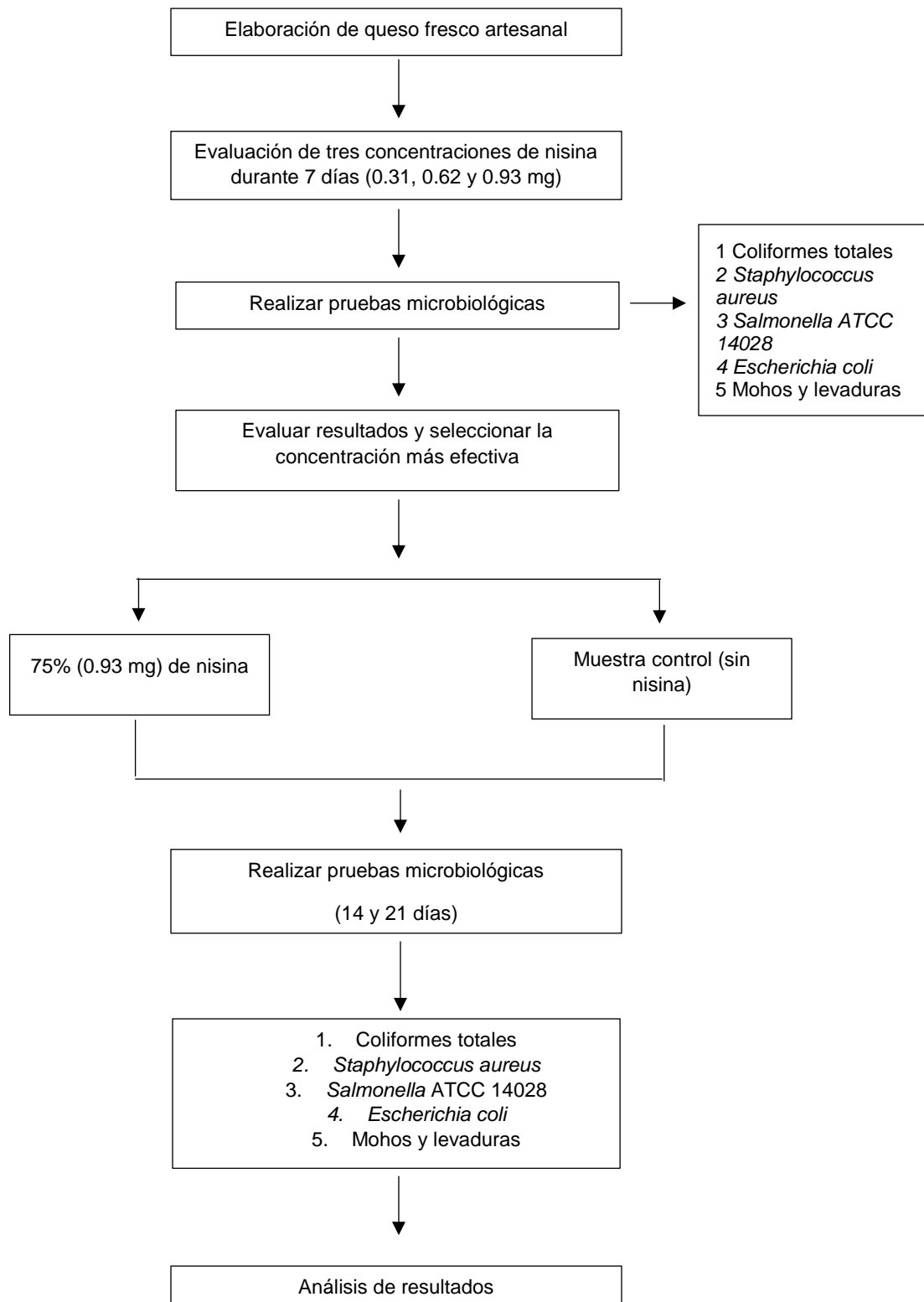
### 5.1 General

- Adicionar nisina a queso fresco artesanal para disminuir la carga microbiana.

### 5.2 Específicos

- Evaluar la disminución de la carga microbiana en quesos frescos artesanales elaborados a diferentes concentraciones de nisina, almacenados en refrigeración durante 7, 14 y 21 días, mediante análisis microbiológico.
- Evaluar la disminución de la carga microbiana en el producto almacenado por 14 y 21 días, cuya concentración de nisina disminuyó la carga microbiana con mayor eficacia en los primeros 7 días de almacenamiento.
- Cuantificar la carga microbiana referente a coliformes totales, *Staphylococcus aureus* y mohos y levaduras mediante las normas NOM-113-SSA1-1994, NOM-115-SSA1-1994 y NOM-111-SSA1-1994 respectivamente.
- Identificar *Escherichia coli* mediante la NOM-112-SSA1-1994.
- Recuperación de *Salmonella* entérica ATCC 14028 mediante un ensayo experimental.

## VI. DIAGRAMA DE TRABAJO



## **VII. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1 Material**

Se utilizó material vítreo comúnmente utilizado en el laboratorio de microbiología, para esterilizar, preparar medios y análisis microbiológicos, así como también medios de cultivo para el desarrollo de pruebas microbiológicas del queso fresco artesanal.

#### **7.1.1 Material biológico**

Se uso leche bronca o cruda para la elaboración del queso fresco artesanal, así como cuajo, cloruro de calcio y nisina comercial como conservador.

### **7.2 Métodos**

En la presente investigación se evaluaron tres diferentes concentraciones de nisina (0.31 mg, 0.62 mg y 0.93 mg) adicionadas a quesos frescos artesanales almacenados por 7 días, mediante pruebas microbiológicas y determinación de pH, con el fin de observar que concentración de nisina fue más efectiva al disminuir y/o inhibir los microorganismos patógenos evaluados, cada 7 días durante un periodo de 21 días. Al seleccionar la concentración con mayor eficacia se procedieron a evaluar una segunda y tercera semana, esto a los 14 y 21 días. Los análisis se realizaron también a muestra control, que no contenían nisina.

## VIII. METODOLOGÍA

### 8.1 Elaboración de queso fresco artesanal

Se elaboraron quesos frescos artesanales de acuerdo al manual para la elaboración de productos derivados de la leche con valor agregado de la SAGARPA, realizando modificaciones para la adición de nisina como antimicrobiano. El diagrama del proceso (figura 3) para la elaboración de queso fresco artesanal para 100 g. de producto, fue el siguiente:

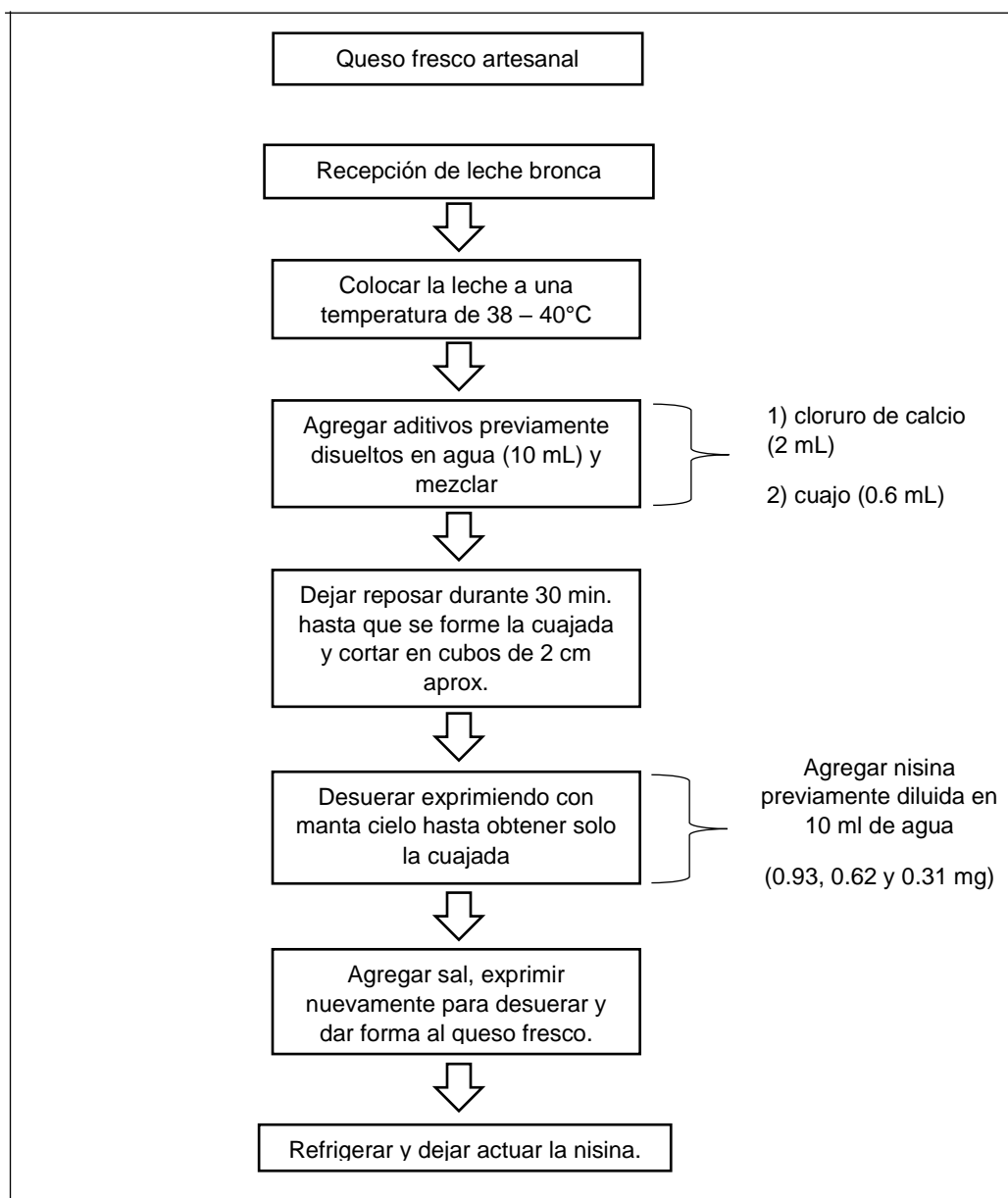


Figura 3. Diagrama de proceso de elaboración de queso fresco artesanal (100 g).

## 8.2 Determinación de pH

La determinación de pH (cuadro 3) se realizó cada 7 días durante un periodo de 21 días aplicando la metodología establecida por Association of Analytical Chemistry. (AOAC, 2000).

Cuadro 3. Determinación de pH en queso fresco artesanal.

Proceso	Método	Referencia
Determinación de pH	Potenciómetro	A.O.A.C. 2000

## 8.3 Análisis microbiológico

Los métodos para realizar las pruebas microbiológicas en queso fresco artesanal se muestran en el cuadro 4, de acuerdo con las Normas Mexicanas establecidas.

Cuadro 4. Métodos para la determinación microbiológica del queso fresco artesanal.

DETERMINACIÓN	TÉCNICA	REFERENCIA
<i>Coliformes totales</i>	Vertido en placa	NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos <i>coliformes totales</i> en placa.
<i>Escherichia coli</i>	NMP	NOM-112-SSA1-1994. Bienes y servicios. Determinación de bacterias <i>Coliformes</i> . Técnica del número más probable.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Extensión en superficie	NOM-115-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> en alimentos.
<i>Salmonella</i> ATCC 14028	Adecuación para su cuantificación	NOM-109-SSA1-1994. Procedimiento para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
		NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

		NOM-114-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de salmonella en alimentos.
<i>Mohos y levaduras</i>	Vertido en placa	NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Métodos para la cuenta de <i>Mohos y levaduras</i> en alimentos.

### 8.3.1 Vertido en placa para coliformes totales

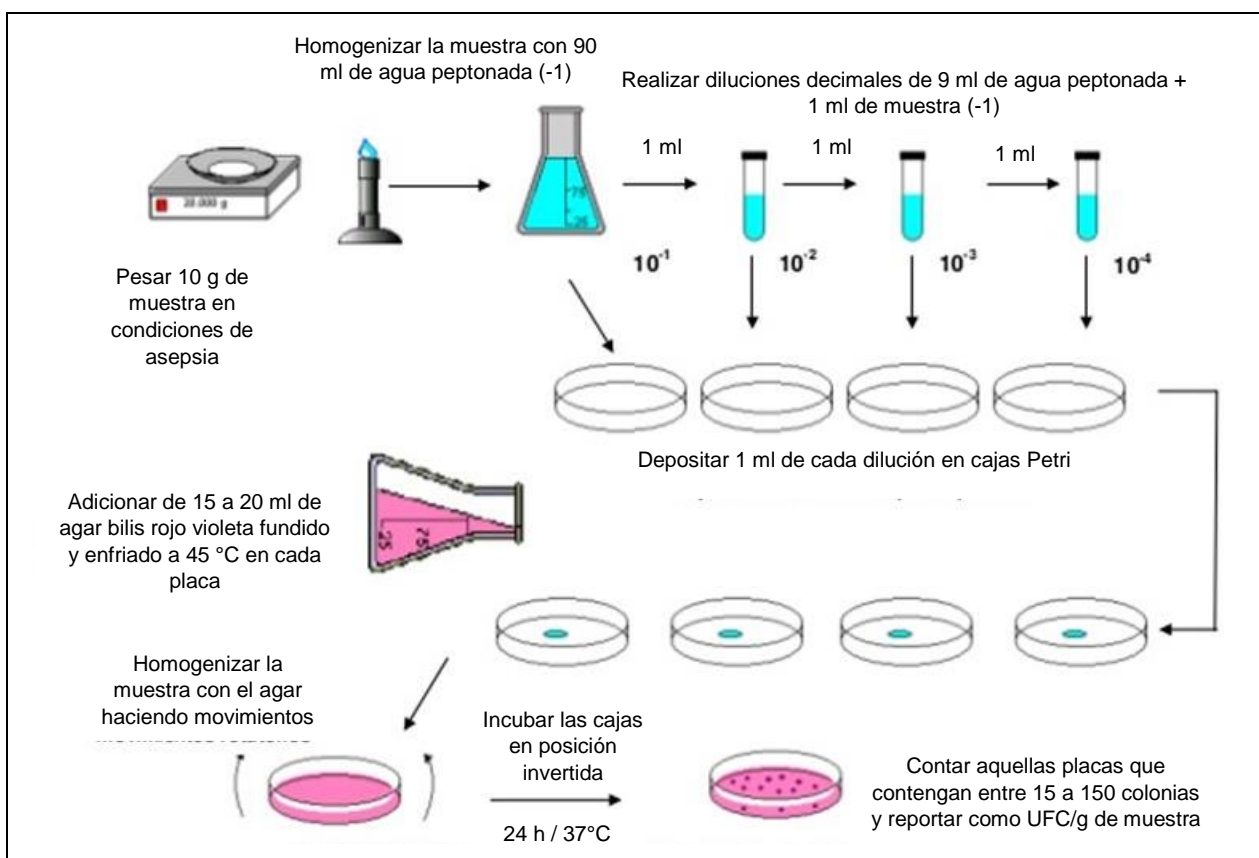


Figura 4 Técnica de vertido en placa para coliformes totales.

### 8.3.2 Técnica de NMP para *Escherichia coli*

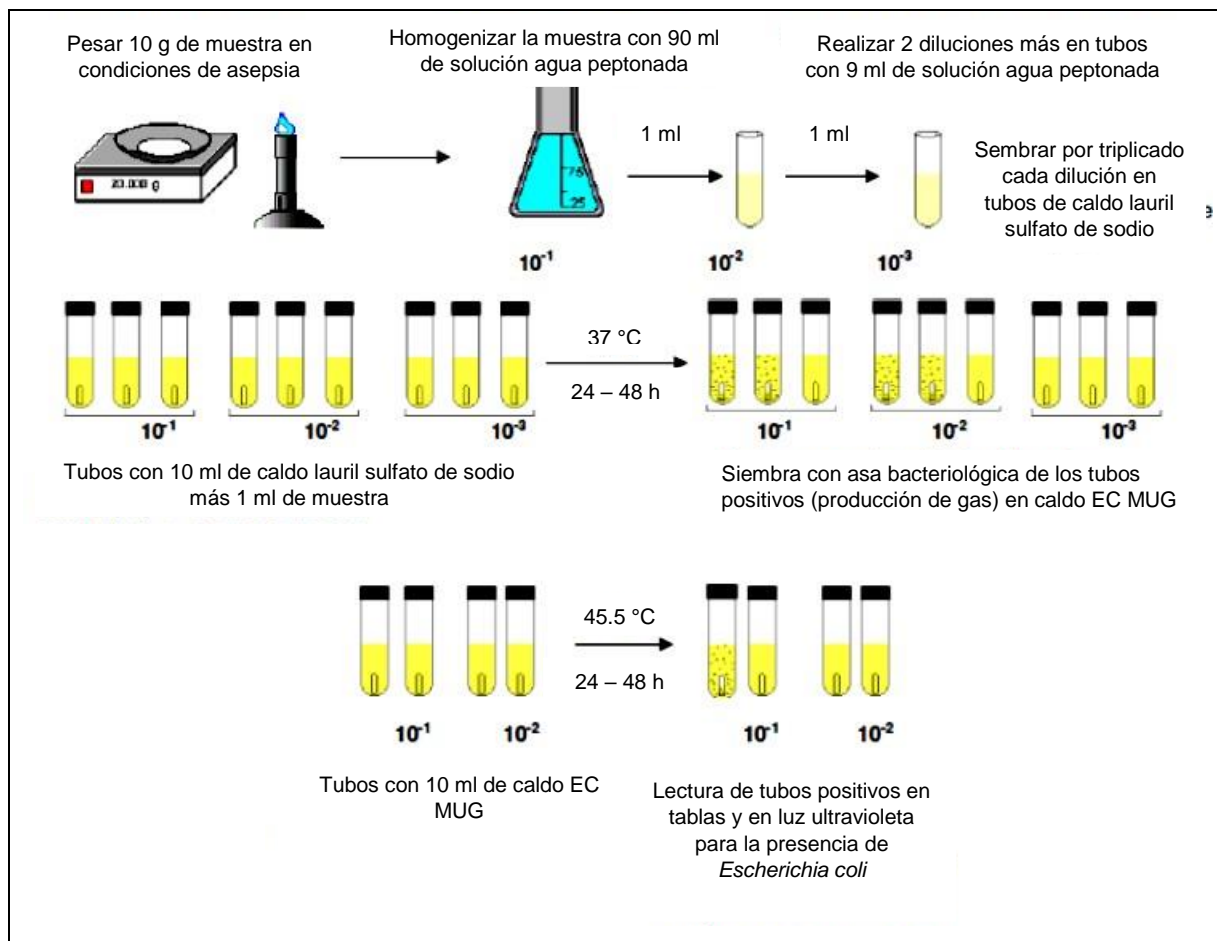


Figura 5 Técnica de NMP para búsqueda de *Escherichia coli*.

### 8.3.3 Técnica de extensión en superficie para *Staphylococcus aureus*

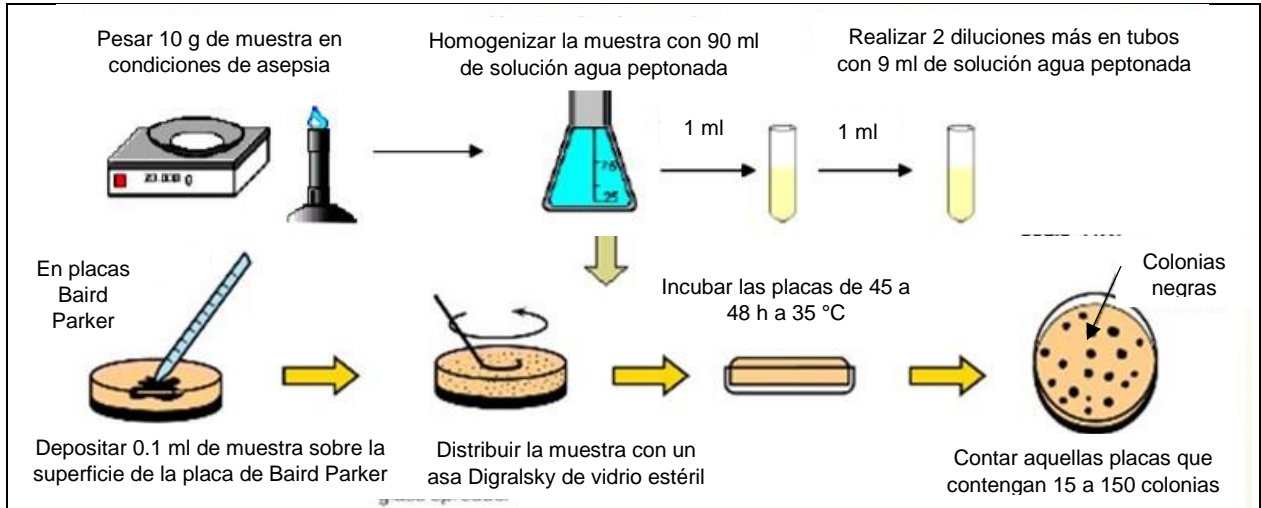


Figura 6 Técnica de extensión en superficie para *Staphylococcus aureus*.

### 8.3.4 Técnica de vertido en placa para mohos y levaduras

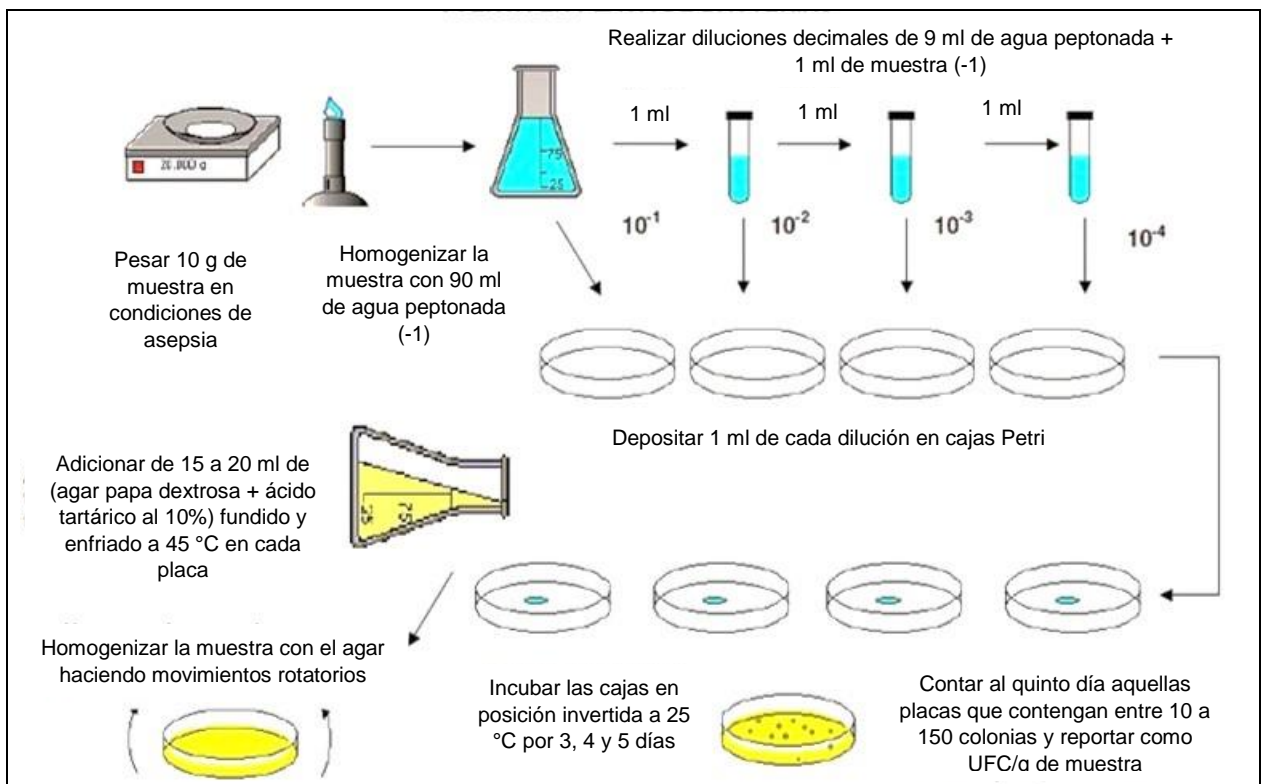


Figura 7 Técnica de vertido en placa para mohos y levaduras.

### 8.3.5 Inoculación intencionada de *Salmonella* entérica ATCC 14028

Se realizó una inoculación intencionada de una cepa de *Salmonella* ATCC 14028 para visualizar el mecanismo de acción de nisina (antimicrobiano) en el queso fresco artesanal. El esquema para la inoculación fue la siguiente:

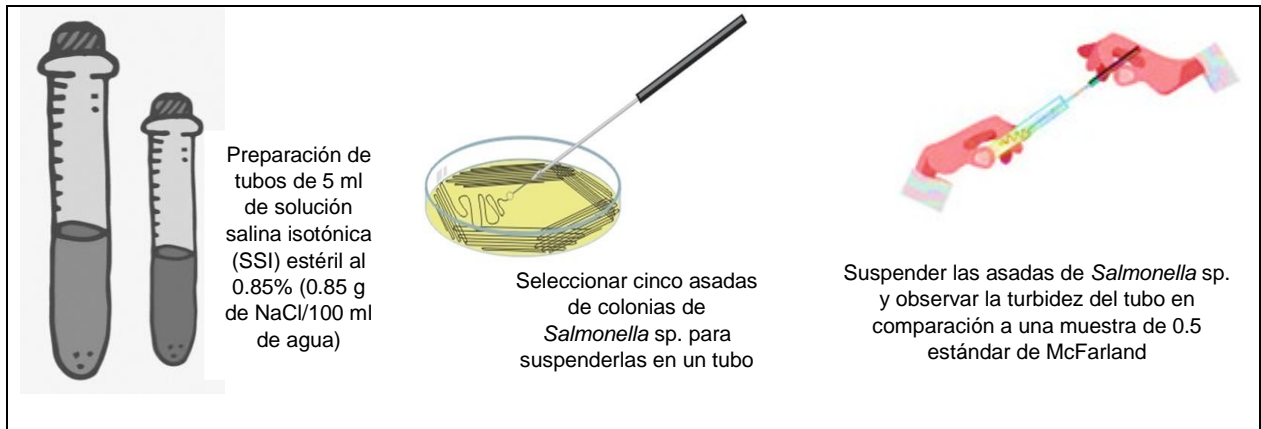


Figura 8 Estándar 0.5 de McFarland.

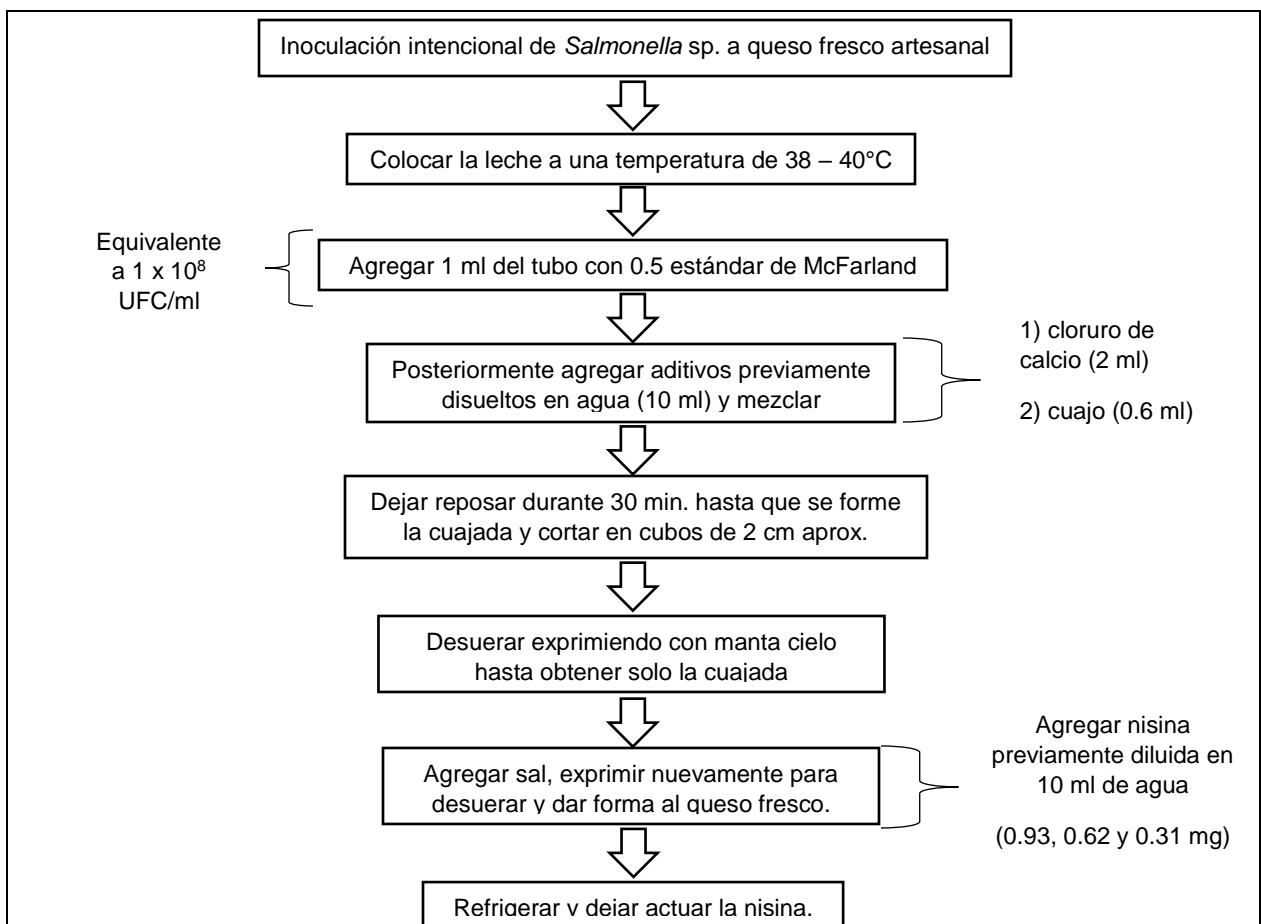


Figura 9 Diagrama de proceso para inoculación intencionada de *Salmonella* ATCC 14028 a queso fresco artesanal.

### 8.3.5.1 Evaluación de *Salmonella* entérica ATCC 14028

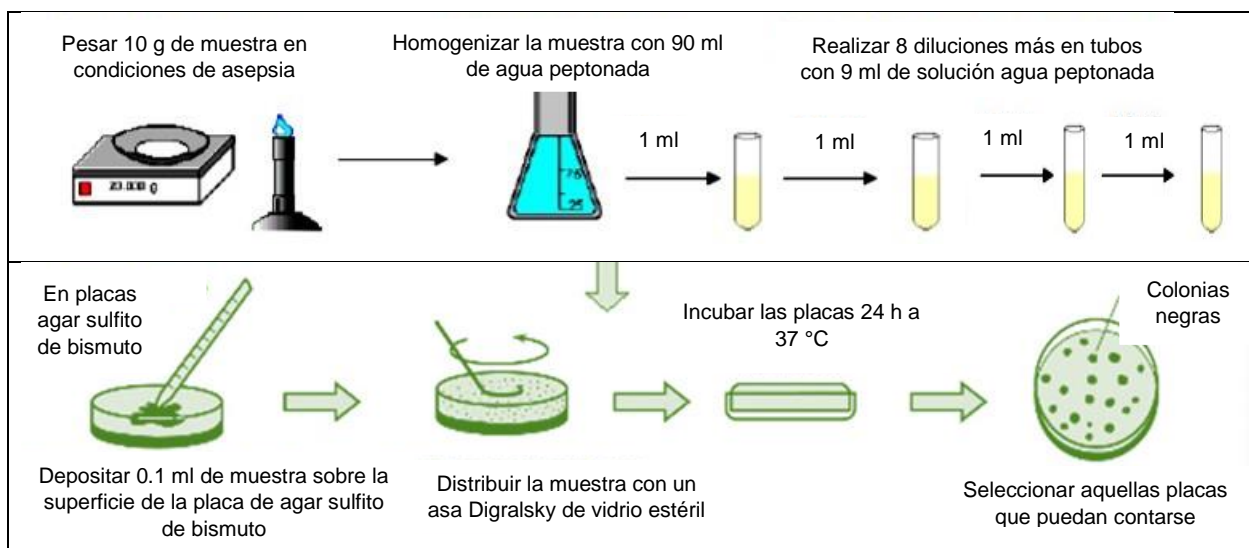


Figura 10 Técnica modificada para el recuento de *Salmonella* ATCC 14028.

## **IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la primera etapa de la investigación se procedió a elaborar quesos frescos artesanales de la manera tradicional adicionados con tres concentraciones de nisina (0.93, 0.62 y 0.31 mg), de los cuales se seleccionó el de mayor impacto en la disminución de la carga microbiana, con el objetivo de que la concentración a emplear pudiera desarrollar una mejor vida de anaquel de nuestro producto. Por lo que se realizaron pruebas microbiológicas para evaluar la inhibición y/o disminución de la carga microbiana de los microorganismos indicadores a evaluar. También se evaluó el valor de pH de los productos obtenidos, a los 7, 14 y 21 días de evaluación.

### **9.1 Análisis microbiológico de queso fresco artesanal a 7 días de su producción**

De acuerdo a los análisis microbiológicos realizados a quesos frescos artesanales que se elaboraron en el laboratorio y se les adicionó 0.93, 0.62 y 0.31 mg de nisina, se obtuvo mejor resultado con la concentración 0.93 mg, a la cual disminuyó el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de los microorganismos indicadores que se evaluaron, con respecto a los coliformes totales la disminución fue de 10,500 UFC/g a 3,300 UFC/g y en *Salmonella* entérica ATCC 14028 fue de 220,000 UFC/g descendiendo a 39,000 UFC/g. Cabe mencionar que los datos obtenidos superan los valores estimados en los parámetros establecidos de acuerdo con la NOM-243-SSA1-2010., ya que es una norma para productos lácteos pasteurizados, sin embargo, no existe norma para productos artesanales, por lo que no hay una norma de referencia. Esto puede deberse a que la leche cruda o bronca, al equipo de ordeña y la temperatura que tenía cuando se recibió (Larrañaga, 2009).

Cuadro 5. Evaluación microbiológica realizada a quesos frescos artesanales con y sin nisina, realizadas a los 7 días de su producción.

Muestra	Coliformes totales (UFC/g)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	<i>Salmonella</i> ATCC 14028 (UFC/g)	<i>Escherichia coli</i> (UFC/g)	Mohos y levaduras (UFC/g)
<b>Referencia NOM-243-SSA1-2010</b>	<b>≤ 100 UFC/g</b>	<b>1000 UFC/g</b>	<b>Ausente en 25 g</b>	<b>100 UFC/g</b>	<b>500 UFC/g</b>
QFA sin nisina	10,500	Ausente	220,000	Ausente	12,000
Q25% (0.31 mg)	8,000	Ausente	150,000	Ausente	12,500
Q50% (0.62 mg)	6,000	Ausente	100,300	Ausente	12,000
Q75% (0.93 mg)	3,300	Ausente	39,000	Ausente	13,000

**QFA sin nisina**= Queso fresco artesanal sin nisina

**Q25%**= Queso fresco artesanal con el 25% de concentración de nisina

**Q50%**= Queso fresco artesanal con el 50% de concentración de nisina

**Q75%**= Queso fresco artesanal con el 75% de concentración de nisina

**NOM-243-SSA1-2010.** Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba

En el cuadro 5 se muestran los valores obtenidos, los resultados demuestran la disminución de UFC sobre el crecimiento de coliformes totales y *Salmonella* entérica ATCC 14028, la concentración de nisina con mayor efectividad para disminuir la carga microbiana fue del 75% correspondiente a 0.93 mg, esto en referencia al valor de 12.5 mg/kg, lo permitido de acuerdo al CODEX Alimentarius, debido a que provocó la disminución más severa de coliformes totales a los 7 días de elaboración del producto. Con el 75% de nisina se obtuvieron 3,300 UFC/g en comparación con el producto sin adición de nisina que presentó 10,500 UFC/g. El efecto de nisina también se observó en la evaluación de *Salmonella* entérica ATCC 14028 que disminuyó de 220,000 UFC/g respecto a la muestra control a 39,000 UFC/g. Concentraciones al 25 y 50 % también disminuyeron la carga microbiana, pero fue mayor este efecto al 75%. La presencia de nisina en el queso fresco artesanal puede mejorar la vida de anaquel.

Aunque con mohos y levaduras, no hubo disminución de la carga microbiana debido a que tiene más del 50% de agua, exponiendo los quesos frescos artesanales a la proliferación de estos microorganismos. Con la evaluación de los microorganismos restantes *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, se realizaron pruebas de aislamiento e identificación que dieron resultados negativos y/o ausentes.

### **9.1.1 Coliformes totales**

De acuerdo con la figura 11 se puede observar que la cantidad de microorganismos presentes en el queso fresco artesanal con la concentración del 75% (0.93 mg) de nisina va disminuyendo de los 7 a los 21 días. Se observó diferencia entre el queso muestra (Inciso A) y el queso con 75% de nisina (Inciso D) de la primera semana, los valores se aprecian en el cuadro 6, por lo que se procedió a evaluar a la segunda (día 14) y tercera semana (día 21). La presencia de coliformes totales en los quesos frescos artesanales se debe a que en el establo no se cuenta con una adecuada desinfección en el momento de la ordeña, el transporte de la leche hacia la planta o tienda y que no se realiza en recipientes herméticos, ni a temperatura de refrigeración para prevenir el posible crecimiento de microorganismos (Jácome y Molina, 2008).

Estudios previos han reportado la incapacidad de la nisina para inhibir el crecimiento de microorganismos Gram negativos, hecho que se atribuye a su mecanismo de acción sobre la membrana citoplasmática donde forma poros que facilitan la salida de componentes esenciales para la supervivencia bacteriana (Thomas y Delves, 2000). Las bacterias Gram negativas poseen una pared celular que evita la acción de la nisina. Sin embargo, algunos investigadores han demostrado que tratamientos previos aplicados a los cultivos como la utilización de quelantes tipo EDTA, pueden incrementar la sensibilidad de las bacterias Gram negativas frente a esta bacteriocina, pero dicho efecto se ve disminuido en productos lácteos fermentados sobre todo cuando la producción es in situ, porque la acidez antagoniza la acción de los quelantes (Bozaris y Adams, 2009).

Cuadro 6. Evaluación de coliformes totales en quesos frescos artesanales con y sin nisina, realizadas a los 7, 14 y 21 días de su producción.

Muestra	Microorganismo	Días de almacenamiento		
		Día 7	Día 14	21
QFA sin nisina	Coliformes totales	10,500 UFC/g	10,000 UFC/g	8,000 UFC/g
Q75% (0.93 mg)	Coliformes totales	3,300 UFC/g	1,900 UFC/g	700 UFC/g

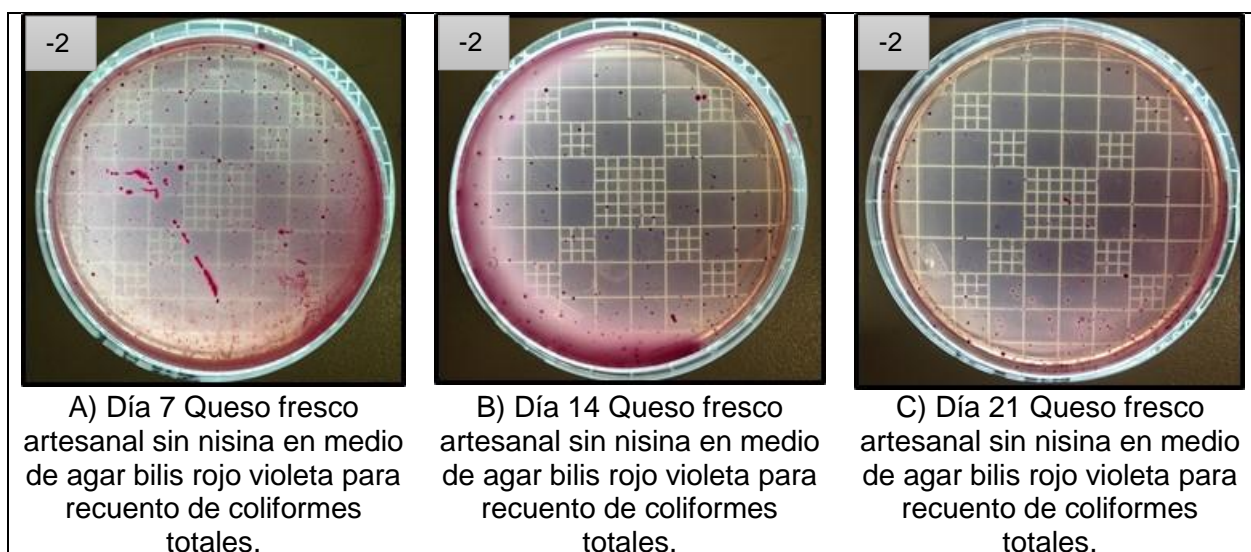
QFA sin nisina= Queso fresco artesanal sin nisina

Q75%= Queso fresco artesanal con el 75% de concentración de nisina

De acuerdo con resultados publicados por Salinas (2001) en quesos blancos elaborados con cultivos de *Enterococcus* productores de bacteriocinas, disminuye la población de bacterias coliformes al compararlos con quesos controles, lo que se debió al efecto de la acidez generada por el metabolismo fermentativo de los cultivos. Por otra parte, Rodríguez *et al.*, (2005), utilizando cultivos de *Lactococcus* productores de nisina y pediocina, encontraron un efecto inhibitorio de *Escherichia coli* O57:H7 y coliformes totales en quesos durante la maduración.

Spelhaug *et al.*, (2011) emplearon la misma cepa de *Lactococcus* ATCC 11454 en un estudio realizado *in vitro*, también se observó la inhibición del microorganismo Gram negativos, como *Escherichia coli* O57:H7. Cutter y Siragusa (2008) reportan actividad inhibitoria de nisina frente a bacterias Gram negativas.

Por lo que los resultados presentados en este estudio respecto a la inhibición de coliformes totales concuerdan con los de estudios reportados.



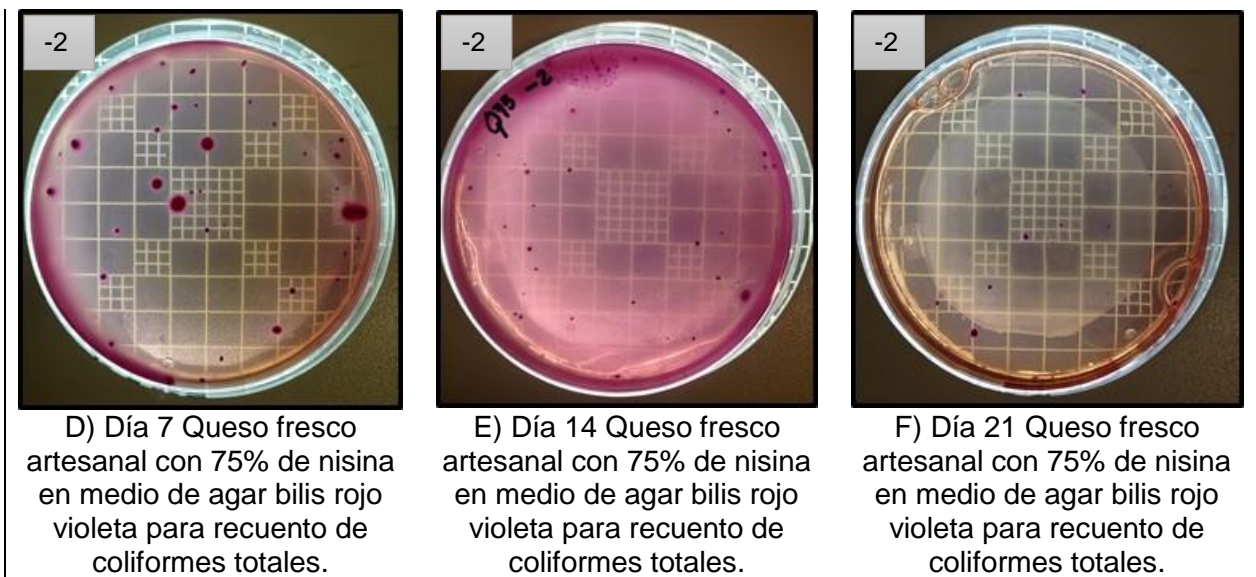


Figura 11. Evaluación de coliformes totales a quesos frescos artesanales.

En la segunda semana (Inciso B) de vida de anaquel del producto elaborado, la evaluación de coliformes totales fue de 10, 000 UFC/g a diferencia de la muestra con 75% de nisina (Inciso E), con un valor de 1,900 UFC/g. Y la tercera semana del queso fresco artesanal sin nisina (Inciso C) presentó 8,000 UFC/g a diferencia del (inciso F) queso con 75% de nisina (700 UFC/g). Lo que nos indica que hubo disminución de la carga microbiana.

Los coliformes pueden proliferar en gran cantidad de alimentos, en agua y productos lácteos. Pueden ser fácilmente destruidos por el calor el cual se emplea en las diversas etapas de elaboración de este producto (Doyle, 2007). Si bien el índice de coliformes ha sido aplicado a la evaluación de los alimentos durante muchos años, en algunos de ellos existen limitaciones. De acuerdo a estos antecedentes, el queso fresco artesanal (muestra control), presentó proliferación del microorganismo indicador al paso de las semanas.

### 9.1.2 *Escherichia coli*

Se realizaron pruebas de identificación y aislamiento para determinar la presencia de *Escherichia coli* (figura 12) en los quesos frescos artesanales. Los resultados mostraron ausencia de este microorganismo en los productos evaluados, de acuerdo a los cultivos

realizados con medio EC MUG (fluorescencia) y la prueba de indol mediante la adición de reactivo de Kovac en presencia de luz ultravioleta.

Es importante considerar que Spelhaug *et al.*, (2011), observaron la inhibición de microorganismos Gram negativos, como *Escherichia coli* O57:H7, empleando la cepa *Lactococcus* ATCC 11454 en condiciones *in vitro*, sin embargo, en nuestros resultados debido a que los productos evaluados no contenían a este patógeno, no se evaluó el efecto de la nisina.



Figura 12. *Escherichia coli* en medio EC MUG, con prueba de indol negativa.

### 9.1.3 *Staphylococcus aureus*

Las pruebas realizadas para la determinación de *Staphylococcus aureus* se determinaron en medio Baird Parker, y las pruebas de coagulasa y DNAsa. Los resultados fueron negativos a la presencia de *Staphylococcus aureus* (figura 13); por lo que se descartó el análisis de este indicador como para evaluar la disminución de carga microbiana.

De acuerdo con Morgan *et al.*, (2000), en leche y productos lácteos adicionados con nisina proveniente de *Lactococcus lactis* como antimicrobiano, este tendría un efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus* además de bacterias Gram positivas y negativas.

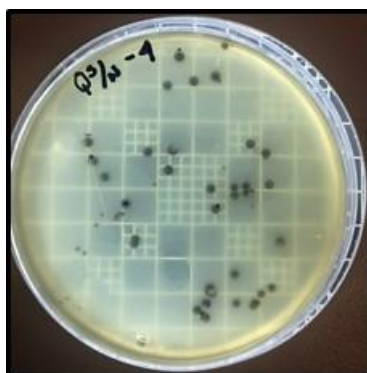


Figura 13. *Staphylococcus aureus*, resultado negativo.

De acuerdo con Del Campo *et al.*, (2008) las bacterias ácido lácticas presentes en quesos frescos, muestran que tienen un efecto inhibitorio sobre microorganismos patógenos, como *Salmonella typhi*. Mismo resultado en diversas pruebas de antagonismo para patógenos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, reportado Larios (2007) y Aguilar y Klotz (2008).

#### 9.1.4. *Salmonella* entérica ATCC 14028

Para el recuento de *Salmonella* entérica ATCC 14028. en los quesos frescos artesanales se realizó una inoculación intencional para la observación de la efectividad de la nisina, cabe mencionar que para realizar el método de recuento de *Salmonella* entérica ATCC 14028 se hizo una adecuación de acuerdo a las normas descritas en el cuadro 4, ya que en la NOM-114-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. no concuerda con el método descrito en este trabajo, debido a que solo es para deducir si hay presencia o ausencia del microorganismo. Método modificado de forma tradicional para visualizar el efecto de la nisina (la disminución de UFC de *Salmonella* entérica ATCC 14028) en los quesos frescos artesanales, ya que actualmente puede realizarse recuento de salmonella mediante métodos moleculares como por ejemplo PCR. Los costos para la detección molecular de *Salmonella* spp. son elevados en comparación con los métodos tradicionales, pero la alta sensibilidad y especificidad que ofrece la PCR, los beneficios al sector salud al lograr un diagnóstico

rápido y preciso, la relación costo beneficio que otorga al sector productivo permitiendo liberar productos alimenticios al mercado con mayor rapidez, justifican la implementación de estas técnicas. La revisión de las ventajas y desventajas de los métodos microbiológicos tradicionales y moleculares para detectar *Salmonella* spp. en diferentes matrices, permite establecer la mejor estrategia a seguir en la detección y diagnóstico de microorganismos de difícil aislamiento (Pedraza *et al.*, 2014). Dada la complejidad de las diferentes metodologías que existen para la detección de *Salmonella* spp. en este trabajo se recurrió a la modificación de la técnica para su recuento de acuerdo a las normas previstas en el cuadro 4, dichas técnicas presentadas en forma independiente para un solo método (figura 8, 9 y 10).

Los métodos moleculares como PCR permiten determinar de manera rápida y precisa el recuento de UFC de microorganismos patógenos en los alimentos (Yáñez *et al.*, 2008). Así como también Valasek (2015) menciona que el desarrollo de métodos moleculares tanto para la detección e identificación de microorganismos patógenos han proporcionado nuevas herramientas confiables para determinar en menor tiempo el riesgo de infección por patógenos en alimentos, por lo que es considerada un instrumento poderoso en el diagnóstico microbiológico.

Existe la necesidad de buscar una alternativa a la pasteurización de la leche con que se elaboran los quesos, una de ellas podría ser la fermentación ácido láctica generada por las bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en la microflora nativa de la leche puede inhibir a un patógeno como *Salmonella* spp. (Scaramelli *et al.*, 2007). Bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de quesos artesanales mexicanos y de otros países, han tenido efectos inhibitorios contra diversos patógenos incluido *Salmonella typhi*. (Del Campo *et al.*, 2008).

Las bacterias ácido lácticas se encuentran presentes en la leche de manera natural, además se ha encontrado que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos como *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, a través de diferentes compuestos generados en la fermentación, siendo el ácido láctico el principal y las bacteriocinas el más efectivo (Piña *et al.*, 2011).

Los resultados de esta investigación podrían contribuir a demostrar que la inocuidad en quesos artesanales de leche cruda podría lograrse por esta vía biológica, sin recurrir a la pasteurización.

Cuadro 7. Evaluación de *Salmonella* ATCC 14028 en quesos frescos artesanales con y sin nisina, realizadas a los 7, 14 y 21 días de su producción.

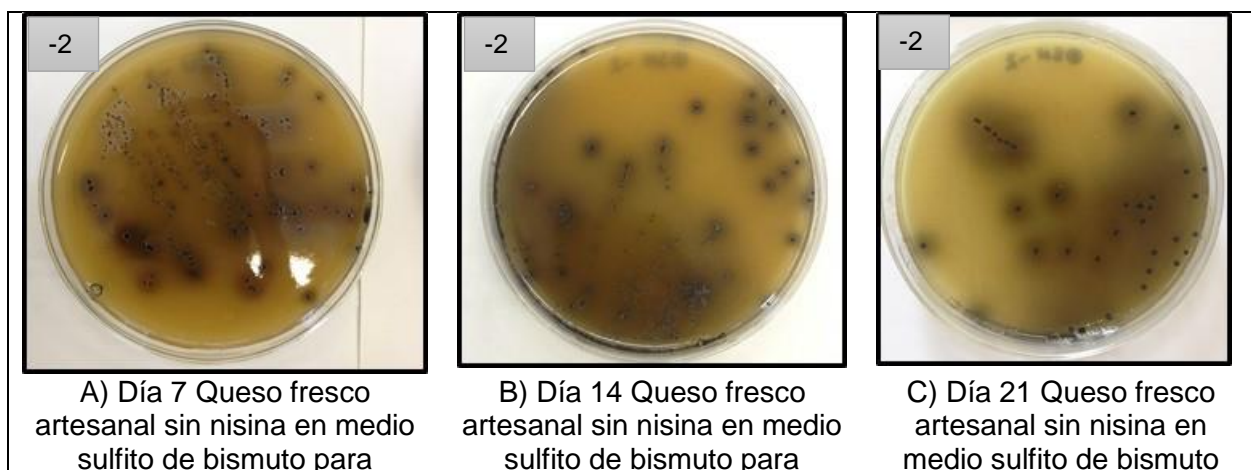
Muestra	Microorganismo	Días de almacenamiento		
		Día 7	Día 14	21
QFA sin nisina	<i>Salmonella</i> ATCC 14028	220,000 UFC/g	110,000 UFC/g	39,000 UFC/g
Q75% (0.93 mg)	<i>Salmonella</i> ATCC 14028	39,000 UFC/g	28,000 UFC/g	7,000 UFC/g

QFA sin nisina= Queso fresco artesanal sin nisina

Q75%= Queso fresco artesanal con el 75% de concentración de nisina

En el cuadro 7 se pueden observar los valores de los análisis microbiológicos realizados en el queso fresco artesanal sin nisina y el queso fresco artesanal con 75% (0.93 mg), en el cual se disminuyó la carga microbiana del microorganismo indicador desde la primera semana, el queso fresco artesanal sin nisina arrojó 220,000 UFC/g a diferencia del queso fresco artesanal con el 75% (0.93 mg) de nisina de 39,000 UFC/g. También se registró efecto inhibitorio en las evaluaciones realizadas a la segunda y tercera semana (cuadro 7).

En la figura 14 se observa que en la muestra de queso fresco sin nisina del día 7 (Inciso A) a diferencia del queso fresco con una concentración del 75% (0.93 mg) de nisina (Inciso D), se disminuye la carga microbiana (cuadro 7), lo mismo reflejándose en la segunda (día 14) y tercera semana (día 21).



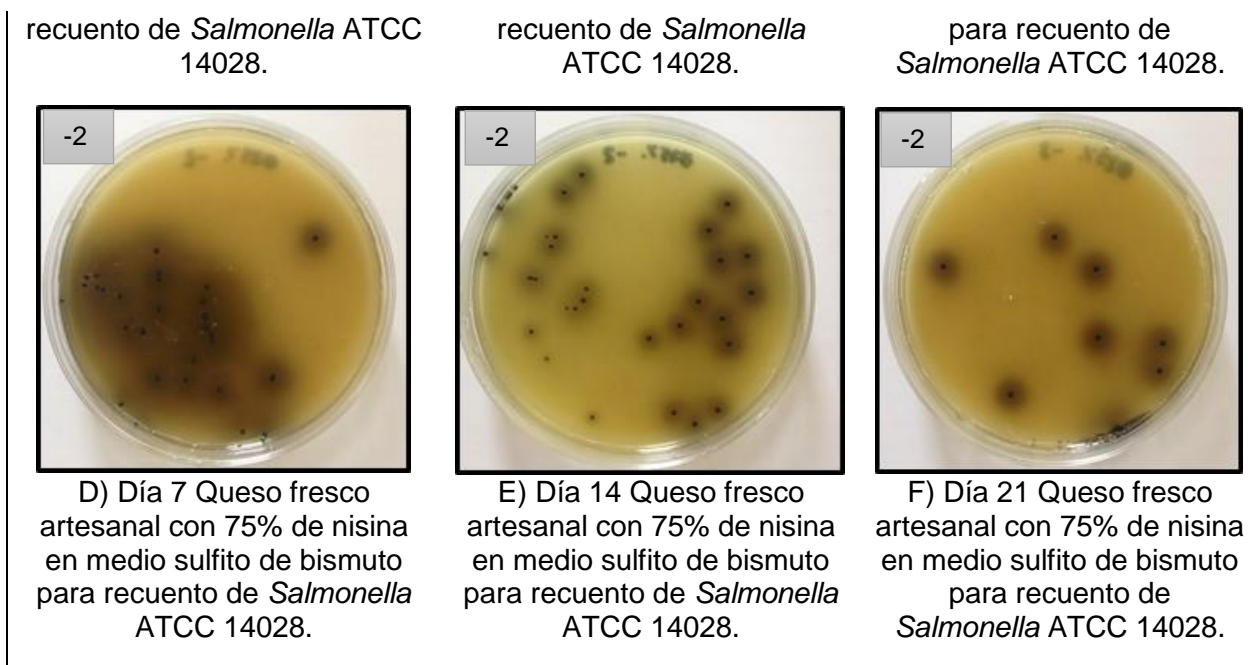


Figura 14. Evaluación de *Salmonella* ATCC 14028 en quesos frescos artesanales.

### 9.1.5 Mohos y levaduras

La presencia de microorganismos como mohos y levaduras fue alta ya que el contenido de agua en quesos frescos es de 46 - 57%, lo que pudo provocar que en el queso fresco artesanal sin nisina y con nisina (75% ó 0.93 mg) presentó mayor proliferación de mohos y levaduras tanto a la segunda como tercera semana, los valores superan los límites de la Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, formula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Los resultados se muestran en la figura 15. En las placas con agar papa dextrosa como medio de crecimiento y visualización de mohos y levaduras, se observó (cuadro 8) que no hubo disminución de la carga microbiana, debido que estos microorganismos indicadores tienden a descomponer al antimicrobiano (nisina). Paucar, S. (2006) señala que los mohos tienen la capacidad de adaptarse a condiciones que no todos los microorganismos son capaces de tolerar, como un nivel de acidez o basicidad en un rango mayor al que pudieran tolerar las bacterias.

Cuadro 8. Evaluación de Mohos y levaduras en quesos frescos artesanales con y sin nisina, realizadas a los 7, 14 y 21 días de su producción.

Muestra	Microorganismo	Días de almacenamiento		
		Día 7	Día 14	21
QFA sin nisina	Mohos y levaduras	12,000 UFC/g	13,000	15,800 UFC/g
Q75% (0.9 mg)	Mohos y levaduras	13,000 UFC/g	13,800 UFC/g	14,600 UFC/g

QFA sin nisina= Queso fresco artesanal sin nisina

Q75%= Queso fresco artesanal con el 75% de concentración de nisina

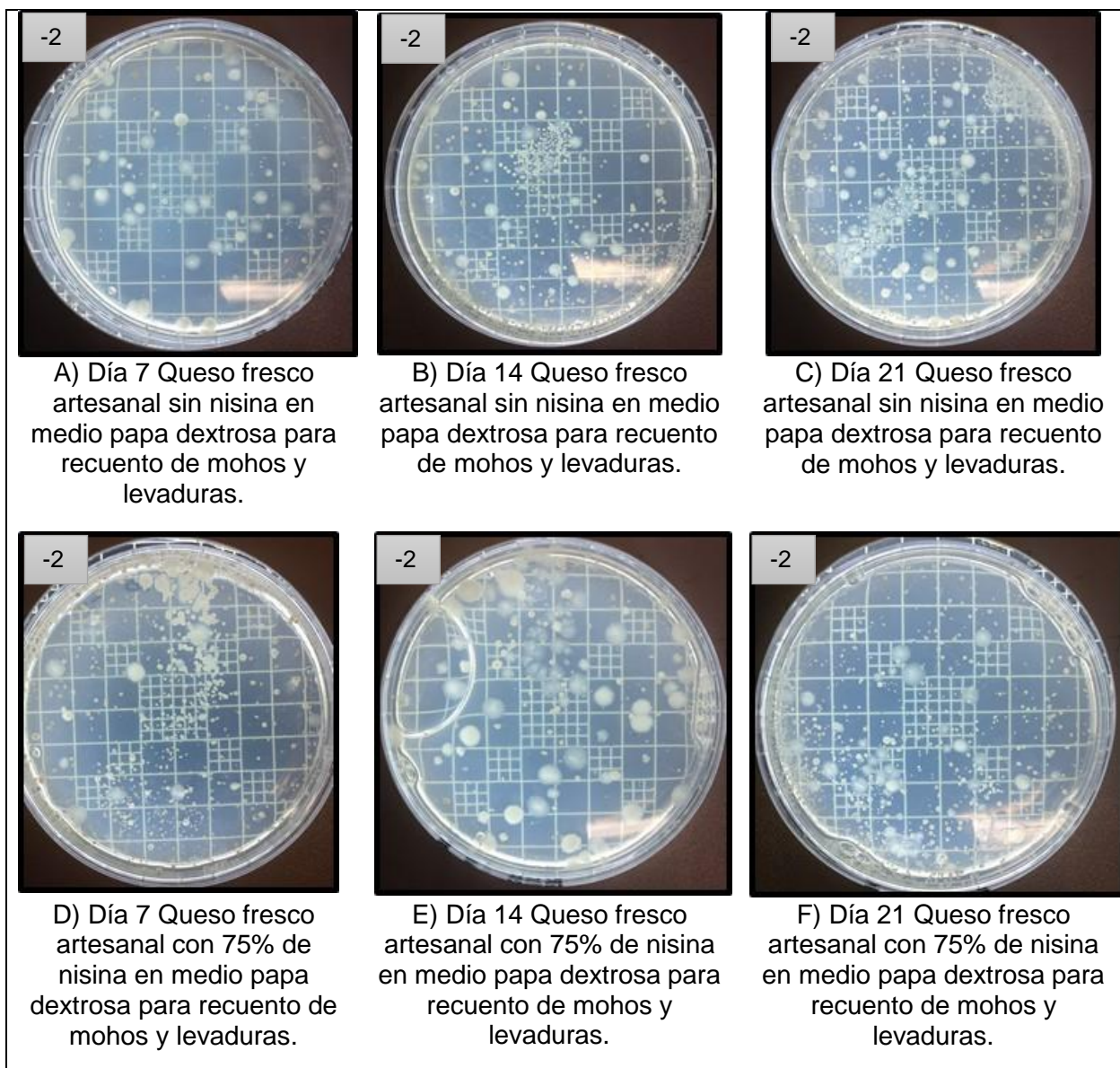


Figura 15. Evaluación de mohos y levaduras en quesos frescos artesanales.

## 9.2 Evaluación de la influencia del pH

De acuerdo a Sagronis (2015) Los valores de pH de los quesos “telita” y los valores de Aw (mayores a 0,9) indican que el producto es altamente susceptible al deterioro químico y microbiológico con posible crecimiento de microorganismos que representen un riesgo a la salud tales como *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. Dichas condiciones justifican el uso de nisina como agente antimicrobiano, lo cual está permitido en más de 50 países (Rodríguez, 2011) en diversos productos alimenticios, incluyendo quesos, debido a que la nisina inhibe las bacterias Gram negativas, incluyendo las patógenas, es atóxica, estable, se inactiva por las enzimas del tracto digestivo del humano. La presencia de nisina no afectó significativamente las propiedades sensoriales de los quesos “telita” (Garde *et al.*, 2015).

Cuadro 9. Evaluación del pH en quesos frescos artesanales, a los 7, 14 y 21 días de su producción.

Muestra	Días de almacenamiento		
	Día 7	Día 14	Día 21
Control (sin nisina)	5.7	5.7	6.1
75% (0.93 mg) de nisina	5.6	5.6	5.8

Las bacterias al estar en la leche aumentan su acidez y provocan la disminución del pH al adicionar nisina estamos provocando una inhibición de la actividad bacteriana que se puede relacionar con el pH como se muestran en el cuadro 9, en donde se observan los resultados, lo cual podría contribuir a que el producto no se fermente con rapidez y como resultado prolongue su tiempo de vida de anaquel. De acuerdo con Hwang y Gunasekaran, 2001, el pH del queso fresco oscila entre 5.5 - 6.1, por lo que los valores de pH obtenidos de los quesos frescos artesanales con nisina (75%) y sin nisina analizados que se muestran en el cuadro 9, están dentro de los valores de referencia, así como también los reportados en la NOM-245-SSA1-2010.

## X. CONCLUSIONES

Al evaluar el uso del antimicrobiano (nisina) en los quesos frescos artesanales, se demostró por medio de pruebas microbiológicas, que hubo efecto inhibitorio en coliformes totales y *Salmonella* ATCC 14028, en la primera semana de almacenamiento, el producto con mayor eficacia para disminuir la carga microbiana fue el adicionado con 75% (0.93 mg) de nisina, valor permitido por el CODEX Alimentarius y la FDA. Con respecto a los microorganismos coliformes, se observó que en la muestra de queso fresco artesanal sin nisina fue de 10,500 UFC/g a diferencia de la muestra con el 75% (0.93 mg) de nisina, reduciéndose a 3,300 UFC/g. Y de *Salmonella* ATCC 14028, una disminución de 220,000 UFC/g a 39,000 UFC/g, en la primera semana de evaluación.

*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, dieron como ausentes en los quesos frescos artesanales en las muestras con y sin nisina, a las tres concentraciones evaluadas y de acuerdo a los análisis microbiológicos. En cuanto a mohos y levaduras, no se presentó disminución en la carga microbiana.

Los valores de pH reportados en la investigación se encuentran dentro de los valores de referencia.

## **XI. RECOMENDACIONES**

De acuerdo a lo reportado en esta investigación, la mejor concentración de nisina a utilizar es 75% (0.93 mg) al valor aceptado de acuerdo al CODEX Alimentarius. Por lo que es recomendado para la elaboración de queso fresco tipo artesanal, favoreciendo la vida de anaquel y disminuyendo la carga microbiana de microorganismos patógenos que puedan deteriorar su calidad.

El uso de la nisina en un producto lácteo de gran impacto para la sociedad nos da mejores resultados como antimicrobiano, pues ya que es un antibiótico de amplio espectro, permite que el producto final elaborado evita la mayor proliferación de bacterias patógenas, mismas que pueden influir en la salud del consumidor.

## XII. REFERENCIAS

- Aguilar, C. y Klotz, B. (2008). Inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* por bacterias ácido lácticas: presencia de quórum sensing Alimentos hoy. Colombia. 13(13): 345-356 pp.
- Alonso, D. (2002). Producción casera de mantequilla, quesos y yogurt. 1ra edición. Barcelona, España. Editorial Aura. 10-15 pp.
- Association Of Official Analytical Chemistry, AOAC., (2000). Official methods of analysis.
- Barreto G., Sedrés, M., Ortiz, A. y M. Ricardo. (2007). Categorías enteropatógenos de *Escherichia coli* en alimentos. Rev. Prod. Anim. Sep. 2007/jul; 12: 87-90 pp.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L. y Cogan T.M. (2001). "Recent advances in cheese microbiology". International Dairy Journal 11: 259-274 pp.
- Beristain-Bauza SC, Paolu E, López-Maolo A (2012). Bacteriocinas: Antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. 6: 64-78 pp.
- Board RG. (2006). Introducción a la Microbiología Moderna de los Alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 245-256 pp.
- Boziaris, I., Adams, M. (2009). Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of Gram negatives. Int. J. Food Microbiol, 53: 105-113 pp.
- Castillo R. (2005). Determinación en Crema y Quesos no madurados de Coliformes y *Staphylococcus aureus*, basándose en las Normas COGUANOR vigentes, Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 5(12): 53 p.
- Chen, H. y Hoover, D.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2: 82-100 pp.
- Cotter, P.D., Hill, C. y Roos, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology, 3(10): 777-788 pp.

- Cutter, C.N.; Siragusa, G.P. (2008). Population reductions of Gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. *J. Food Protect.* 58: 977-983 pp.
- Dabes A. C., Santos W. L. M., Pereira E. M. (2009) Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas aisladas de productos cárnicos frente a *Listeria monocytogenes* 52 y *Staphylococcus aureus*. *Arq. Brasileiro Medicina Veterinaria y Zootecnia.* 53(1): 1 - 7 pp.
- Del Campo, C.; Gómez, H. y Alaniz, R. (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogénica aisladas de quesos frescos. *e-Gnosis.* 6(5): 1-17 pp.
- Doyle M., Beuchat L. (2007). *Food Microbiology*. Editorial ASM Press, 3era edition.
- Feria P. F. (2007). Aislamiento y caracterización Bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 en suero de leche. Tesis Msc Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Medellín - Colombia, 84 p.
- Garde, S., Avila, M., Medina, M., Nuñez, M. (2015). Influence of a bacteriocin-producing lactic cultura on the volatile compounds, odour and aroma of Hispanic cheese. *Intern Dairy J*; 1024-1043 pp.
- Gautham, N., Sharma, N. (2009). Bacteriocin: safest approach to preserve food products. *Indian Jo Microbiol*, 49(3): 204-211 pp.
- Gunasekaran, S. y Ak, M.M. (2003). *Cheese Rheology and texture*. CRC Press. Nueva York, EE. UU. 437 pp.
- Hentzer M., Givskov; M. (2013). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest.*, 112(9): 1300-1307 pp.
- Hwang, C.H. y Gunasekaran, S. (2001). Measuring crumbliness of some commercial Queso Fresco-type Latin American cheeses. *Milchwissenschaft*, 56: 446-450 pp.

- Jácome, E., y Molina, S. (2008). Efecto de la leche concentrada por microfiltración tangencial en la calidad de queso semimaduro para sanduche, utilizando dos líquidos de lavado y diferentes tipos de grasa. (Tesis de pregrado), Universidad Técnica del Norte, Ibarra.
- Jeevaratnam K., Jamuna M., Bawa A. (2010). Biological preservation of foods Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Indian J Biotechnology*, 4(6) 446-454 pp.
- Larios, E. (2007). Caracterización de la microflora del queso tipo Oaxaca y su actividad antimicrobiana. *UAEH, México*. 33(2): 25-26 pp.
- Larrañaga I, Carballo J, Rodríguez, M, Fernández J. (2009). Control e Higiene de los Alimentos. Grado Superior. Mc Graw Hill/ Interamericana de España, S.A. 325-330 pp.
- Mahaut, M., Jeantet, R. y Brulé, G. (2003). "Introducción a la Tecnología quesera". Ed. Acribia, Zaragoza, España.
- Martin, A. (2002). Capacidad antagonista frente a la *Listeria monocytogenes* de dos sustancias tipo Bacteriocina utilizadas en combinación con NaCl y CO<sub>2</sub> [Tesis]. Valdivia, Chile: Universidad Austral De Chile. 79 p.
- Monroy, M., Castro, T., Fernández, F. J., Mayorga, L. (2009). Revisión Bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Contacts*, 73: 63-72 pp.
- Morgan, S.M., Roos, R.P. Beresford, T. y Hill, C. (2000). Combination of hydrostatic pressure and lacticin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 414-420 pp.
- Naghmouchia, K., Kheadr, E., Lacroix, C., Fliss, I. (2007). Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 24(7-8): 718-727 pp.
- Nyenje ME., Ndip, RN. (2013). The challenges of foodborne pathogens and antimicrobial chemotherapy: A global perspective. *Afr. J. Microbiol. Res*, 7(14): 1158-117 pp.
- NOM-109-SSA1-1994. Procedimiento para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NOM-111-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de Mohos y levaduras en alimentos.

NOM-112-SSA1-1994. Bienes y servicios. Determinación de bacterias *Coliformes*.

NOM-113-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos Coliformes totales en placa.

NOM-114-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.

NOM-115-SSA1-1994. Bienes y servicios. Métodos para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.

NOM-143-SSA1-1995. Bienes y servicios. Métodos de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*.

NOM-210-SSA1-2014. Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

Larrañaga I, Carballo J, Rodríguez, M, Fernández J. (2009). Control e Higiene de los Alimentos. Grado Superior. Mc Graw Hill/ Interamericana de España, S.A., 325-330 pp.

O'Bryan C.A, Crandall PG, Ricke S.C, Ndahetuye, J.B., (2015) Lactic acid bacteria (LAB) as antimicrobials in food products: Analytical methods and applications. En Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality. Woodhead. Oxford, RU, 137-151 pp.

- Paucar, S. (2006). Elaboración de queso fundido mediante la utilización de tres tipos de sales fundentes (citrato de sodio, citrato de calcio y citrato de potasio). Tesis de grado. Facultad de Ciencias Pecuaria, ESPOCH. Riobamba, Ecuador, pp. 45-60.
- Pedraza, G. José.; Pereira, S., Nicole, Soto, V., Zamira.; Hénandez, A., Enio.; Villareal, C., José. (2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. Programa de medicina. Revista Científica Salud Uninorte, Vol. 30, N° 1. Troncal del Caribe Km. 1 vía Mamatoco. Santa Marta, Magdalena.
- Piña, M.; Uribe, C.; Regalado, C.; Amaya, S.; Castaño, E. y García, B. (2011). Producción de nisina por *Lactococcus lactis* usando suero lácteo suplementado y evaluación de su actividad después del secado por aspersión. Ciencia, 4(2):47-55 pp.
- Rodríguez, E.; Calzada, J.; Arqés, J., Rodríguez, J.; Nuñez, M.; Medina, M. (2005). Antimicrobial activity of *pediocin* producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. Int. Dairy J. 15: 51-57 pp.
- Rodríguez, J., M., (2011). Espectro antimicrobiano, estructura, propiedades y modo de acción de la nisina, una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*. Food Sci Technol. Int.; 2: 61-70 pp.
- Rodríguez H., Sedrés, M., Barreto, G., Guevara, G., Bertot, J., Martínez, S. (2011). Serogrupos de *Salmonella* en alimentos y coprocultivos. Rev. Prod. Anim, 23(2): 121-124 pp.
- Salinas, B. (2001). Producción de queso tipo blanco, utilizando como cultivos iniciadores bacterias productoras de bacteriocinas. Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia. Trabajo de Grado. 140 pp.
- Sagronis, Elba, Jesús, García. (2015). Efecto de la adición de nisina en los parámetros físicos, químicos y sensoriales del queso "telita". Tecnología de alimentos. An Venezolanos de Nutrición; Vol. 20(1): 12-16 pp.

- Scaramelli, A.; Citti, R.; Gonzáles, L.; Páezm, L. y Tromp, J. (2007). Investigación de *Salmonella* sp. en muestras de quesos blanco duro "tipo llanero" del estado de Aragua, Venezuela. *Revista científica FCV-Luz*, 10(3):167-173 pp.
- Schmidt RH., Goodrich, RM., Archer, DL., Schneider, KR. (2013). General Overview of the Causative Agents of Foodborne Illness. This document is FSHN033, one of a series of the Food Science and Human Nutrition Department, Florida Cooperative Extension Service, IFAS, University of Florida. Publication: February 2013.
- Scott, R. R. (1998). Cheese varieties Scott, R., Robinson, R. K. y Wilbey, R. A. (Eds) *Chessemaking Practice*. Tercera edición Kluwer Academic/Plenum Publisher Nueva York, EE. UU., 449 pp.
- Siamansouri M, Mozaffari S, Alikhani F (2013). Bacteriocins and lactic acid bacteria. *J. Biol.Today's World 2*: 227-234 pp.
- Sierra, L. (2012). Evaluación de la preservación de extractos líquidos de café mediante el uso de bacteriocinas (nisina) y aplicación de microondas. Tesis Universidad Nacional de Colombia, 94 p.
- Sousa, M. A. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11,327-345 pp.
- Spelhaug, S.R.; Harlander, S.K. (2011). Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* y *Pedococcus pentosaceus*. *J. Food Prot.* 52(12): 856-862 pp.
- Steniner T. Treating foodborne illness. (2013). *Infet Dis Clin North Am*; 27(3): 555-76.
- Thomas, L., Clarkson, M., Delves-Broughton, J. (2000). Nisin In: Naidu, A. (Ed) *Natural Food Antimicrobial System*. USA: CRC Press. 463-524 pp.
- Tiwari B. K., Valdramidis V. P., O'Donnell C. P., Muthukumarappan K., Bourke P. Cullen P. J. (2010). Application of natural antimicrobials for food preservation. *J Agric Food Chem*, 57(14): 5987-6000 pp.
- Umaña, C. Eduardo (2017). Conservación de alimentos por frío. Refrigeración/congelamiento. *Fiagro, Proinnova*. 21 pp.

- USDA. U. S. Department of Agriculture. (2014). Servicio de inocuidad e inspección de los alimentos. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.
- Valasek, M., A., & J., J., Repa. (2015). "The power of real-time PCR". *Adv. Physiol. Educ.* 29(3); 151-159 pp.
- Vázquez, S. M. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista Chilena de Nutrición*, 36(1): 64-71 pp.
- Walstra, P. W. (2006). *Dairy Science and Technology*. CRC Press. Nueva York, EE. UU., 140-155 pp.
- Yáñez, E., Máttar, S., & Durango, A. (2008). Determinación de *Salmonella* sp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba. Bogotá. Biblioteca Nacional de la Salud "José Celestino Mutis".
- Yost, C.K. (2014). Biopreservation. Dikeman, M., Devine, C. En: *Encyclopedia of Meat Sciences*, Reino Unido: Academic Press. 76-82 pp.