



---

---

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ**

**REPORTE DE:**

**RESIDENCIA PROFESIONAL**

**INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

**TEQUILERA CORRALEJO S.A DE C.V.**

**“EFECTO DE LA NISINA COMO CONTROL DE LA MICRO FLORA  
PATOGENA EN QUESOS MADURADOS DE OVEJA”**

**PRESENTA: ALEIDA FUENTES BELTRAN**

**ASESOR INTERNO: DRA. PATRICIA GUADALUPE SÁNCHEZ ITURBE**

**ASESOR EXTERNO: ING. HUMBERTO SEPULVEDA QUEZADA.**

**REVIORES:**

**QBP. AURA FLORES PEREZ**

**ING. MARGARITA MARCELIN MADRIGAL**

**PENJAMO, GUANAJUATO, MEXICO; JUNIO DE 2014**

## Índice

INTRODUCCION .....	5
JUSTIFICACIÓN .....	6
OBJETIVOS .....	7
Objetivo general:.....	7
Objetivos específicos: .....	7
CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO.....	7
Información general de la organización.....	7
Misión: .....	8
Visión:.....	8
Valores de la Tequilera Corralejo: .....	8
Localización de la empresa .....	9
PROBLEMAS A RESOLVER .....	10
ALCANCES Y LIMITACIONES .....	10
Alcances .....	10
Limitaciones.....	10
FUNDAMENTO TEÓRICO.....	11
Definición y tipos de quesos .....	11
Según el origen de la leche.....	11
Según su maduración .....	11
Según su contenido de grasa .....	12
Quesos maduros .....	13
Queso Torta de Guanajuato.....	13
BACTERIOCINAS.....	15
Características de las Bacteriocinas .....	15
Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas.....	15

Clasificación de las bacteriocinas .....	17
Nisina .....	18
Saniper 20.....	19
Determinación de microorganismos Indicadores .....	20
<i>E. coli</i> y Coliformes .....	21
<i>Salmonella</i> .....	21
Mesófilos aerobios .....	22
Compact Dry™ “Nissui” .....	23
Compact Dry™ TC .....	23
Compact Dry™ EC .....	23
Compact Dry™ SL.....	23
PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS.....	24
Materiales .....	24
Selección de la muestra .....	24
Procedimiento de elaboración del queso torta de Guanajuato.....	24
Desarrollo.....	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSION Y RECOMENDACIONES.....	40
Recomendaciones.....	41
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA .....	42
Anexos.....	47

## Contenido

Tabla 1 Denominación del queso en función del tiempo de maduración .....	12
Cuadro 2 recuento de <i>Coliformes totales</i> .....	35
Cuadro 3 Recuento de Mesófilos aerobios .....	38
Cuadro 4 Detección de salmonella.....	40
Figura 1. Localización de Tequilera Corralejo.....	9
Figura 2 Localización de la zona de trabajo.....	9
Figura 3 Detección de salmonella en el medio Compact Dry SL.....	29
Figura 4 Detección de <i>E. coli</i> y coliformes en el medio Compact Dry™ EC.....	30
Figura 5 Detección de Mesófilos aerobios en el medio Compact Dry™ TC.....	31
Gráfica 6 Comparación de los resultados del recuento de Coliformes totales .....	36
Gráfica 7 Comparación de los resultados del recuento de mesófilos aerobios .....	39

## INTRODUCCION

El queso es un producto lácteo fresco o maduro que se obtiene por la separación del suero de la leche que está listo para el consumo después de la fabricación y no será sometido a ningún cambio físico o químico adicional (Aguirre, 2011). El consumo de queso representa una forma de consumo indirecto de leche, además de que son una fuente de proteínas, grasas, vitaminas y minerales especialmente calcio, hierro y fósforo. Dentro de la clasificación de quesos se encuentran los quesos madurados, generalmente elaborados con leche cruda o pasteurizada de diferentes animales. Dadas sus características fisicoquímicas, el queso puede ser vehículo de microorganismos patógenos sumado a las deficientes condiciones higiénicas del proceso artesanal de fabricación del queso hacen al producto final riesgoso para el consumidor. Por esta razón es de suma importancia buscar alternativas que disminuyan la presencia de microorganismos patógenos y la flora responsable del deterioro de los quesos.

La industria láctea tiene la alternativa de emplear preservativos biológicos o biopreservadores, para satisfacer el interés de los consumidores por obtener alimentos inocuos y naturales, es decir, elaborados con estricto control de calidad sanitaria y sin la adición de aditivos químicos artificiales (Devlieghere, et al., 2004). El *Lactococcus lactis subsp. Lactis* es una bacteria ácido láctica con propiedades biopreservadoras, ya que algunas cepas son capaces de producir nisina, una bacteriocina ampliamente usada en la industria alimentaria y generalmente reconocida como segura (GRAS, Generally Recognized As Safe) por la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO) en 1969 (Thomas et al., 2000).

El uso de la nisina está permitido por la NOM-243-SSA1-2010 en quesos frescos, madurados y procesados. La nisina es un péptido conocido por su elevada actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram-positivas, aunque también hay estudios en los que se demuestra su efecto frente a bacterias gram-negativas (Steven et al., 1991). Además, la nisina se inactiva con las enzimas digestivas del hombre, posee termo estabilidad a pH ácido, es atóxica (Delves-Broughton, 1990; Rodríguez, 1996).

Los métodos tradicionales para el análisis de los microorganismos en alimentos son más laboriosos en comparación de las placas COMPACT DRY™ (Nissui Pharmaceutical Co.

Ltd; suministrado por Hyserve GmbH & Co. KG), que permiten obtener resultados en 24 h. Las placas contienen sustratos cromogénicos, y esto hace que se puedan identificar a las colonias fácilmente.

## **JUSTIFICACIÓN**

La calidad de los alimentos es una característica compleja que determina su valor o aceptabilidad para el consumidor. Abarca atributos negativos como el estado de descomposición, contaminación con suciedad, decoloración y olores desagradables, y atributos positivos, como origen, color, aroma, textura y métodos de elaboración de los alimentos (FAO/OMS, 2003).

La calidad de los quesos se ve afectada por la presencia de microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, salmonella y Coliformes Totales entre otras, afectando de manera negativa su presentación y características organolépticas, además de ser fuente de enfermedades de transmisión alimentaria, por lo cual es de suma importancia buscar alternativas que disminuyan la micro flora patógena causante del deterioro de los quesos, siendo una alternativa el uso las bacteriocinas, entre ella destaca la Nisina, cuyo uso en alimentos es permitido en más de 50 países en el mundo por la FDA y aprobado para los quesos frescos, madurados y procesados, obtenidos de leche estandarizada y pasteurizada de vaca o de otras especies animales (NOM-243-SSA1-2010).

El queso tipo torta representa un cuadro favorable para el crecimiento de microorganismos patógenos debido a las condiciones de maduración y las características fisicoquímicas de este, por lo cual se utilizaron soluciones a diferentes concentraciones de Nisina respetando el límite máximo de 12.5mg/kg permitido por la NOM-243-SSA1-2010, para evaluar su eficiencia como control microbiológico de estas soluciones se utilizaron las placas Compact Dry™, a su vez se comparó la eficiencia de la Nisina contra el sanitizante saniper 20 al 1% que se utilizaba en la planta procesadora de quesos “El trashumante”

## **OBJETIVOS**

### ***Objetivo general:***

Evaluar el efecto de soluciones de Nisina a diferentes concentraciones como control de la micro flora patógena del queso madurado de oveja tipo Torta de Guanajuato.

### ***Objetivos específicos:***

- Evaluar el crecimiento natural de microorganismos patógenos como Salmonella, Coliformes Totales y *Escherichia coli* a los 20 días de maduración en el queso de oveja tipo torta de Guanajuato.
- Evaluar la acción de las soluciones de Nisina a concentraciones de 2.5ml/L, 3.5 mg/L y 4.5 mg/L, sobre el crecimiento de microorganismos patógenos como Salmonella, Coliformes Totales y *Escherichia coli*, durante la maduración de este queso.
- Comparar la eficiencia de las soluciones de Nisina vs Saniper 20 al 1%.

## **CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO**

### ***Información general de la organización***

La Hacienda Corralejo fue construida en 1755 por Don Pedro Sánchez de Tagle y en aquellos tiempos, era de una gran extensión. Poseía en esa época 42 sitios grandes y 26 pequeños (ahora cascos de la hacienda) y se le consideraba atinadamente histórica, debido a que en éste precioso lugar nació el llamado padre de la patria, **Don Miguel Hidalgo y Costilla**. Por estas razones y otras más, el **Tequila Corralejo** es un producto netamente nacional, con características únicas, logradas con una infraestructura orgullosamente mexicana.

Ex-hacienda de Corralejo, es la cuna de Tequilera Corralejo, debido a su privilegiada situación geográfica para producir un agave de excelente calidad y para ostentar en sus destilados de agave el nombre de “Tequila” como denominación de origen, con reconocimiento nacional e internacional. En Tequilera Corralejo se elabora el tequila con materia prima de la mejor calidad, utilizando maquinaria adecuada y vigilando cada paso del proceso con estricto control de calidad, a fin de lograr un producto de excelencia.

***Misión:***

Ofrecer a nuestros clientes bebidas de calidad en presentaciones creativas que preserven la identidad mexicana; fomentando con nuestro trabajo diario una mejor calidad de vida para nuestros colaboradores y la comunidad que nos rodea, en un ambiente de calidez, compañerismo y compromiso amigable con el medio ambiente.

***Visión:***

Crecer como representantes de las bebidas mexicanas en el mundo, con la presencia de nuestras marcas dentro y fuera del país. Reconocidos por la creatividad de nuestros productos y el compromiso con el medio ambiente y la comunidad que nos rodea.

***Valores de la Tequilera Corralejo:***

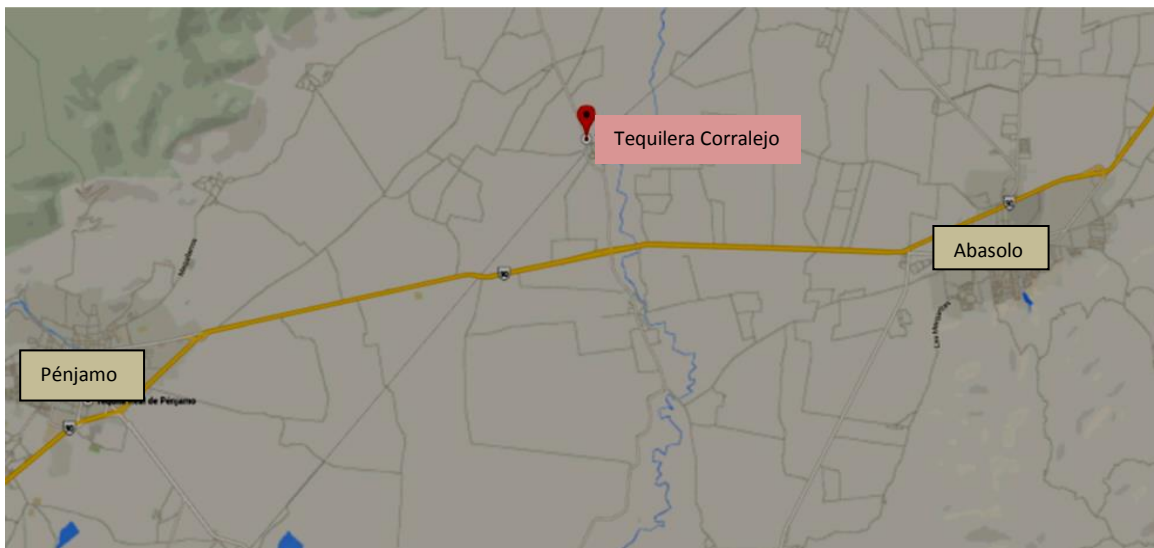
- **Responsabilidad** → En Corralejo somos responsables cuando hacemos nuestro trabajo bien y a tiempo, tomando decisiones de manera eficiente y cumpliendo nuestros objetivos de acuerdo a nuestro puesto y tareas.
- **Creatividad** → Somos creativos cuando contribuimos con ideas nuevas para solucionar problemas, generar nuevos productos, cuidar la ecología y mejorar nuestros procesos productivos.
- **Higiene** → Cuidamos nuestro aseo personal, la buena presentación de nuestros uniformes, seguimos las normas de limpieza dentro de la empresa y mantenemos nuestro lugar de trabajo limpio y ordenado.
- **Honestidad** → Realizamos nuestra producción cumpliendo las especificaciones necesarias y nos manejamos con la verdad individualmente y con nuestro equipo de trabajo.



- **Solidaridad** → Somos solidarios cuando trabajamos en equipo, escuchamos las necesidades de nuestros compañeros y propiciamos una buena convivencia.

### ***Localización de la empresa***

Ex Hacienda Corralejo s/n, Colonia Refugio de Herrera, Pénjamo, Gto.; el mapa de localización de la empresa y del área de trabajo se muestran en la figura 1 y 2, respectivamente.



**Figura 1. Localización de Tequilería Corralejo.**



**Figura 2 Localización de la zona de trabajo.**

## **PROBLEMAS A RESOLVER**

- ✚ Controlar el crecimiento de microorganismos patógenos en los quesos madurados de oveja tipo torta de Guanajuato
- ✚ Evaluar el efecto de la aplicación de las soluciones de nisina a diferentes concentraciones sobre el desarrollo de microorganismos patógenos como salmonella, *Escherichia coli* y Coliformes totales y mesófilos aerobios, comprando la eficiencia de estas soluciones contra Saniper 20 al 1%.

## **ALCANCES Y LIMITACIONES**

### ***Alcances***

Se comprobó la eficiencia de la Nisina a diferentes concentraciones como control de microorganismos patógenos, así como su eficiencia contra la solución sanitizante de Saniper 20 al 1%

### ***Limitaciones***

Las limitaciones al realizar este proyecto se encontraron en la tardía producción de quesos debido a la ausencia de leche para su producción, empezando la producción en febrero-2014 y la ausencia y escases de la materia prima y el material para la determinación de los análisis microbiológicos siendo estos adquiridos hasta el mes de marzo-2014, dejando así un tiempo corto para las evaluaciones de los quesos y debido a la escases de material no sé pudieron realizar los análisis por triplicado.

Otras limitante fue la disponibilidad del laboratorio siendo que este está destinado para las pruebas de calidad realizadas al tequila producido, otra limitante fue el tiempo disponible debido a las actividades asignadas en el área de producción de quesos “El trashumante”.

## **FUNDAMENTO TEÓRICO**

### ***Definición y tipos de quesos***

El real decreto del Código Alimentario Español 1113/2006, de 29 de septiembre, por el que se aprueba las normas de calidad para quesos y quesos fundidos define el queso como el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido de la leche, de la leche total o parcialmente desnatada, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o todos estos productos, coagulados total o parcialmente por la acción de cuajo u otros coagulantes apropiados, antes del desuerado o después de la eliminación parcial de la parte acuosa, con hidrólisis previa de la lactosa o sin ella, siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche.

La denominación de los productos, con excepción de las variedades que tengan norma específica que utilicen la denominación prevista, será queso, que deberá completarse, según corresponda, con las siguientes indicaciones:

### **Según el origen de la leche**

Los quesos que no tengan una denominación concreta o aquellos que aun teniéndola no están protegidos por una norma individual de composición y características específicas, que se fabrique con leche distinta de vaca, deben incluir en su denominación después de la palabra queso la indicación de la especie que corresponda.

Los quesos elaborados con leche de dos o más especies, deben incluir en su denominación, después de la palabra queso, la indicación de las especies animales de las que proceda la leche en orden descendente de proporciones. Esta denominación podrá reemplazarse por la de queso de mezcla

### **Según su maduración**

Los quesos se denominan de la siguiente forma:

Queso fresco: es el que está dispuesto para el consumo al finalizar el proceso de fabricación

Queso blanco pasteurizado: es el queso fresco en el que el coágulo obtenido se somete a un proceso de pasteurización, quedando dispuesto para el consumo al finalizar el proceso de fabricación

Queso madurado: es el que, tras el proceso de fabricación, requiere mantenerse durante cierto tiempo a una temperatura y en condiciones tales que se produzcan los cambios físicos y químicos característicos de él. La palabra madurado podrá sustituirse por los calificativos según el grado de maduración alcanzado por el producto a la salida de la fábrica (tabla 1)

**Tabla 1 Denominación del queso en función del tiempo de maduración**

Denominaciones facultativas	Peso > 1.5 Kg	Peso < 1.5 Kg
	Maduración mínima en días	
Tierno	7	
Semicurado	35	20
Curado	105	45
Viejo	180	100
Añejo	270	

(Real decreto del Código Alimentario Español, 2006)

Queso madurado con mohos: es a que en el que la maduración se produce, principalmente, como consecuencia del desarrollo característico de mohos en su interior, en la superficie o en ambas partes. Dicha denominación podrá sustituirse por la de queso azul o queso de pasta azul, cuando corresponda

### **Según su contenido de grasa**

Expresado en porcentaje masa/masa sobre el extracto seco total, los quesos se denominan:

Extra-graso: el que contenga un mínimo de 60%.

Graso: el que contenga un mínimo de 45 y menos del 60%

Semi-graso: el que contenga un mínimo de 25 y menos de 45%

Semidesnatado: el que contenga un mínimo de 10 y menos de 25%.

Desnatado: el que contenga menos de 10%.

Existe en el mercado una gran variedad de productos con muy distintas propiedades organolépticas (sabor, aroma, textura y color) y nutritivas.

### ***Quesos maduros***

Constituyen la categoría más abundante. Los de pasta blanda son por ejemplo el queso torta de casar en España y los quesos Camembert y Brie, que sufren un proceso de maduración por hongos y bacterias que actúan sobre las proteínas degradándolas hasta que el queso adquiere una consistencia untables entre los pasta semi dura se encuentran quesos como el de cabrales, Edam y gouda. Los quesos de pasta dura son sometidos a temperaturas más elevadas de los de blanda o semidura para que su periodo de maduración sea más corto, y su consistencia es mayor. Son ejemplos los quesos de los Pedroches, Manchego y Roncal en España, y Emmenthal y Cheddar en otros países (Gil, 2010).

### **Queso Torta de Guanajuato**



El queso torta de Guanajuato es un queso madurado, elaborado con leche pasteurizada de ovejas, cuya coagulación se realiza con cuajo vegetal y su maduración es como mínimo de 60 días a una temperatura de 4 a 8°C en cámara de refrigeración. Su corteza es fina y ligera, de color amarillo céreo a ocreo; en ocasiones dicha corteza se agrieta, permitiendo el vertido de su pasta, que

es untuosa, cremosa, casi líquida, de color amarillenta, y su sabor y aroma excepcional. La elaboración se caracteriza por el empleo como coagulante de la leche de la flor del cardo (*Cynara cardunculus* L).

### **Proceso de elaboración**

La leche empleada en la elaboración del queso torta de Guanajuato es obtenida de ovejas sanas de raza East Friesien. Debe presentar como mínimo 5% de proteína, un extracto mínimo quesero de un 11%, 6.5% de materia grasa, 18% de extracto seco total, una acidez máxima de 22°Dornic y un pH mínimo de 6.6 y máximo de 6.9.

Se pasteuriza la leche a 63°C por 30 min, posteriormente disminuyendo la temperatura a 28°C para agregar el cultivo compuesto por *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Brevibacterium* y *kluveromyces*, en una proporción de 10g por cada 100L de leche diluido en 500ml de leche pasteurizada, se deja reposar 20 minutos y se agrega el cuajo vegetal en porción de 25 ml por cada 100 L, diluido en una proporción de 1:20 de agua destilada. Se deja reposar 60-80 minutos para que cuaje la leche. Se verifica que la masa esté perfectamente cuajada se introduce la punta de un cuchillo (aproximadamente 10 cm) si sale limpio se procede a cortar la cuajada en el interior de la pasteurizadora con ayuda de liras. se deja reposar la cuajada durante 10 minutos elevando la temperatura a 26 °C. se elimina del 70 al 75 % del suero, vertiendo la masa cuajada sobre una manta de cielo, la cuajada es recibida en la tina de desuerado, los moldes circulares son cubiertos por una manta de cielo, en su interior se introduce la cuajada obtenida exprimiendo con las manos para eliminar el mayor porcentaje posible de suero, y así darle forma al queso. Se prensa el queso, 5 minutos de cada lado del queso, para facilitar la salida de suero del interior de la masa. Se sala el queso por inmersión en solución de salmuera por 4 h por cada lado del queso. Se introducen en la cámara de refrigeración con temperatura de 7°C ± 2 y HR 80% ± 10, para facilitar la correcta maduración del queso. La maduración de los quesos tiene una duración no inferior a 60 días, contados a partir de la fecha del ingreso a la cámara de refrigeración, aplicándose durante este período las prácticas de volteo y limpieza necesarias hasta que el queso alcanza sus características peculiares.

## ***BACTERIOCINAS***

### **Características de las Bacteriocinas**

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana producidos por síntesis ribosomal y son segregadas por un gran número de bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores (Papagianni, 2003; Joerger, 2003; Katikou, 2005; Motta et al., 2008). Estas sustancias con frecuencia actúan frente a las bacterias más estrechamente relacionadas. Sin embargo estudios recientes afirman que también pueden actuar frente a otras especies bacterianas, hongos y algunos parásitos (Eij- sink et al ,1998; Cotter et al., 2005; Svetoch et al., 2008).

En la naturaleza existe una enorme diversidad de bacteriocinas que han sido encontradas en casi todas las especies bacterianas examinadas hasta la fecha, y aun dentro de una especie podrían producirse diferentes tipos de bacteriocinas (Ennahar et al., 2000; Cintas et al ,2001; Joerger, 2003). Se piensa que el 99 % de las bacterias pueden producir cuando menos una bacteriocina y la única razón de que no se hayan aislado es debido a que han sido muy poco estudiadas (Gordon y O'Brien, 2006). Las halobacterias por ejemplo, miembros del dominio Archaea, producen su propio tipo de bacteriocinas, las halocinas (Joerger, 2003). Los microorganismos invierten una gran proporción de energía para la producción tanto la bacteriocina que tiene un historial más largo de uso seguro en alimentación y la que ha sido más estudiada. En 1953 se comercializo por primera vez en Inglaterra, en 1969 se aprobó su uso en alimentación por la OMS (Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives) y en 1983 se incluyó en la lista de aditivos de la Unión Europea; poco después, en 1988, fue aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) norteamericana (Cotter et al., 2005).

### **Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas**

Las bacterias ácido lácticas o bacterias lácticas (BAL) son microorganismos Gram-positivos, muy heterogéneos desde el punto de vista morfológico y fisiológico, y cuya característica principal es la producción de ácido láctico como producto

mayoritario de un metabolismo fermentativo de los carbohidratos. En general, las BAL son microorganismos de morfología bacilar o cocoide, no esporulados, micro-aerófilos o anaerobios facultativos, carecen de citocromos y catalasa sensu stricto y poseen un contenido de guanina y citosina (G+C) inferior a 50 mol %. Actualmente, el grupo de las BAL comprende microorganismos de los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Cintas et al., 2001; Rojas y Vargas, 2008). Las bacterias lácticas se localizan frecuentemente en hábitats ricos en nutrientes, caracterizados por la presencia de carbohidratos solubles y productos de la degradación de proteínas y vitaminas, y con bajas tensiones de oxígeno como por ejemplo, la leche y productos lácteos, productos cárnicos y vegetales fermentados, frutas y hortalizas frescas, ensilados, pescado y derivados de la pesca (Lindgren y Dobrogosz, 1990; Stiles, 1996; Cintas et al., 2000). Además, algunas bacterias lácticas son habitantes comunes del tracto gastrointestinal y mucosas del hombre y animales, del estiércol y de aguas residuales urbanas e industriales (Cintas et al., 2000).

En la actualidad las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son las que encierran un mayor interés ya que tienen el estatus de QPS (qualified presumption of safety), 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 (Joerger, 2003; Ogunbanwo et al., 2003; Drider et al., 2006; Millete et al., 2008).

Es importante mencionar que las bacterias ácido lácticas son también los microorganismos más utilizados como pro bióticos no solo en el ser humano sino en mamíferos y muy recientemente en los peces y crustáceos (Garriques y Arevalo, 1995; Gómez-Gil et al., 2000; Briones y Lozano, 2003; Campaña et al., 2003). Los estudios efectuados con BAL han reportado efectos positivos en el crecimiento, sobrevivencia y eliminación de patógenos de los organismos acuáticos; sin embargo, la gran diversidad de compuestos inhibidores producidos por las bacterias ácido lácticas, como las



bacteriocinas, requieren de rigurosos estudios sobre el modo de acción de estos compuestos sobre otros microorganismos en condiciones ambientales diferentes a las de su origen, ya que en la mayoría de los casos se han utilizado cepas aisladas del ser humano o de mamíferos y están siendo comercializadas y utilizadas en acuicultura y, a la fecha, no se cuenta con reportes sobre el tipo y efecto de estos compuestos en acuicultura (O'Sullivan et al., 2002).

### **Clasificación de las bacteriocinas**

Diversos investigadores han buscado clasificar a las bacteriocinas de acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas. A continuación se presenta la clasificación de estos compuestos propuesta por Kemperman et al, (2003).

Clase I: Lantibioticos. Son péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, b-metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. Con poca estabilidad al calor, péptidos policíclicos (< 5 KDa) con aminoácidos modificados. La formación de aminoácidos no comunes se explica por la deshidratación de los aminoácidos serina y treonina, con la posterior adición de los átomos de azufre de la cisteína a los dobles enlaces de los deshidroaminoácidos. Un ejemplo bien conocido de estas bacteriocinas es la nisina. A su vez, en función de su estructura y modo de acción, los lantibioticos se subdividen en 2 grupos:

Clase I A: Péptidos elongados y catiónicos que actúan a nivel de membrana y que engloban a los lantibioticos de un solo péptido y a aquellos que requieren la presencia de dos péptidos para ejercer su actividad antimicrobiana total.

Clase I B: Péptidos globulares e hidrófobos que actúan como inhibidores enzimáticos.

Clase II: No lantibioticos.- bacteriocinas lineales y no modificadas postraduccionalmente. Son péptidos pequeños (< 10 kDa) y termoestables, que actúan a nivel de la membrana plasmática. El representante más característico de este grupo es la pediocina PA- 1, la bacteriocina mas estudiada después de la nisina. En este grupo se pueden identificar tres subclases:

Clase II a: Péptidos activos contra *Listeria*, tienen la secuencia consenso en la región N-terminal TGNGVXC y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P.

Clase II b: Formadores de complejos para la formación de poros que consisten de dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana. En este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK.

Clase II c: péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B.

Clase III: bacteriocinas de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles. Las bacteriocinas más conocidas de esta clase son helveticina J, V, acidofilicina A y lactacinas A y B.

Clase IV: bacteriocinas complejas. Son péptidos con una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucídicas necesarias para su actividad biológica. Por tanto, esta clase incluye bacteriocinas que se consideran como glicoproteínas (lactocina S) o como lipoproteínas (mesenterocina 52).

Clase V: bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente. A esta clase pertenecen la enterocina AS-48 y la gasericina A.

### ***Nisina***

La nisina, descrita en 1928, fue la primer bacteriocina aislada a partir de la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis* Subsp. *Lactis*. Es la bacteriocina mejor caracterizada y es utilizada como conservador de alimentos; es la única reconocida por la FDA con la categoría GRAS (Generally Recognized As Safe). Se produce de forma natural en algunos productos lácteos y se utiliza en la producción de alimentos y como un aditivo en productos lácteos para prevenir la descomposición ocasionada por bacterias Gram positivas, especialmente de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria*

(Maldonado y Llanca, 2007). La Nisina es un péptido conocido por su elevada actividad antibacteriana frente a bacterias Gram-positivas, aunque también hay estudios en los que se demuestra su efecto frente a bacterias gram-negativas (Steven et al, 1991).

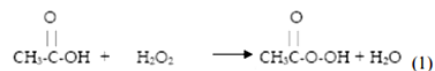
La nisina es un péptido de 34 aminoácidos, de bajo peso molecular menor a 5 kDa. La síntesis de la nisina es compleja, requiere de procesos de transcripción, traducción, modificaciones post-traduccionales, secreción, procesamiento, y señales de transducción. Existen dos variantes de esta bacteriocinas, la nisina A y la nisina Z, que difieren solamente en el aminoácido de la posición 27, la histidina en la nisina A cambia por asparagina en la nisina Z (Sangronis y Garcia,2007).

La nisina es ácida por naturaleza por lo que es estable en condiciones ácidas; su solubilidad aumenta al aumentar la temperatura y disminuir el pH. Se demostró que la nisina es rápidamente inactivada en el intestino por las enzimas digestivas y no puede detectarse en la saliva de humanos diez minutos después de haber consumido un líquido que la contenga (Simova et al., 2006).

### ***Saniper 20***

Es un sanitizante ácido líquido a base de ácido peracético para uso en plantas procesadoras de lácteos, bebidas y alimentos.

El ácido peracético (también conocido como ácido peroxiacético) es un equilibrio acuoso cuaternario de ácido acético y peróxido de hidrogeno, según la siguiente ecuación (1):



El ácido peracético ha adquirido un creciente interés entre los químicos alternativos al cloro, ya que se afirma que sólo se han identificado 3 sub productos no dañinos para la salud, como lo son el ácido acético, el agua y el oxígeno (Dell'Erbaa et al., 2007). El ácido peracético, a diferencia del cloro y sus derivados, es reconocido además por no generar

subproductos de descomposición carcinogénicos, mutagénicos y/o tóxicos, por lo que se lo ha definido como “amigable al ambiente” (Baldry et al, 1989)

El ácido peracético se forma por la reacción del ácido acético y el peróxido de hidrógeno con catalizadores. Se ha observado su eficacia en la reducción de recuentos microbianos en el agua de lavado de productos y en superficies de frutas (Hei, 1998). La FDA aprobó el uso de ácido peracético para sanitizar ciertos productos alimenticios, incluyendo las frutas y vegetales, a concentraciones que no excedan las 80 ppm en el agua de lavado (Code Federal Regulations, 2007).

El ácido peracético es un fuerte agente oxidante. Su actividad depende del pH, siendo más activo a pH más bajos. Sin embargo su actividad se mantiene en un amplio rango de pH, disminuyendo en forma importante por arriba de pH 9. Su acción antimicrobiana se basa en su capacidad oxidante. Se plantea que los grupos sulfhidrilo en proteínas, enzimas y metabolitos son oxidados. De esta forma se pierde la funcionalidad de muchas de éstas macromoléculas, lo cual trae como consecuencia la ruptura celular por pérdida de funcionalidad de la membrana citoplasmática (Garmendia y Vero, 2008).

### ***Determinación de microorganismos Indicadores***

La calidad microbiológica de los alimentos es fundamental porque influye en su conservación y vida de anaquel y, sobre todo, porque los microorganismos presentes en ellos, pueden ser causantes de enfermedades transmitidas por alimentos o ETA's.

La detección en el laboratorio de los microorganismos patógenos puede ser muy complicada, muy lenta y/o muy costosa para determinaciones rutinarias. Además, es concluyente cuando se encuentra un microorganismo patógeno pero puede haber casos en que no se detecte por razones circunstanciales como el clima o la cantidad de individuos infectados que están contaminando, a pesar de que el manejo del alimento implique el riesgo de que el patógeno aparezca en cualquier momento.

En la actualidad existen métodos rápidos para la determinación de microorganismos indicadores, tales como COMPACT DRY (Nissui Pharmaceutical Co. Ltd; suministrado

por Hyserve GmbH & Co. KG), que nos permiten obtener resultados en 24 hs. Las placas contienen sustratos cromogénicos, y esto hace que se puedan identificar las colonias.

### ***E. coli* y Coliformes**

El grupo Coliformes totales está compuesto por cuatro géneros de la familia Enterobacteriaceae: Citrobacter, Enterobacter, Escherichia y Klebsiella. Son bacilos gram negativos capaces de crecer en medios que contienen sales biliares y fermentadores de lactosa. En la industria de alimentos, los coliformes se utilizan como microorganismos indicadores, es decir, aquellos cuya presencia en cantidades dadas indica un tratamiento o procesado de inocuidad inadecuado.

*Escherichia coli* es un microorganismo cuyo hábitat natural es el tracto entérico del hombre y los animales. Su presencia en los alimentos indica generalmente una contaminación directa o indirecta de origen fecal. Cifras sustanciales de *E. coli* en alimentos sugieren, sin lugar a duda, una falta general de higiene en el manejo de los mismos.

La utilización de métodos rápidos de análisis para Coliformes y *E. coli*, que nos permitan cuantificar sin necesidad de confirmaciones bioquímicas, resulta sumamente ventajosa para la industria de los alimentos, especialmente los alimentos frescos, ya que nos permite liberar rápidamente los productos para el consumo sabiendo que se cumple con la legislación vigente, a la vez se disminuyen los costos de almacenamiento y se ganan días del producto en la góndola.

Los métodos tradicionales para el análisis de Coliformes totales y *E. coli* comprenden tres pasos sucesivos de complejidad creciente y el tiempo del análisis es de 4 a 6 días, dependiendo de los resultados

### ***Salmonella***

Las bacterias pertenecientes al género salmonella, familia Enterobacteriaceae, se caracterizan por ser bacilos gran negativos, anaerobios facultativos, utilizan citrato como única fuente de carbono y poseen metabolismo de tipo oxidativo y fermentativo (Parra et al. 2002)

Dentro de su clasificación taxonómica, actualmente se describen dos especies: *S. enterica* y *S. bongori*, donde la primera a su vez se subdivide en seis subespecies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*; *Salmonella enterica* subespecie *enterica* representa 99% de los serotipos aislados, siendo estos últimos determinados por los antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares o de superficie (Vi). Es así como se describen más de 2500 serotipos o serovares de este género (Dunkley et al., 2009; Uribe y Suarez, 2006).

La salmonelosis se presenta en términos generales, dentro de dos espectros clínicos: el primero, la fiebre entérica más conocida como fiebre tifoidea, caracterizada por ser un cuadro febril sistémico cuyos agentes etiológicos son *S. typhi* y *S. paratyphi*, donde el hombre se comporta como único huésped; y el segundo, la gastroenteritis, caracterizada por síntomas como dolor abdominal, malestar general, vómito, diarrea y en algunos casos fiebre, frecuentemente relacionado a previo consumo de alimentos contaminados de origen animal, es importante tener en cuenta que en los pacientes adultos inmunocomprometidos con infección por *Salmonella* no tifoidea, existe mayor mortalidad relacionada con bacteriemia recurrente (Pigott, 2008; Gordon, 2008)

### **Mesófilos aerobios**

El análisis de los alimentos y piensos para determinar la existencia, tipo y número de microorganismos es básico para la microbiología de alimentos. El número relativo de microorganismos en la muestra los recuentos de microorganismos viables se basan en el número de colonias que se desarrollan en placas previamente inoculadas con una cantidad conocida de alimento e incubadas en unas condiciones ambientales determinadas. Estos recuentos no pueden considerarse como recuentos totales ya que solo son susceptibles del conteo aquellos microorganismos capaces de crecer en las condiciones establecidas. Se puede conseguir una amplia gama de condiciones variando la temperatura, la composición del medio ambiente, gran cantidad de bacterias pueden crecer a una atmósfera con tensión de oxígeno normal, algunas pueden obtener oxígeno directamente de varios sustratos, la composición del medio y el tiempo de incubación. El intervalo de temperaturas en el que crecen los microorganismos es muy amplio: de  $-34^{\circ}\text{C}$  a  $> 90^{\circ}\text{C}$  (Martínez, 2011).

### **Compact Dry™ “Nissui”**

Compact Dry™ es un procedimiento sencillo y seguro para determinar y cuantificar microorganismos en productos alimenticios, cosméticos y otras materias primas, incluidas las farmacéuticas. Las placas cromógenas de Compact Dry™ listas para el uso son adecuadas tanto para los controles a realizar durante el proceso como para los del producto final.

Las placas Compact Dry™ son extremadamente fáciles de manejar -<<easy to use>>: basta con pipetear 1ml de la muestra sobre la placa Compact Dry™ y esperar hasta que quede difundida de forma homogénea por toda la superficie de la placa. A continuación se incuba la placa según las prescripciones del prospecto. Gracias a los indicadores redox y a los sustratos cromógenos, las colonias bacterianas crecen en colores específicos, pudiendo así distinguirse e identificarse con suma facilidad. Para estudios posteriores, a continuación se puede extraer fácilmente colonias específicas por separado.

### **Compact Dry™ TC**

Compact Dry™ TC es un medio que contiene agar de cultivo estándar y que sirve para comprobar el índice de germinación total. Debido a la sal de tetrazol, indicador redox, las colonias de bacterias presentan una coloración roja, pudiéndose con ello distinguir muy fácilmente de posibles restos de alimentos.

### **Compact Dry™ EC**

Con Compact Dry™ EC se pueden detectar y distinguir Coliformes y *E. coli*. El medio contiene dos sustratos enzimáticos cromógenos: Magenta-GAL y X-Gluc. De esta manera los Coliformes denotan una coloración roja, mientras que la de los *E. coli* es azul. Sumando las colonias rojas y azules resulta la cifra total del grupo Coliformes.

### **Compact Dry™ SL**

Compact Dry™ SL para verificación de salmonellas: sólo hace falta un pre-cultivo de 20 – 24 horas.

La detección de salmonellas por medio de placas Compact Dry™ SL se realiza de modo seguro y rápido basándose en un triple criterio:

1. Cambio de color del medio, de azul lila a amarillo, causado por la alcalización del medio por obra de la decarboxilasa de lisina específica de la salmonella
2. Surgimiento de colonias verdinegras por biodegradación del sustrato cromógeno así como por el sulfuro de hidrógeno producido específicamente por las salmonellas
3. Capacidad de enjambre de las salmonellas

## **PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS**

### ***Materiales***

#### **Selección de la muestra**

Se utilizaron muestras de la planta procesadora de quesos “El Trashumante” ubicada dentro de las instalaciones de Tequilera Corralejo S.A de C.V a las cuales se les realizó determinaciones microbiológica con ayuda de métodos rápidos Compact Dry™ “Nissui”.

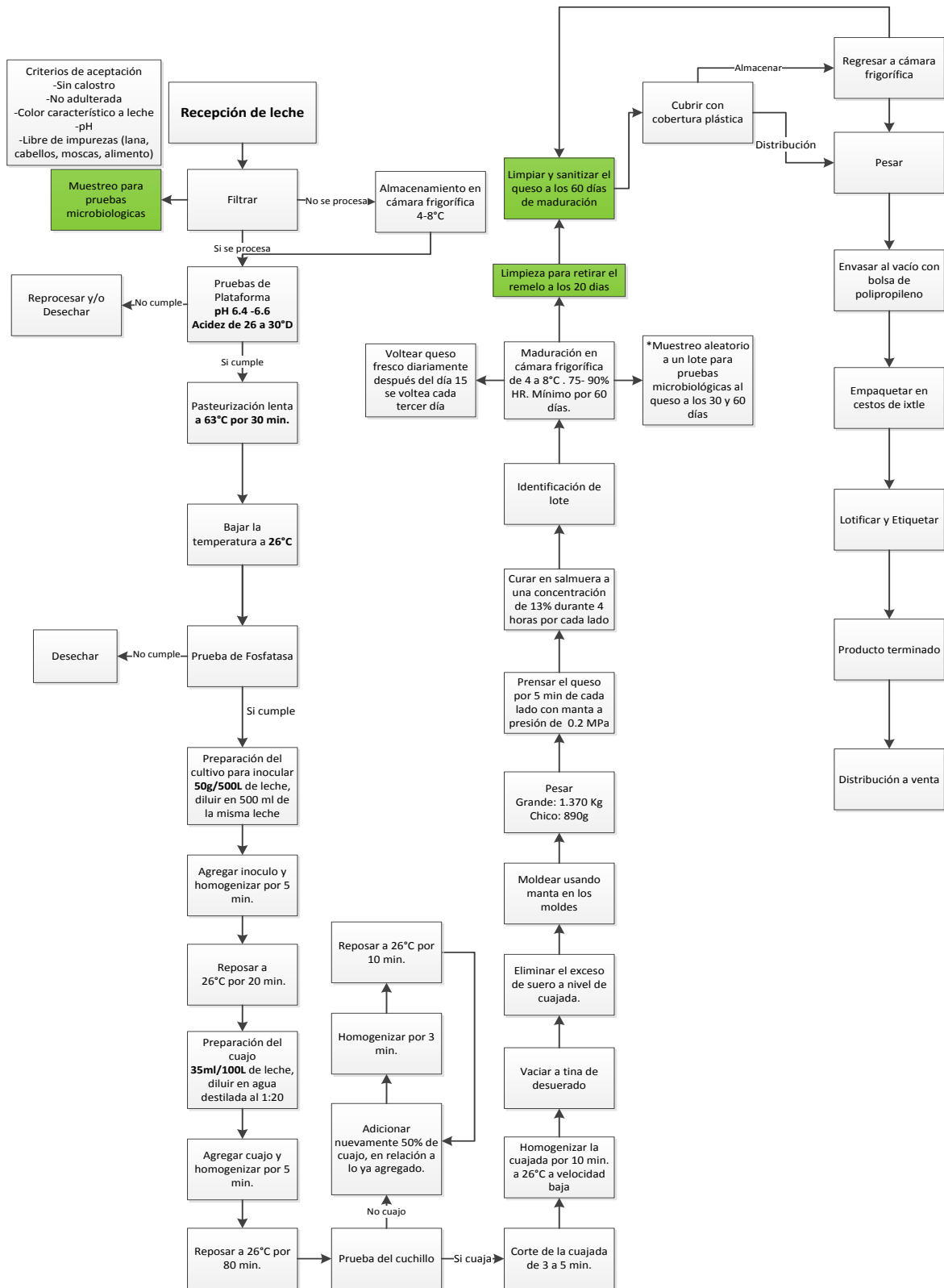
#### **Procedimiento de elaboración del queso torta de Guanajuato**

1. Se pasteurizo la leche mediante una pasteurización LTLT.
2. Se llevó a cabo un control de calidad para verificar si la leche fue pasteurizada correctamente, se tomó una muestra de leche para realizar la prueba de fosfatasa con el kit LACTO-ZYMA®.
3. Se agregó el cultivo (microorganismos presentes en el cultivo: Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Brevibacterium y kluyveromyces,) a la leche en porción de 50g por cada 500 L de leche, diluido en 500 ml de leche pasteurizada.
4. Se dejó reposar la leche por 20 min a 23° C.
5. Se agregó el cuajo vegetal de la marca Abiasa® en porción de 25 ml por cada 100 L, diluido en una proporción de 1:20 de agua destilada. Se dejó reposar 60-80 minutos para que la leche cuaje.



6. Se verificó que la masa este perfectamente cuajada introduciendo la punta de un cuchillo (aproximadamente 10 cm).
7. Se cortó la cuajada en el interior de la pasteurizadora con ayuda de liras.
8. Se elevó la temperatura a 26°C y se dejó reposar la cuajada durante 10 minutos.
9. Se eliminó el 70-75 % del suero, vertiendo la masa cuajada sobre la tina de desuerado.
10. Se cubrieron los moldes circulares con manta cielo, en su interior se introdujo la cuajada obtenida exprimiendo con las manos para eliminar el mayor porcentaje posible de suero, y así darle forma al queso.
11. Se pesó el queso en el molde para conseguir un peso aproximado de 0.890kg para quesos chicos.
12. Se prensó el queso, 5 minutos de cada lado del queso, para facilitar la salida de suero del interior de la masa.
13. Se saló el queso por inmersión en solución de salmuera al 13%, la duración es de 4 h por cada lado del queso.
14. Se introdujo el queso en la cámara de refrigeración con temperatura de 7°C ± 2 y HR 80% ± 10, facilitando la correcta maduración del queso.
15. Se realizó el volteo de los quesos todos los días durante su maduración y la limpieza a los 20 días de maduración para retirar el rémelo.
16. A los 60 días de maduración los quesos son sumergidos en agua potable y son tallados para eliminar el hongo presente en la superficie, se secan y son cubiertos con cobertura protectora para quesos (Cleriplast Raff®).

## Diagrama de flujo del proceso de elaboración del queso torta de Guanajuato.



### **Toma de muestras**

Se tomaron al azar 4 quesos del lote #3 (17/03/14), con 20 días de maduración, se tomaron los quesos de este lote debido a que ya tenían los 20 días de maduración y según los manuales de procedimiento de la planta procesadora “El trashumante” los quesos deben de ser lavado a los 20 días para retirar el rémelo para permitir la formación de corteza y correcta maduración.

### **Preparación de soluciones de nisina**

Se prepararon soluciones de nisina a concentraciones de 2.5ml/L, 3.5 mg/L y 4.5 mg/L, disueltas en agua destilada estéril, se mantuvo en refrigeración después de su preparación.

### **Preparación de solución de Saniper 20**

Se preparó la solución sanitizante Saniper 20 al 1% de acuerdo a los manuales de procedimientos de la planta procesadora de quesos “El trashumante”, diluyendo 200ml de saniper 20 en 200 litros de agua potable; el queso tratado con esta solución se tomó como blanco o control al realizar las pruebas microbiológicas.

### **Lavado**

Con las soluciones preparadas, se realizó el lavado de los quesos retirando el rémelo de la corteza de estos, con agua potable, posteriormente se sumergieron 10s en las soluciones.

Muestra	Solución
Queso #1	Solución de nisina 2.5mg /l
Queso #2	Solución de nisina 3.5 mg/l
Queso #3	Solución de nisina 4.5 mg/l
Queso #4	Solución de Saniper 20 al 1%

Cuadro 2. Distribución del muestreo

Después de sumergir los quesos en las soluciones se secaron y orearon para posteriormente colocarlos en los estantes de la cámara para continuar su proceso de maduración.

## **Desarrollo**

### **Preparación de reactivos y muestra**

El desarrollo de las actividades se realizó con el equipo de protección adecuado considerando la NOM-251-SSA1-2009. Práctica de higiene para de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios.

La toma de muestra se realizó considerando la NOM-109-SSA1-1994 Procedimiento para la Toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

La preparación y diluciones de las muestras se realizaron en base a la NOM-110-SSA1-1994 Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico

### **Determinación de *salmonella***

#### ***Pre-enriquecimiento***

Se pesaron 25 gramos de muestra en una bolsa estéril y se suspendieron en 225ml de agua peptonada estéril, se homogenizó la muestra e incubó a 35-37 °C por 24 horas, al retirar la muestra de la incubadora se volvió a homogenizar.

#### ***Inoculación de la muestra***

Se utilizaron pipetas estériles para la inoculación de la muestra, se colocaron cuidadosamente 0.1 ml (3 gotas de la pipeta de 1.0 ml) de la muestra pre-enriquecida dentro del medio deshidratado (aproximadamente a un cm del borde interior de la placa).

Después de la inoculación del cultivo pre-enriquecido, se goteó cuidadosamente 1.0 ml de agua estéril en el punto opuesto de donde se colocó la muestra. El agua estéril difundió automáticamente y la placa se humectó de manera uniforme.

Se cerró de manera correcta la placa y volteó la placa ya tapada.

Se incubó la placa 20-24 horas a 41-43°C.

### ***Detección de salmonella***

La detección de salmonellas por medio de placas Compact Dry SL se realizó de modo seguro y rápido basándose en un triple criterio:

- a) Cambio de color del medio, de azul lila a amarillo, causado por la alcalización del medio por obra de la decarboxilasa de lisina específica de la salmonella.
- b) Surgimiento de colonias verdinegras por biodegradación del sustrato cromógeno así como por el sulfuro de hidrógeno producido específicamente por las salmonellas como se observa en la Figura 3.
- c) Movilidad de las Salmonella, las colonias verdes o negras se ven salpicadas en el lugar de la inoculación.



**Figura 3 Detección de salmonella en el medio Compact Dry SL.**

### **Determinación de mesófilos aerobios, *E. coli* y Coliformes totales**

#### ***Preparación de diluciones***

Para realizar el análisis microbiológico, inicialmente se realizaron diluciones de cada una de las muestras. Para ello, se pesaron 10 g de la muestra en una bolsa estéril y se suspendieron en 90 mL (Dilución  $10^{-1}$ ) de agua peptonada.

Posteriormente, se realizaron las diluciones subsecuentes mediante la transferencia de 1 mL de cada dilución a un tubo de ensayo que contenía 9 mL de agua peptonada, hasta obtener la dilución  $10^{-6}$ . Las diluciones utilizadas durante la evaluación se presentan en la siguiente tabla.

Determinación	03/04/14		10/04/14		17/04/14	
<i>E. coli</i> y Coliformes	$10^{-3}$	$10^{-6}$	$10^{-3}$	$10^{-5}$	$10^{-2}$	$10^{-4}$
Mesófilos aerobios	$10^{-3}$	$10^{-6}$	$10^{-3}$	$10^{-5}$	$10^{-2}$	$10^{-4}$

Tabla 3. Diluciones utilizadas durante las evaluaciones

### ***Inoculación de la muestra***

Se inoculó 1 ml de la dilución correspondiente al medio Compact Dry™ EC y al Compact dry™ TC.

Se cerró de manera correcta la placa y se volteó la placa ya tapada.

Se incubó la placa a 35-37°C por 24 horas para Compact dry™ EC y por 48 horas para Compact dry™ TC.

### ***Detección de E. Coli.***



Figura 4 Detección de *E. coli* y coliformes en el medio Compact Dry™ EC.

Una vez terminado el tiempo de incubación, se observaron y analizaron los resultados de las placas y se presentó un resultado.

\*Con Compact Dry™ EC se pudieron detectar y distinguir Coliformes y *E. coli*. El medio contiene dos sustratos enzimáticos cromógenos: Magenta-GAL y X-Gluc. De esta manera los Coliformes desarrollan una coloración magenta, mientras que la coloración de los *E. Coli* es azul, como se observa en la Figura 4.

Sumando las colonias magentas y azules resulta la cifra total del grupo Coliformes.

### ***Detección de mesófilos aerobios***

Una vez terminado el tiempo de incubación, se observaron y analizaron los resultados de las placas y se presentó un resultado.

Debido a la sal de tetrazolio, indicador redox que contiene el medio Compact Dry™ TC, las colonias de bacterias presentan una coloración roja, pudiéndose con ello distinguir muy fácilmente de posibles restos de alimentos. Como se observa en la ilustración 5.



**Figura 5** Detección de Mesófilos aerobios en el medio Compact Dry™ TC.

### **Expresión de los resultados**

Se contaron el número de colonias observadas en la placa y el resultado se multiplicó por el inverso de la dilución. Utilizando la siguiente fórmula:

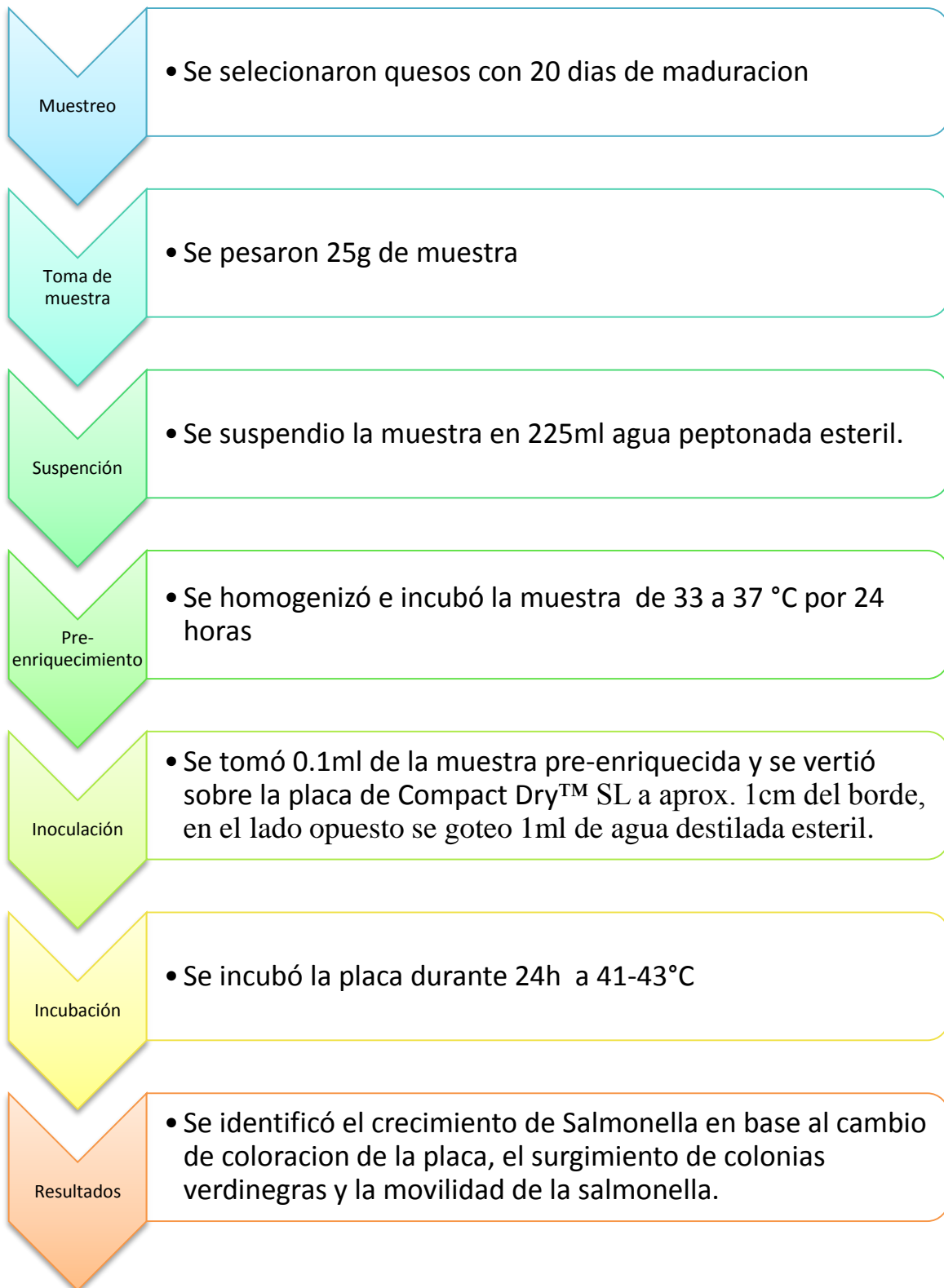
$$\frac{UFC}{Ml} = \frac{(No. De colonias)(inverso de la dilución)}{Ml sembrados}$$

Se reportó como UFC/g. (unidades formadoras de colonias por gramo).

### **Monitoreo de las muestras**

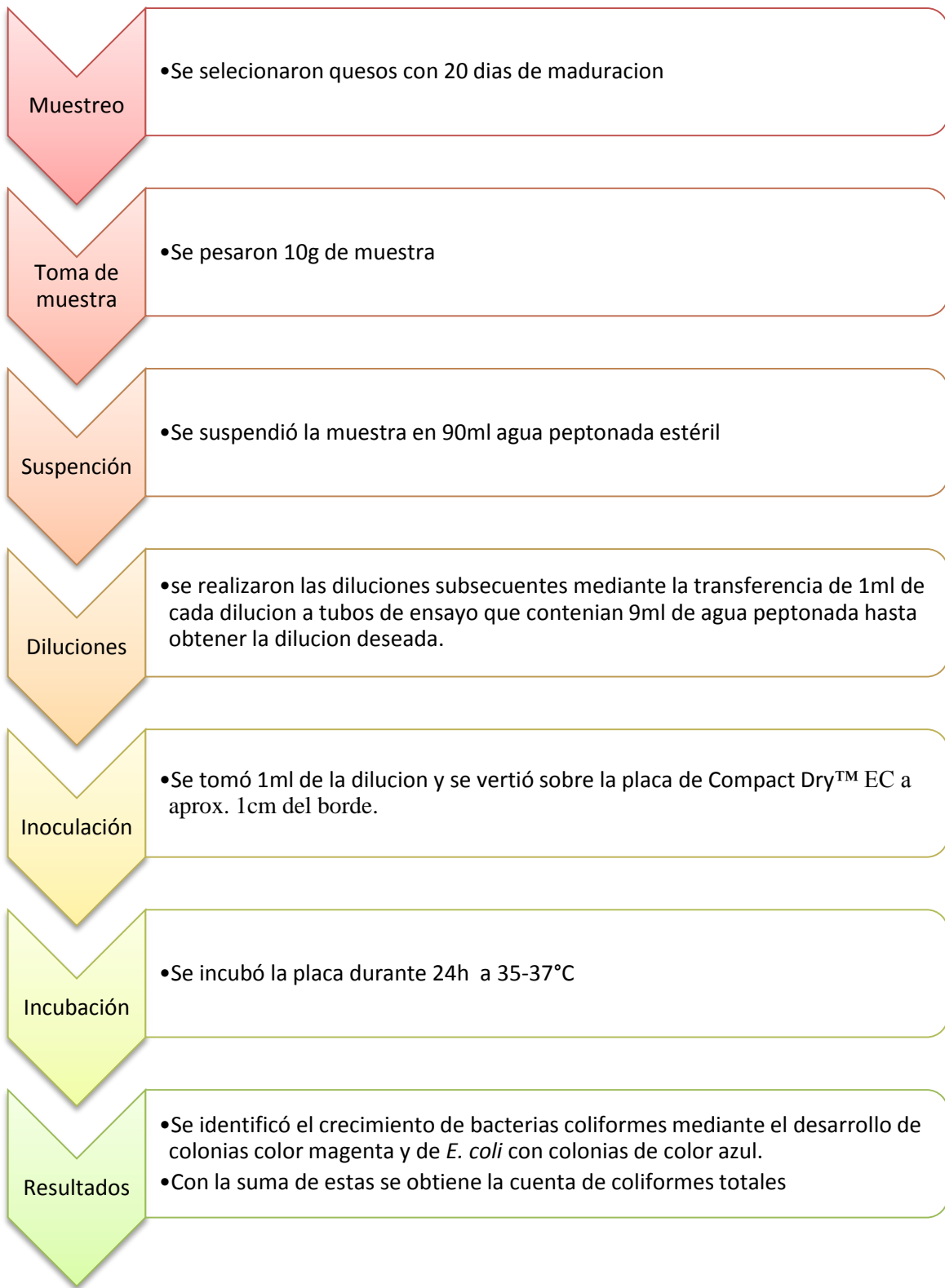
A los 8 días posteriores de la aplicación de las soluciones, se realizaron análisis microbiológicos a cada una de las muestras con ayuda de los métodos Compact Dry™, para la determinación de mesófilas aerobios, salmonella, *E. Coli* y coliformes totales. Estas determinaciones se realizaron a los 8, 16, 24 días, posteriores de la aplicación de las soluciones problema.

## Diagrama de flujo de procedimiento para para la determinación de salmonella

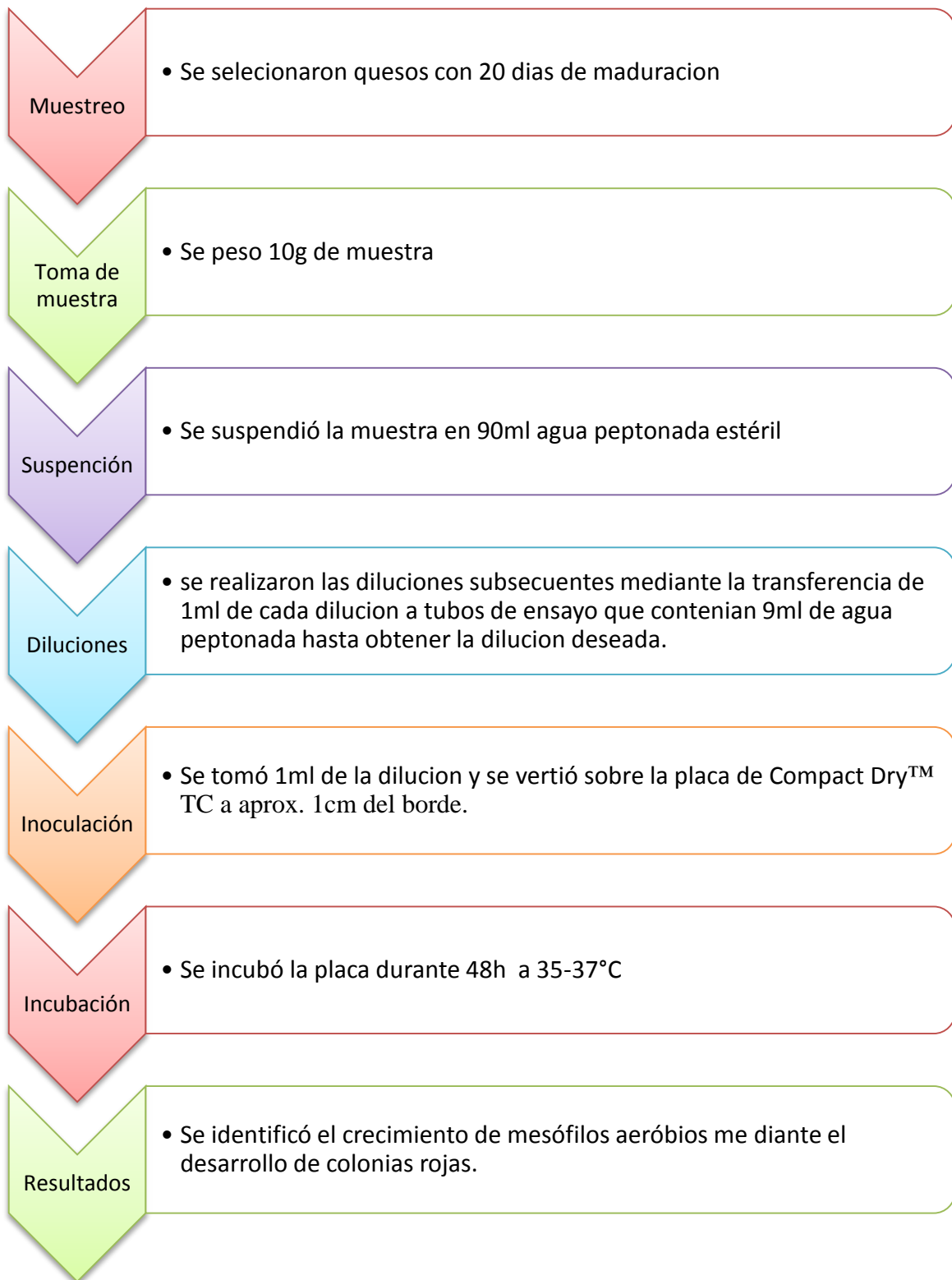




## Diagrama de flujo para la determinación de Coliformes y *E. coli*



## Diagrama de flujo para la determinación de mesófilos aerobios



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

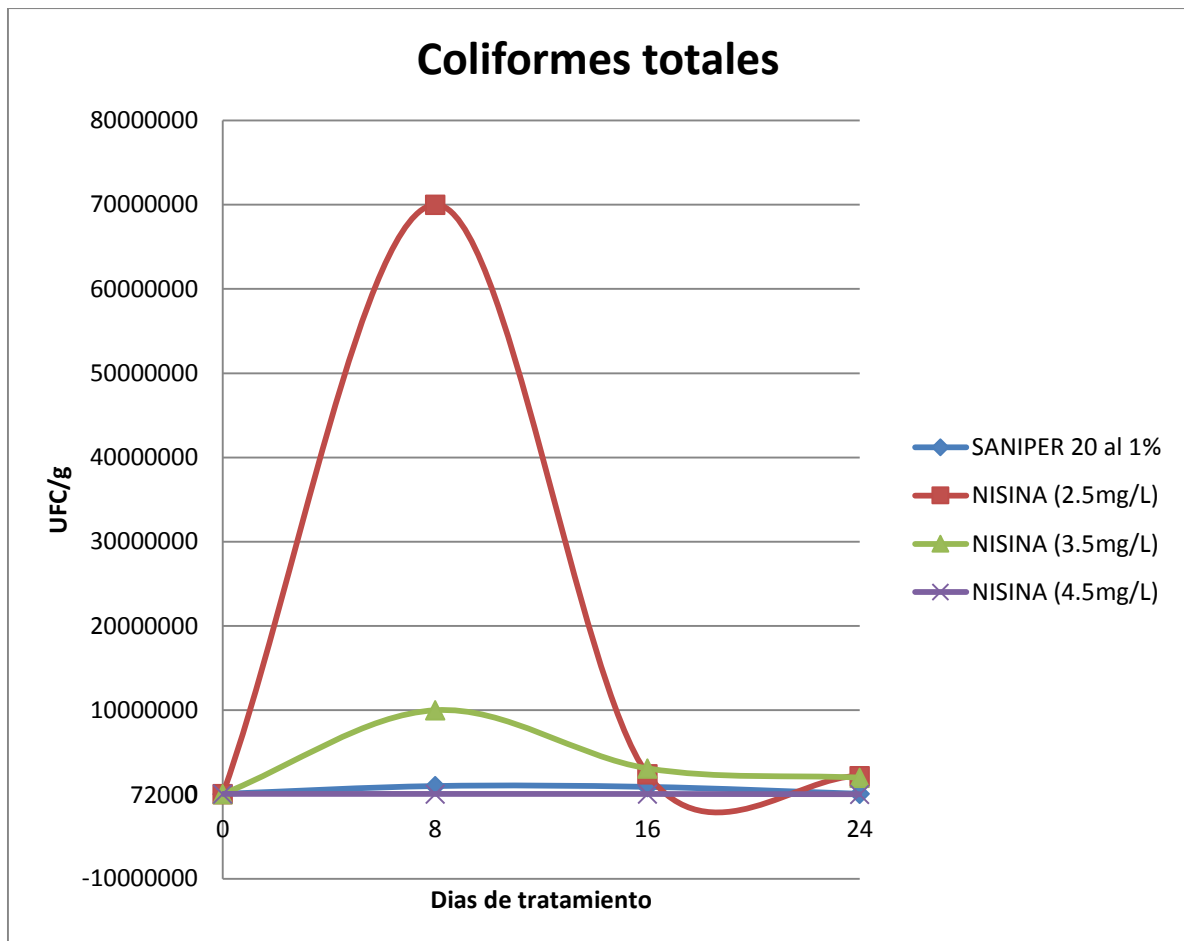
Durante la realización de este proyecto se obtuvieron los resultados del recuento de mesófilos aerobios, *E. coli* y coliformes obteniendo resultados significativamente diferentes entre el recuento de mesófilos aerobios y *E. coli* y coliformes esto posiblemente es causado por la competencia microbiana por los nutrientes y/o el efecto de la acidez provocada por el cultivo iniciador; se reportan los resultados de los análisis microbiológicos a los 0, 8, 16 y 24 días de tratamiento, empezando el tratamiento a los 20 días de maduración de los quesos, se tomó el tratamiento con saniper 20 al 1% como control o blanco debido a que es el tratamiento que se aplicaba a los quesos a los 20 días de maduración en la planta procesadora de quesos “El trahumante”, se comparó su eficiencia contra las soluciones de nisina a diferentes concentraciones.

### Recuento de *E. coli* y coliformes

Tratamiento	Días después del tratamiento			
	0	8	16	24
Saniper 20 al 1% (Control)	72,000 UFC/g	1,000,000 UFC/g	900,000 UFC/g	800,000 UFC/g
Nisina a 2.5mg/L	72,000 UFC/g	7,000,000 UFC/g	2,400,000 UFC/g	2,200,000 UFC/g
Nisina a 3.5mg/L	72,000 UFC/g	10,000,000 UFC/g	3,100,000 UFC/g	2,000,000 UFC/g
Nisina a 4.5mg/L	72,000 UFC/g	64,000 UFC/g	88,000 UFC/g	30,000 UFC/g

**Cuadro 2 recuento de *Coliformes* totales**

En el cuadro 2 se presentan los resultados obtenidos para el recuento de *E. coli* y Coliformes, la suma de esta será el total de Coliformes totales en los quesos madurados de oveja tipo torta de Guanajuato. Todos los quesos presentaron mayor cantidad de bacterias Coliformes según el límite máximo permitido por la NOM-243-SSA1-2010 que es 100 UFC/g para quesos de suero no marcando un límite específico para queso madurados; el tratamiento marcado como 0 representa el resultado del queso que no había sido lavado, ni tratado con ninguna solución.



**Gráfica 6 Comparación de los resultados del recuento de Coliformes totales**

En la gráfica 6 se presentan los resultados de las evaluaciones del crecimiento de *E. coli* y Coliformes en placas Compact Dry™ EC,; en la anterior ilustración se observa claramente un aumento considerable después del tratamiento del día 0 al 8 con la solución de nisina a 2.5ml/L esto pudo deberse a una contaminación por el agua potable utilizada para retirar el rémelo ya que esta se tomó directamente del grifo, de los 8 a los 16 días se vio una disminución considerable esto pudo deberse al crecimiento de las bacterias de las bacterias presentes en el cultivo iniciador provocando así una competitividad con las bacterias coliformes; lo cual demuestra su baja eficiencia en comparación a los resultados obtenidos con las soluciones de nisina a 4.5mg/L y Saniper 20 al 1%, obteniendo como mejor resultado la solución de nisina a 4.5mg/L debido a su evidente eficiencia como control de bacterias Coliformes, aunque los resultados sean aún muy elevados de acuerdo a los límites permitidos por la NOM-243-SSA1-2010.

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, 2000). Basado en las características catiónicas e hidrofílicas de la nisina, dos son los mecanismos que explican el modo de acción de la nisina sobre la permeabilización de la membrana celular: 1) Las bacteriocinas actúan como complejo de poración en el cual los monómeros se unen, insertan y oligomerizan en la membrana citoplasmática para formar un poro y 2) las bacteriocinas desestabilizan la membrana a modo de un detergente (Abee et al, 1995; Muriana, 1996). 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 (Boraziaris y Adams, 1999).

Se ha demostrado también que un choque térmico puede aumentar la sensibilidad de la célula bacteriana Gram negativa a la nisina, aunque el efecto ocurre mayormente cuando la bacteriocina está presente durante el tratamiento térmico y no cuando se adiciona después, debido a que las células pueden recuperarse del efecto negativo causado por las temperaturas elevadas (Boraziaris y Adams, 2001). En este estudio, la leche fue pasteurizada a 63°C por 30 minutos y la nisina fue utilizada para sumergir los quesos a los 20 días de maduración; sin embargo, se observó en los quesos una menor cantidad de Coliformes totales con respecto al control en el tratamiento de la solución de nisina a 4.5mg/L. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Cutter y Siragusa (1995), quienes reportaron actividad inhibitoria de nisina frente a bacterias Gram negativas.

De todos los tratamientos, los quesos tratados con nisina a 4.5mg/L fueron los que presentaron un recuento menor de *E. coli* y Coliformes significativamente menor a los demás tratamientos, esto permite obtener un queso con una vida útil prolongada, ya que el efecto combinado de la refrigeración con la bacteriocina, evita el crecimiento microbiano excesivo (Kikkidou et al, 2007), aun los resultados obtenidos siguen estando fuera de los límites permitidos por la NOM-243-SSA1-2010.

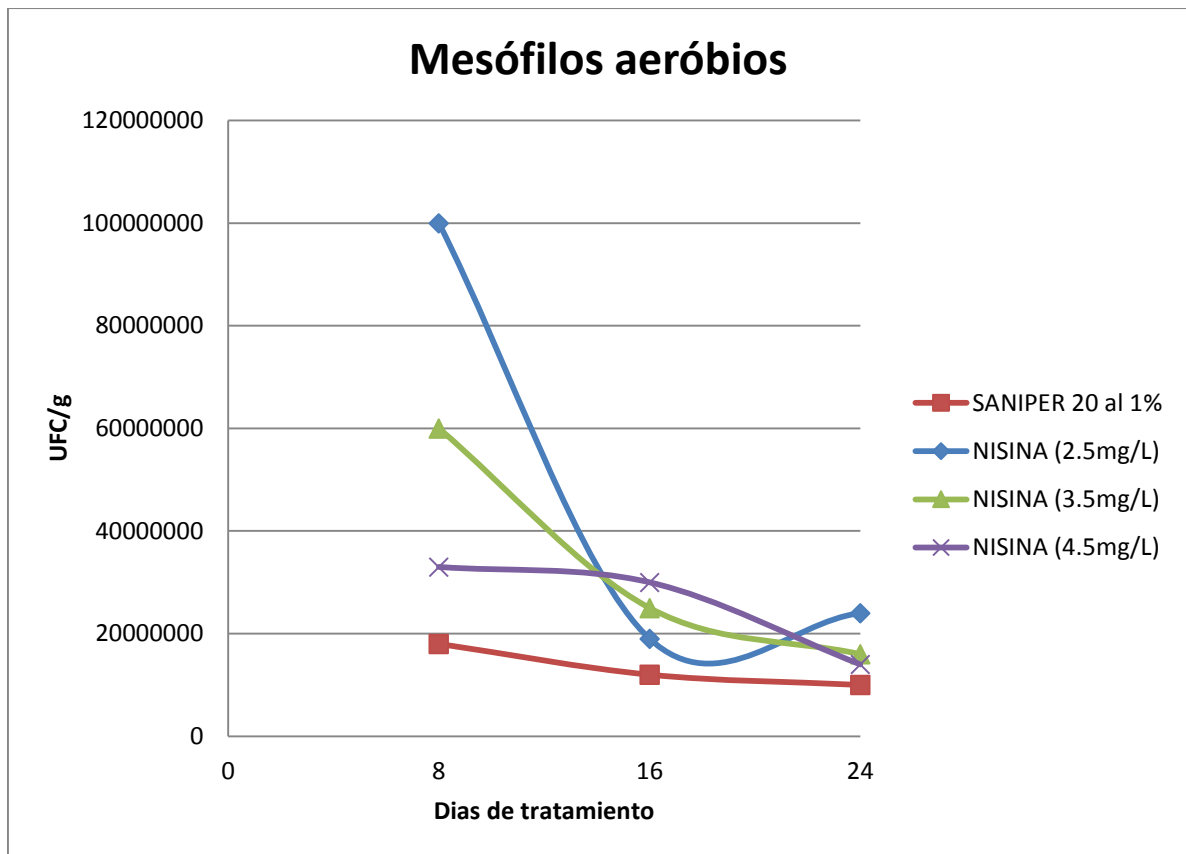
## Recuento de mesófilos aerobios

Tratamiento	Días después del tratamiento			
	0	8	16	24
Saniper 20 al 1% (Control)	No determinable	18,000,000 UFC/g	12,000,000 UFC/g	1,000,000 UFC/g
Nisina a 2.5mg/L	No determinable	100,000,000 UFC/g	19,000,000 UFC/g	24,000,000 UFC/g
Nisina a 3.5mg/L	No determinable	60,000,000 UFC/g	25,000,000 UFC/g	16,000,000 UFC/g
Nisina a 4.5mg/L	No determinable	33,000,000 UFC/g	30,000,000 UFC/g	14,000,000 UFC/g

**Cuadro 3 Recuento de Mesófilos aerobios**

En la cuadro 5 se pueden observar los resultados obtenidos para el recuento de mesófilos aerobios a los 0, 8,16 y 24 días de tratamiento en los quesos con 20 días de maduración. Los quesos presentaron mayor población total de microorganismos, posiblemente debido al crecimiento de los microorganismos presentes en el cultivo iniciador (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Brevibacterium* y *kluuveromyces*), ya que algunas de ellas son bacterias anaerobias facultativas y mesófilas, cuya población está representada en el recuento de mesófilos aerobios. Además, está demostrado que a temperaturas de refrigeración, condiciones bajo las cuales se almacenaron los quesos, éstos pueden crecer (Valbuena et al, 2005).

De todos los tratamientos, los quesos tratados con saniper 20 al 1% fueron los que presentaron un recuento de mesófilos aerobios significativamente menor, lo que demuestra el efecto de este sobre la población bacteriana total. Debido a que la función antimicrobiana del saniper 20 (ácido peracético) se basa en su capacidad oxidante, actuando sobre los grupos sulfhidrilo en proteínas, enzima y metabolitos, de esta forma se pierde la funcionalidad de muchas de éstas macromoléculas, lo cual trae como consecuencia la ruptura celular por pérdida de funcionalidad de la membrana citoplasmática (Garmendia y Vero, 2008).



**Gráfica 7 Comparación de los resultados del recuento de mesófilos aerobios**

En la gráfica 7 se presenta la comparación de los resultados obtenidos del crecimiento de mesófilos aerobios en las palcas Compact Dry™ TC (bacillus, enterococcus, corynebacterium, lactobacillus, micrococcus, staphylococcus, streptococcus, aeromonas, citrobacter, enterobacter, escherichia, klebsiella, kluyvera, pseudomona, proteus, serratia, rahnella, candida, etc), se observa que las soluciones de saniper 20 al 1% tienen una mejor eficiencia en el control de microorganismos mesófilos que la solución de nisina a 4.5mg/L, esto posiblemente se debió a que el efecto de la nisina es limitado ya que no se ha demostrado su eficiencia contra levadura y hongos. En el tratamiento con la solución de nisina a 2.5mg/L se nota un drástico descenso esto puede deberse a que al ser menor la concentración de nisina permite la proliferación de las bacterias del cultivo iniciador, estando presente en estas bacterias ácido láctico que son productoras de bacteriocinas, pudiendo ser este el factor por el cual se nota el drástico descenso en la gráfica anterior, del día 16 al 24 se nota un ligero aumento esto puede deberse a que durante la maduración se da el desarrollo de microorganismos como levaduras que forman parte del cultivo iniciador y se encuentran incluidas en la cuenta total de mesófilos aerobios.

Aunque los resultados obtenidos del queso tratado con Saniper 20 al 1% fueron menores a los demás tratamientos, estos resultados se encuentran fuera de los límites de la NOM-243-SSA1-2010, que marca 200,000 UFC/g, aunque este límite no es específico para quesos madurados.

#### Detección de salmonella

En la detección de salmonella se encontró presencia de ésta en 25g, siendo que la NOM-243-SSA1-2010 indica que debe ser negativo, los tratamientos utilizado favorables en la inhibición del crecimiento de salmonella fueron el de nisina al 3.5 mg/L, 4.5mg/L y Saniper 20 al 1%, el tratamiento de nisina a 2.5mg/L dio en todas las demás detecciones un resultado positivo.

Tratamiento	Días después del tratamiento			
	0	8	16	24
Saniper 20 al 1% (Control)	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
Nisina a 2.5mg/L	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Nisina a 3.5mg/L	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
Nisina a 4.5mg/L	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo

**Cuadro 4 Detección de salmonella**

El uso de nisina la conservación de quesos madurados de oveja, resultó ser eficaz para inhibir el crecimiento de bacterias Coliformes y *salmonella* en concentraciones mayores a 3.5mg/L, al igual que la solución sanitizante de Saniper 20 al 1%, lo que permite concluir que su uso como preservante eficaz para obtener un producto de buena calidad microbiológica.

## CONCLUSION Y RECOMENDACIONES

El presente estudio se planteó con la finalidad de evaluar el efecto de la Nisina a diferentes concentraciones y el Saniper 20 al 1% como control de la micro flora patógena en quesos madurados de oveja tipo torta de Guanajuato, obteniendo resultado favorables en la utilización de la solución de Nisina a una concentración de 4.5mg/L en el control de microorganismos coliformes y salmonella y un resultado favorable del uso de Saniper 20 al 1% como control de mesófilos aerobios y salmonella, debido a que Saniper 20 es un agente



oxidante habría que considerar su uso debido a que también podría llegar a dañar los microorganismos involucrados en la fermentación del queso que son los responsables del flavor; utilizando esta concentración de nisina se respeta el límite máximo de 12.5mg/kg permitido por la NOM-243-SSA1-2010.

Al obtener resultados tan elevados de las cuentas de microorganismos, puede suponerse que hay una re-contaminación, siendo este un producto procedente de leche pasteurizada, a la leche después de pasteurizar se le realizó la prueba fosfatasa ya que la enzima fosfatasa tiene una resistencia al calor ligeramente superior a la de las bacterias patógenas que pueden existir en la leche, este hecho permite que esta prueba sea utilizada como control de la pasteurización, por lo cual al revisar el proceso de producción, se encuentra que la salmuera es una fuente de contaminación debido a la baja concentración salina(13%), y las malas prácticas de manufactura; el manual de industrias lácteas (Tetra Pak Processing System AB) señala que en salmueras con concentraciones <16% los quesos se hinchan debido a la presencia de microorganismos del tipo de *Aerobacter aerogenes* o *Escherichia coli*, que transforman la lactosa en ácido láctico con producción de gas y la superficie se vuelve pegajosa, viscosa, como consecuencia de la redisolución de la caseína y el riesgo de contaminación por microorganismos es mayor, cabe mencionar que la salmuera utilizada para el lote del cual se tomaron las muestras ya había sido utilizada una vez y además se encontraba almacenada a temperatura ambiente fuera de la cámara de refrigeración.

También se puede considerar como fuentes de contaminación el agua utilizada para realizar el lavado a los 20 días de maduración ya que esta se toma directamente del grifo, lo cual no garantiza su inocuidad y al ser el queso un producto poroso puede este permitir la penetración del agua hacia el interior de este favoreciendo así la proliferación de microorganismos.

### ***Recomendaciones***

- ❖ Utilización de la solución de Nisina con una concentración de 4.5 mg/L, posterior del lavado con agua potable a los 20 días de maduración.
- ❖ Mejorar la calidad de la salmuera aumentando la concentración salina a 16% y estandarizarla después de cada uso, limitando su uso a 5 días posteriores de su preparación.
- ❖ Mantener la salmuera en refrigeración para evitar la proliferación de microorganismos y retirar los restos de queso después de cada uso o evitar en lo posible la reutilización de esta.

## REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- ✓ Aguirre, E. 2011. Introducción a los productos lácteos. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- ✓ Baldry, M. G. and French, M. S. 1989. "Disinfection of sewage effluent with peracetic acid". *Water Sci. Technol.* 21(3), 203-206
- ✓ Boziaris, I.; Adams, M. 1999. Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of Gram-negatives. *Int. J. Food Microbiol.* 53: 105-113.
- ✓ Boziaris, I.S.; Adams, M.R. 2001. Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in Gram negatives. *J. Appl. Microbiol.* 91: 715-724.
- ✓ Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., Vignolo, G. 2008. A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina, *Meat Science*, 79, 483- 499.
- ✓ Cintas, L. M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I. F. & Hernández, P. E. 2001. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, *F. Scn, Tech. Inter.*, 74, 281- 305.
- ✓ Cintas, L. M., Casaus, P. y Hernández, P. E. 2000. Bacterias lácticas de origen alimentario: consideraciones taxonómicas y filogenéticas, *Alimentaria*, 38, 61-70.
- ✓ Code Federal Regulations (CRF). 2007. Chemicals used in washing or assist in the peeling of fruit and vegetables. Code of Federal Regulations 21 CFR 173.315. Office of the Federal Register, US Government Printing Office, Washington, DC.
- ✓ Cotter, P. D., Hill, C. & Ross, R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food, *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 777-788.
- ✓ COVENIN 1813-2000. Norma general de quesos. Comisión Venezolana de Normas Industriales. Fondonorma. Caracas, Venezuela.
- ✓ Cutter, C.N. y Siragusa, G.P. 1995. Population reductions of Gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. *J. Food Protect.* 58: 977-983.
- ✓ Devlieghere, f.; Vermeiren, l.; Vebevere, J. 2004. New preservation technologies: Possibilities and limitations. *Int. Dairy J.* 14: 273-285.
- ✓ Dell'Erbaa, a., Falsanisia, D., Libertia, L., Notarnicolaa, M., Santosoa, D., 2007. Desinfection by-products formation during waste desinfection with peracetic acid. *Desalination.* 215: 177-186.
- ✓ Delves- Broughton, j. 1990. Nisin and Application it's as a Food Preservative. *J. Soc. Dairy Technology* 43 (3): 73.76
- ✓ Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y. 2006. McMullen, L. M., Prevost, H., The continuing story of class IIa bacteriocins, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 70, 564-582.

- ✓ Dunkley KD, Callaway TR, Chalova Z, McReynolds JL, Hume ME, et al. 2009; Foodborne Salmonella ecology in the avian gastrointestinal tract. *Anaerobe*. 15(1-2):26–35.
- ✓ Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto K. and Ishizaki, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity, *FEMS Microbiol., Rev.* 24:85-106.
- ✓ Eijsink, V. G. H., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M. B. and Ness, I. F. 1998. Comparative Studies of Class IIa Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3275-328.
- ✓ Garriques, D. Arevalo, G. 1995. An evaluation of the production and use of a live bacterial isolate to manipulate the microbial flora in the commercial production of *Pennaeus vannamei* postlarvae in Ecuador. In: Browdy, C. y Hopkins, J. (Eds.), *Swimming Through Troubled Water, Proceedings of the Special Session on Prawn Farming, Aquaculture'95*, World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 53-59.
- ✓ Garmendia, G. y Vero, S. 2008. Métodos para la desinfección de frutas y hortalizas. Cátedra de microbiología, Universidad de la Republica del Uruguay
- ✓ Gil A. 2010. Tratado de nutrición, tomo II, composición y calidad nutritiva de los alimentos. Madrid, Editorial médica panamericana, pp. 21-22.
- ✓ González, L.; Sandoval, H.; Sacristán, N.; Castro, J.; Fresno, J.; Torbadijo, M. 2007. Identification of acid bacteria isolate from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Contr.* 18: 716-722.
- ✓ Gordon, M. D. and O'Brien, L. C. 2006. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*, *Microbiology*, 152, 3239-3244.
- ✓ Gordon MA. 2008. Salmonella infections in immune compromised adults. *J Infect.* 56(6):413-22.
- ✓ Hei, R.D. 1998. Peracetic acid applications to vegetable and fruit flume transport waters improved storage stability, and yielded superior reduction of microbial contaminants during processing. Abstrac 65-3, Annual Meeting of the Institute of Food Technologist, Atlanta.
- ✓ Joerger, R. D. 2003. Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages, *Poult. Sci.*, 82, 640-647.
- ✓ Katikou P., Ambrosiadis, I., Georgantelis, D., Koidis, P., Georgakis, S. A. 2005. Effect of *Lactobacillus* protective cultures with bacteriocinlike inhibitory substances producing ability on microbiological, chemical and sensory changes during storage of refrigerated vacuum-packaged sliced beef, *J. Appl Microbiol*, 99, 1303-1313.

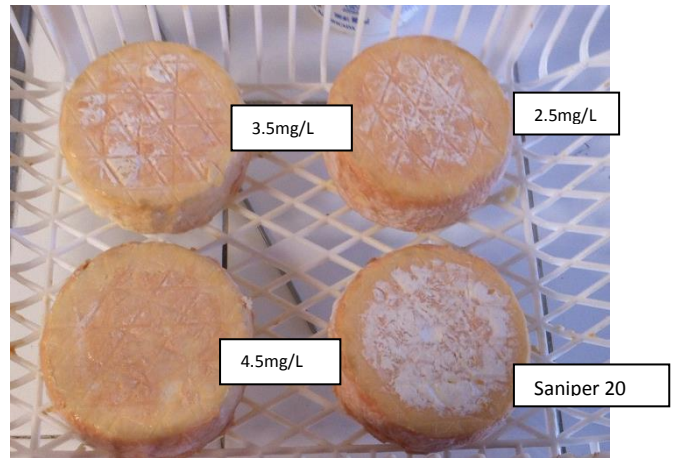
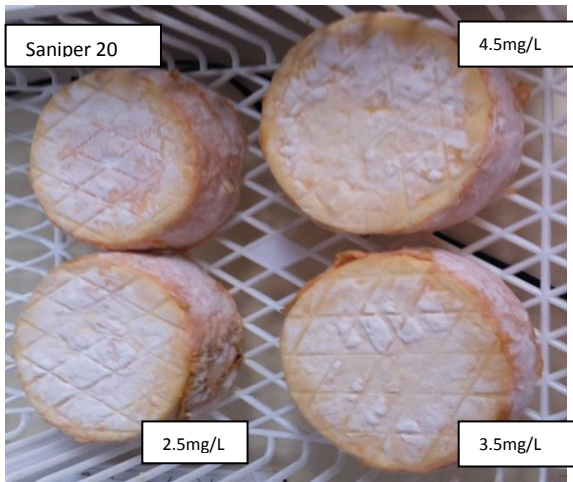
- ✓ Kemperman, R., Kuipers, A., Karsens, H., Nauta, A., Kuipers, O. & Kok, J. 2003. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574, *Appl Environ Microbiol*, 69, 1589-1597.
- ✓ Kykkidou, S.; Pournis, N.; Kostoula, O.; Savvaidis, I. 2007. Effects of treatment with nisin on the microbial flora and sensory properties of a Greek soft acid-curd cheese stored aerobically at 4°C. *Int. Dairy J.* 17(10): 1254-1258.
- ✓ Lindgren, S. E. & Dobrogosz, W. J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations, *FEMS Microbiol. Rev*, 87,149-164.
- ✓ Maldonado, R. y Llanas, L. 2007. Efecto de la incorporación de nisina sobre la supervivencia del *Staphylococcus aureus* en queso de mano, *Rev. Fac. Agron.*, 33,147- 163.
- ✓ Martínez, M. K. 2011. Manual de prácticas de laboratorio. Universidad de Santander, Colombia.
- ✓ Millette, C., Dupont, F., Shareck, M. T., Ruiz, D., Archambault. And Lacroix. M. 2008. Purification and identification of the pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* MM33, a new human intestinal strain, *J. of Appl. Microbiol.*, 104, 269-275.
- ✓ Motta, S. A., & Brandelli, Adriano. 2008. Evaluation of environmental conditions for production of bacteriocinlike substance by *Bacillus* sp. strain P34, *World J. Microbiol Biotechnol.* 24,641-646.
- ✓ Nissui Pharmaceutical granted PTM status for Compact Dry TC, *Inside Laboratory Management*; AOAC, July 2004: 19 – 22
- ✓ Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994, Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico
- ✓ Norma oficial mexicana nom-110-ssa1-1994, bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- ✓ 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.
- ✓ Ogunbanwo, S., Sanni, A. & Onilude, A., 2003. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocina by *Lactobacillus brevis* OG1. *African J. of Biotech.*, 2 (7), 179-184.
- ✓ O'Sullivan, L., Ross, R. P. & Hill, C., 2002. Potential of bacteriocin producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality, *Biochimie* 84, 593-604.

- ✓ Parra M, Durango J, Mattar S. 2002. Microbiología, 1. patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella. MVZ-Córdoba. 7(2):187-200.
- ✓ Papagianni, M. 2003. Ribosomally synthesized peptides and antimicrobial properties: Biosynthesis, structure, function, and applications. Biotechnol. Adv., 21, 465-499,
- ✓ Pigott D. 2008. Foodborne Illness. Emerg Med Clin N Am. 26(2):475–97.
- ✓ Real decreto del Código Alimentario Español 1113/2006
- ✓ Rojas, C. y Vargas, P. 2008. Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria, Tecnología en Marcha, 21(2) 9-16,
- ✓ Rodríguez, J. 1996. Review: Antimicrobial spectrum, structure, properties and mode of action of nisin, a bacteriocin produced by Lactococcus lactis. Food Science and Technology International 2 (2): 61-68.
- ✓ Rodríguez, E.; Calzada, J.; Arqés, J., Rodríguez, J.; Núñez, 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.
- ✓ 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.
- ✓ Sangronis, E., García, J. 2007. Efecto de la adición de nisina en los parámetros físicos, químicos y sensoriales del queso “telita”. An. Venez. de Nutrición., 20 (1),12-16,
- ✓ Silla, M. 1985. Utilización de microorganismos fermentadores en la conservación de alimentos. Rev. Agro. Tecnol. 25(2): 170-182.
- ✓ Simova, E, Beshkova, D, Najdenski, H, Frengova, G, Simov Z, Tsvetkova, I. 2006. Antimicrobial producing lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian milk products: Inhibitory properties and in situ bacteriocinogenic activity, 685. In: Proceedings of the IUFOST, 13th World Congress Food Sci Technol “Food is life”, 17-21 September, Nantes, France, 907-908.
- ✓ Spelhaug, S.R.; Harlander, S.K. 1989. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from Lactococcus lactis y Pedococcus pentosaceus. J. Food Prot. 52(12): 856-862.
- ✓ Stevens K. A., Sheldon B. W., Klapes N. A. y Klaenhammer T. R; 1991. Nisin treatment for inactivation of salmonella species and other gram-negative bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 57 (12): 3613.

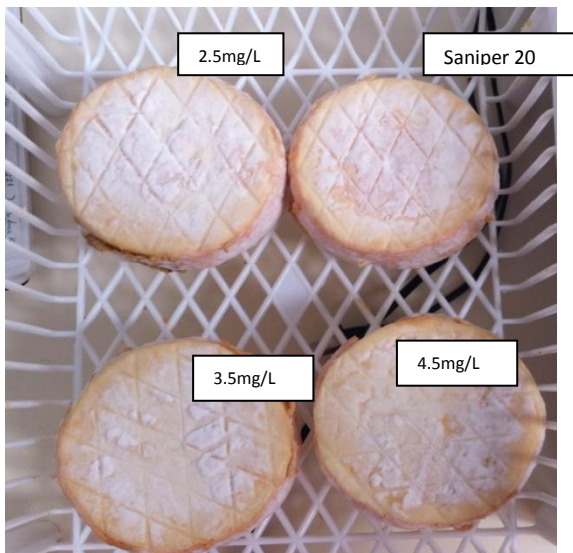
- ✓ Stiles, M. E., 1996. Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocina produced by *Lactobacillus plantarum* ST31. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35: 157-160.
- ✓ Svetoch, E. A., Eruslanov, B., Perelygin, V. V.V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, P. I., Borzenkov, V., Levchuk, N. V., P.Svetoch, O. E., Kovalev, Y. N., Stepanshin, Y. G., Siragusa, N. G., Bruce, R. S., Norman, J. S. 2008. Diverse Antimicrobial Killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 Bacteriocin., *J. Agric. Food Chem.* 56, 1942-1948.
- ✓ Tetra Pak Processing Systems AB, 1996. Manual de industrias lácteas, Madrid, España.
- ✓ Thomas, I.; Clarkson, M.; Delves-Broughton, J. 2000. Nisin. In: Naidu, A. (Ed) *Natural Food Antimicrobial System*. USA: CRC Press. 463-524 pp.
- ✓ Uribe C, Suárez M. 2006. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. *Colomb Med.* 37(2):151-8.
- ✓ Valbuena, E.; Barreiro, J.; Sánchez, E.; Castro, G.; Briñez, W.; Tovar, A. 2005. Modelos Cinéticos Aplicados al Crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en Leche. *Rev. Científ. FCV-LUZ*. XV(5): 464-475.

## Anexos

Apariencia de los quesos durante su evaluación



Vista de los quesos el primer día



A los 16 días después del lavado  
(10/04/14)



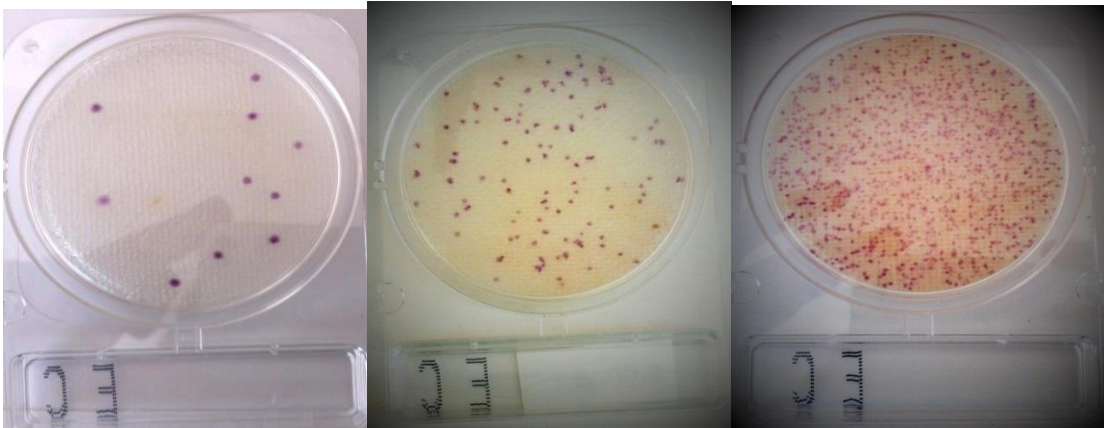
A los 8 días posteriores al lavado  
(03/04/14)

A los 24 días después del lavado  
(17/04/14)

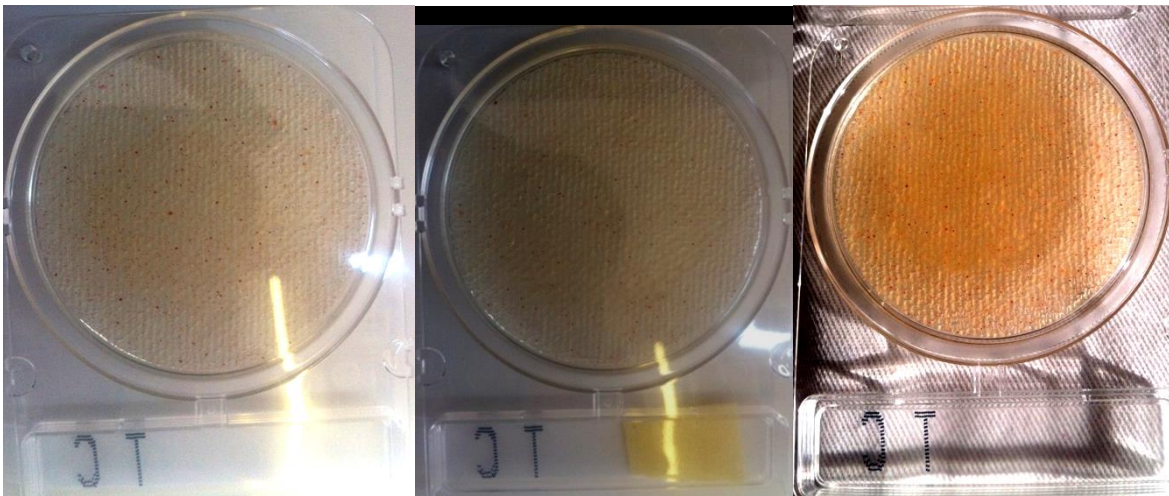
Quesos con presencia de coliformes.



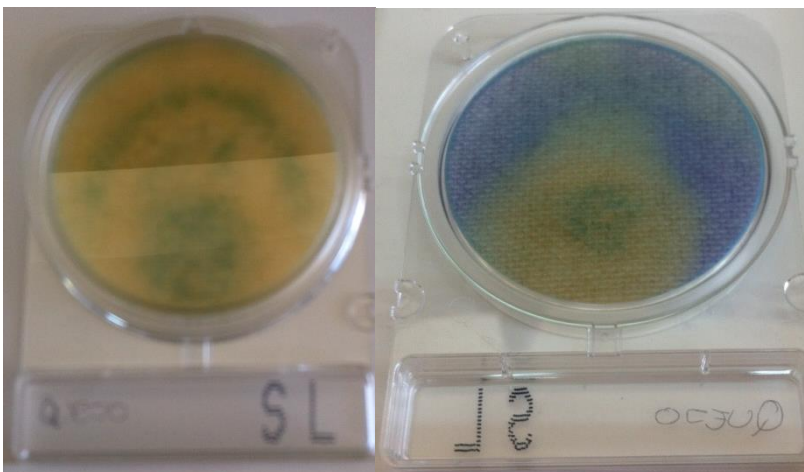
Apariencia del crecimiento de bacterias coliformes en placas Compact Dry™ EC



Apariencia del crecimiento de mesófilos aerobios en placas Compact Dry™ TC



Apariencia del crecimiento de salmonella en placas Compact Dry™ SL





NOM-243-SSA1-vigente leche, formula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos, disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

Límites máximos de contenido microbiano para leche, producto lácteo, producto lácteo combinado.

Microorganismo	Límite máximo	Productos
<b>Organismos Coliformes Totales</b>	< 100 UFC/g o MI	Helados y sorbetes. Quesos de suero.
	< 20 UFC/g o MI	En punto de venta: Leche, producto lácteo, producto lácteo combinado y mezcla de leche con grasa vegetal; pasteurizada.
	< 10 UFC/g o MI	En planta: Leche, producto lácteo, producto lácteo combinado y mezcla de leche con grasa vegetal; pasteurizados o deshidratados. Mantequilla, cremas, leche condensada azucarada, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche.
<i>Staphylococcus Aureus</i>	< 10 UFC/ ml Por siembra Directa	Leche, producto lácteo, producto lácteo combinado y mezcla de leche con grasa vegetal; pasteurizada.
	<100 UFC/g o MI	Mantequilla, cremas, leche condensada azucarada, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche. Quesos madurados y quesos procesados.
	1000 UFC/g	Quesos frescos y quesos de suero.
<i>Salmonella spp</i>	Ausente en 25g o ml	Leche, producto lácteo, producto lácteo combinado y mezcla de leche con grasa vegetal; pasteurizados y deshidratados.

		Quesos frescos, madurados y procesados. Quesos de suero. Cremas, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche*, helados, sorbetes y bases para helados.
<i>Escherichia coli</i>	< 10 NMP/g	Quesos madurados y procesados.
	100 UFC/g o MI	Quesos frescos.
	< 3 NMP/g o MI	Leche utilizada como materia prima para la elaboración de quesos. Leche, producto lácteo, producto lácteo combinado y mezcla de leche con grasa vegetal; deshidratada.
<i>Listeria Monocytogenes</i>	Ausente en 25g o ml	Leche, producto lácteo, producto lácteo combinado y mezcla de leche con grasas vegetales; pasteurizadas. Quesos. Quesos de suero. Helados, bases para helados y sorbetes**
<i>Enterotoxina Estafilocócica</i>	Negativa	Leche, producto lácteo, producto lácteo combinado y mezcla de leche con grasa vegetal; deshidratados y la que se emplee como materia prima para elaboración de quesos. Quesos frescos, madurados y procesados.
<i>Toxina Botulínica**</i>	Negativa	Quesos frescos, madurados y procesados, envasados al alto vacío.
<i>Mohos y Levaduras</i>	500 UFC/g o MI	Quesos frescos, madurados*** y quesos de suero.
	100 UFC/g o MI	Quesos procesados.

Cepas gram-negativas y gram-positivas probadas para el crecimiento y formación de colonias de color usando Compact Dry™ TC y Compact Dry™ EC

	Compact Dry TC		Compact Dry EC	
	growth	color	growth	color
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 19637	+	red	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	red	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	+	red	-	-
<i>Corynebacterium renale</i> ATCC 19412	+	red	-	-
<i>Corynebacterium minutissimum</i> ATCC 23348	+	red	-	-
<i>Corynebacterium xerosis</i> ATCC 373	+	red	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	+	red	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 19434	+	red	-	-
<i>Enterococcus avium</i> ATCC 14025	+	red	-	-
<i>Enterococcus durans</i> ATCC 19432	+	red	-	-
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i> ATCC 12315	+	red	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 29070	+	red	-	-
<i>Staphylococcus auricularis</i> ATCC 33753	+	red	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12600	+	red	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	red	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 229213	+	red	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	+	red	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	+	red	-	-
<i>Staphylococcus capitis</i> ATCC 27840	+	red	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	+	red	-	-
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC 29970	+	red	-	-
<i>Staphylococcus hominis</i> ATCC 27844	+	red	-	-
<i>Staphylococcus lentus</i> ATCC 29070	+	red	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305	+	red	-	-
<i>Staphylococcus sciuri</i> ATCC 29062	+	red	-	-
<i>Staphylococcus simulans</i> ATCC 27848	+	red	-	-
<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836	+	red	-	-
<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC 29971	+	red	-	-
<i>Streptococcus thermophilus</i> ATCC 14485	+	red	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	+	red	-	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	+	red	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NHL 10010	+	red	-	-

Cepas gram-negativas y gram-positivas probadas para el crecimiento y formación de colonias de color usando Compact™ Dry TC y Compact Dry™ EC

	Compact Dry TC		Compact Dry EC	
	growth	color	growth	color
<i>Aeromonas hydrophila</i> JCM 3976	+	red	+	magenta
<i>Citrobacter amalonaticus</i> ATCC 25405	+	red	+	magenta
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	+	red	+	magenta
<i>Citrobacter koseri</i> ATCC 25408	+	red	+	magenta
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	+	red	+	magenta
<i>Enterobacter amnigenus</i> ATCC 33072	+	red	+	magenta
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	+	red	+	magenta
<i>Enterobacter intermedium</i> ATCC 33110	+	red	+	magenta
<i>Enterobacter salazakii</i> ATCC 29544	+	red	+	magenta
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	+	red	+	blue
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	+	red	+	blue
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	+	red	+	blue
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	red	+	blue
<i>Escherichia coli</i> serotype 0157 ATCC 35150	+	red	+	magenta
<i>Escherichia coli</i> serotype 0157 ATCC 43888	+	red	+	magenta
<i>Escherichia hermanii</i> JCM 1473	+	red	+	magenta
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 13182	+	red	+	magenta
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae</i> ATCC 11296	+	red	+	magenta
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i> ATCC 13883	+	red	+	magenta
<i>Kluyvera ascorbata</i> ATCC 33433	+	red	+	magenta
<i>Kluyvera cryocrescens</i> ATCC 33435	+	red	+	magenta
<i>Morganella morganii</i> ATCC 25830	+	red	+	cream
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 29906	+	red	+	cream
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	+	red	+	white
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	+	red	+	white
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	+	red	+	white
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+	red	+	white
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 12633	+	red	+	white
<i>Rahnella aquatilis</i> ATCC 33071	+	red	+	magenta
<i>Rahnella aquatilis</i> JCM 1683	+	red	+	magenta
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	+	red	+	white
<i>Serratia fonticola</i> ATCC 29844	+	red	+	magenta
<i>Serratia liquefaciens</i> ATCC 27592	+	red	+	light magenta
<i>Serratia liquefaciens</i> ATCC 81002	+	red	+	magenta
<i>Serratia liquefaciens</i> ATCC 13880	+	red	+	magenta



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ**  
**SUBDIRECCIÓN ACADÉMICA**  
**DEPARTAMENTO DE**  
**SEGUIMIENTO DE PROYECTO DE RESIDENCIAS PROFESIONALES**

ALUMNO: Aleida Fuentes Beltrán

No. DE CONTROL: 09270372

NOMBRE DEL PROYECTO: Efecto de la niñina como control de la micro flora patógena en quesos madurados de oveja

EMPRESA: Tequilera Corralejo S.A. de C.V

ASESOR EXTERNO: Ing. Humberto Sepúlveda Quezada

ASESOR INTERNO: Dr. Patricia Guadalupe Sánchez Ilturbe

PERIODO DE REALIZACIÓN: Enero-Junio 2014

ACTIVIDAD	SEMANAS															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Revisión de la NOM-251-SSA1-2009	P	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
	R	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
Revisión de la NOM-243-SSA1-2012	P	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
	R	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
Establecimiento del proyecto	P		X			X										
	R															
Evaluación de los resultados	P			X	X	X	X	X	X	X						
	R															
Análisis de resultado	P			X	X	X	X	X	X	X						
	R															
Discusión y conclusión de los resultados	P					X	X	X	X	X						
	R															
Presentación del proyecto	P										X	X	X	X	X	
	R															
OBSERVACIONES		<p>La producción de leche empezó en el mes de febrero.  El material para hacer los análisis llegó en el mes de Marzo.</p>														
ENTREGA DE REPORTES	Docente	Marzo 9-10					Mayo 18-19					Junio 21				
	Alumno	Dr. Patricia Guadalupe Sánchez Ilturbe Aleida Fuentes Beltrán					Dr. Patricia Guadalupe Sánchez Ilturbe Aleida Fuentes Beltrán					Dr. Patricia Guadalupe Sánchez Ilturbe Aleida Fuentes Beltrán				
Jefe Depto.		Ing. Javier Ramírez Díaz					Ing. Javier Ramírez Díaz					Ing. Javier Ramírez Díaz				

ITTG-AC-PO-007-05

Rev:1



**“SOY DE PENJAMO, ORGULLO DE GUANAJUATO”**

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 06 de enero del 2014

Asunto: Carta de aceptación

Lic. José Erasmo Cameras Mota  
Jefe del departamento de Gestión  
Tecnológica y Vinculación  
Instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez  
**P R E S E N T E**

Por medio del presente se hace constar que la C. Fuentes Beltrán Aleida con numero de control 09270372 de decimo semestre de la carrera de ingeniería bioquímica, ha sido acepta para realizar su residencia profesional en las instalaciones TEQUILERA CORRALEJO, S.A. DE C.V. en el área de quesos el trashumante, desarrollando el proyecto efecto de la nisina como control de la microflora patógena en quesos madurados de oveja en un periodo de 4 meses, comprendido del 06 de enero al 06 de mayo del 2014, cubriendo un total de 640 horas.

Sin más por el momento, me es grato enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**

Q.F.B. Miguel Roa Castañeda  
Gerente de planta





**“SOY DE PENJAMO, ORGULLO DE GUANAJUATO”**

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 06 de mayo del 2014

Asunto: Oficio de terminación

Lic. José Erasmo Camaras Mota  
Jefe del Departamento de Gestión  
Tecnológica y Vinculación  
Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

P R E S E N T E

Por medio del presente se hace constar que la C. Fuentes Beltrán Aleida con numero de control 09270372 de decimo semestre de la carrera de ingeniería bioquímica, realizo satisfactoriamente su residencia profesional en las instalaciones Tequilera Corralejo, S.A. de C.V. en el área de quesos el trashumante desarrollando el proyecto efecto de la nisina como control de la microflora patógena en quesos madurados de oveja durante el periodo comprendido del 06 de enero al 06 de mayo del 2014, cubriendo un total de 640 horas.

Sin más por el momento, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Ing. Humberto Sepúlveda Quezada  
Supervisor de Seguridad e Higiene



**“SOY DE PENJAMO, ORGULLO DE GUANAJUATO”**

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas a 06 de mayo del 2014

Asunto: Oficio de terminación


Lic. José Erasmo Camero Mota  
Jefe del Departamento de Gestión  
Tecnológica y Vinculación  
Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

P R E S E N T E

Por medio del presente se hace constar que la C. Fuentes Beltrán Aleida con número de control 09270372 de décimo semestre de la carrera de ingeniería bioquímica, realizó satisfactoriamente su residencia profesional en las instalaciones Tequilería Corralejo, S.A. de C.V. en el área de quesos el trashumante en el periodo comprendido del 06 de enero al 06 de mayo del 2014, cubriendo un total de 640 horas.

Sin más por el momento, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

  
Q.F.B. Miguel Roa Castañeda  
Gerente de planta



Ejército Nacional No. 373 Desp. 202-A Col. Granada Del. Miguel Hidalgo México D.F. C.P. 11520 R.F.C. TCO 950909 8G6  
Tels. para ventas \*58-77-02-03 \*58-77-02-04 \*Fax. 58-77-03-34



"2014. Año de Octavio Paz"

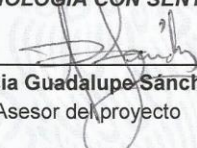
**CONSTANCIA DE LIBERACIÓN Y EVALUACIÓN DE  
PROYECTO DE RESIDENCIA PROFESIONAL**

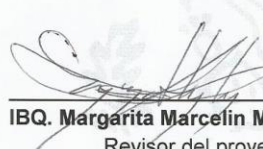
**A QUIEN CORRESPONDA:**

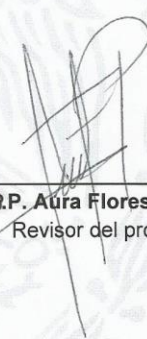
Por medio de la presente me permito informarle que ha concluido la asesoría y revisión del proyecto de Residencia profesional cuyo título es: **"Efecto de la nisina como control de la micro flora patógena en quesos madurados de oveja"**. Desarrollado por el **C. Aleida Fuentes Beltrán**, estudiante de la carrera de **INGENIERÍA BIOQUÍMICA**, con número de control 09270372, desarrollado en el presente periodo "Enero-Junio 2014".

Por lo que, se emite la presente **Constancia de Liberación y Evaluación del Proyecto** a los **30 días** del mes de **junio** de **2014**.

**ATENTAMENTE**  
**"CIENCIA Y TECNOLOGÍA CON SENTIDO HUMANO"**

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. Patricia Guadalupe Sánchez Iturbe**  
Asesor del proyecto

  
\_\_\_\_\_  
**IBQ. Margarita Marcelín Madrigal**  
Revisor del proyecto

  
\_\_\_\_\_  
**Q.B.P. Aura Flores Pérez**  
Revisor del proyecto