

Evaluación del extracto etanólico de propóleo como conservante en queso cabaña

Henry Robinson Carrera Quispe

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Diciembre, 2016

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Evaluación del extracto etanólico de propóleo como conservante en queso cabaña

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Henry Robinson Carrera Quispe

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2016

Evaluación del extracto etanólico de propóleo como conservante en queso cabaña

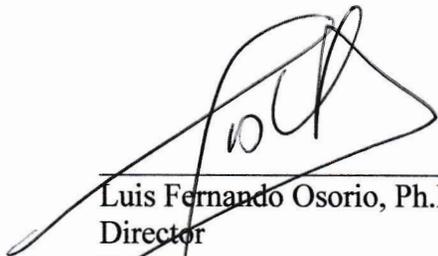
Presentado por:

Henry Robinson Carrera Quispe

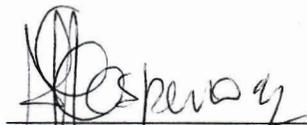
Aprobado:



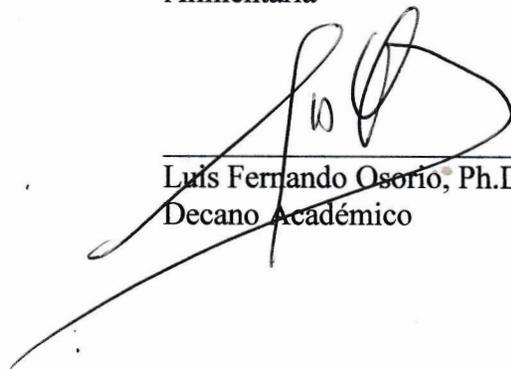
Mayra Márquez González, Ph.D.
Asesora Principal



Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria
Alimentaria



Sandra Espinoza, M.Sc.
Asesora



Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Decano Académico

Evaluación del extracto etanólico de propóleo como conservante en queso cabaña.

Henry Robinson Carrera Quispe

Resumen: El de propóleo tiene propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antivirales por lo que constituye una alternativa para la conservación en la industria alimentaria. El estudio evaluó el efecto conservante del extracto etanólico de propóleo (EEP) Zamorano, aplicado en queso cabaña. Para ello se usó una extracción etanólica en Soxhlet. Se evaluó la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto, usando el método de macrodilución en caldo. Se elaboraron tres tratamientos en queso: 1) sin conservante, 2) EEP 0.23mg/g, 3) Sorbato de potasio 1mg/g. Se evaluó el crecimiento de microorganismos (enterobacterias, coliformes y psicrótrofos) en el día 0, 8 y 16, y finalmente la aceptabilidad del propóleo en el queso. Se determinó que el extracto etanólico no tiene efecto bactericida sobre microorganismos como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. Sin embargo, sí presentó efecto en *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*, siendo las CMB 3.75 mg/ml, 1.95 mg/ml y 0.23 mg/ml respectivamente. Para evaluar el efecto conservante en el queso se usó la CMB de 0.23 mg/mL. El EEP tuvo actividad bactericida en el día 16 únicamente para coliformes totales. En la evaluación sensorial se encontraron diferencias significativas en olor, sabor y textura. Se concluye que el propóleo Zamorano tiene efecto bactericida en algunos microorganismos, puede ser percibido por los consumidores y tiene potencial uso como conservante. Se recomienda evaluarse en otras matrices alimentarias.

Palabras clave: Bactericida, CMB, microorganismos indicadores, sensorial.

Abstract: Propolis has antioxidant, antimicrobial and antiviral properties that make it an alternative as an additive for preservation in food industry. The study measured the preservative effect of propolis ethanolic extract (PEE) of Zamorano, applied in cabaña cheese. In order to conduct the study, an ethanolic extraction from Soxhlet was used. The minimum bactericidal concentration (BMC) of the extract was measured using the broth macrodilution method. Three treatments were evaluated in cheese: 1) No preservative, 2) EEP 0.23 mg/g and 3) Potassium sorbate 1 mg/g. The growth of microorganisms (enterobacter, coliforms and psychrotrophs) was evaluated at day 0, 8 and 16, and finally the acceptability of propolis in the cheese. It was determined that the ethanolic extract has no bactericidal effect on microorganisms such as *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. However, it had an effect on *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*, with CMB at 3.75 mg / ml, 1.95 mg / ml and 0.23 mg / ml, respectively. To measure the preservative effect on cheese, the CMB of 0.23 mg / mL was used. The EEP had bactericidal activity at day 16 only for total coliforms. Sensory evaluation showed significant differences in smell, taste and texture. It was concluded that Zamorano propolis has bactericidal effect on some microorganisms, can be perceived by consumers, and has potential use as a preservative. It was recommended to be evaluated in other food matrices.

Key words: Bactericide, CMB, microorganisms indicators, sensory.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figura y Anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4. CONCLUSIONES.....	19
5. RECOMENDACIONES.....	20
6. LITERATURA CITADA	21
7. ANEXOS	26

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Descripción de concentraciones de propóleo en caldo nutritivo.	4
2. Descripción de tratamientos evaluados.	6
3. Concentración mínima bactericida (CMB) del Extracto etanólico de propóleo.	7
4. Media (Log ₁₀ UFC/g) y desviación estándar (D.E) del recuento de enterobacterias en queso cabaña.	9
5. Media (Log ₁₀ NMP/g) y desviación estándar (D.E) del recuento de coliformes totales en queso cabaña.	10
6. Media (Log ₁₀ UFC/g) y desviación estándar (D.E) del recuento de psicrótrofos en queso cabaña.	11
7. Media (pH) y desviación estándar de pH en queso cabaña.	12
8. Media y desviación estándar del atributo apariencia evaluada sensorialmente del queso cabaña.	13
9. Media y desviación estándar del atributo color evaluado en queso cabaña.	14
10. Media y desviación estándar del atributo olor evaluado en queso cabaña.	14
11. Media y desviación estándar del atributo sabor evaluado en queso cabaña.	15
12. Media y desviación estándar del atributo textura evaluado en queso cabaña.	16
13. Media y desviación estándar de la aceptación general evaluado en queso cabaña. ..	17
Figura	Página
1. Preferencia de los consumidores medidos a través del tiempo por prueba de chi-cuadrado (P<0.05)	18
Anexos	Página
1. Flujo de proceso para elaboración de queso cabaña.	26
2. Boleta de análisis sensorial.	27
3. Sintaxis de las variables evaluadas.	29
4. Mínimos cuadrados para enterobacterias	29
5. Mínimos cuadrados para coliformes totales	29
6. Mínimos cuadrados para psicrótrofos	30
7. Sintaxis del variable de pH.	30
8. Sintaxis de las variables de la evaluación sensorial.	30

1. INTRODUCCIÓN

Para conservar un alimento es necesario aplicar un conjunto de técnicas que tendrán como objetivo prolongar la vida y disponibilidad de los alimentos para su consumo. La pérdida de calidad en el alimento puede ser causada por microorganismos y/o por una variedad de reacciones físicoquímicas, que suceden después de los procesos de acondicionamiento. Para evitarlo se pueden aplicar métodos de conservación físicos, químicos o la combinación de ambos. Las características físicoquímicas del alimento son un factor determinante para las diferentes actividades biológicas que causan su deterioro, siendo la principal causa los microorganismos (Clayton 2016). Solo aplicar métodos físicos no garantiza la conservación, por ello se añaden conservantes químicos que tienen la función de minimizar el crecimiento de microorganismos deterioradores o patogénicos exponiéndolos a un medio hostil que estrese su ciclo celular para causar su muerte o inhibición (Alzamora *et al.* 2004).

En la actualidad existe una alta demanda de alimentos con etiquetas limpias, es decir, con cantidades mínimas de conservantes artificiales, debido a que se les asocia con enfermedades e intoxicaciones. Lo anterior, ha llevado a la industria a buscar nuevas alternativas de preservación de alimentos que cumplan las mismas funciones que los preservantes artificiales y tengan buena compatibilidad, siendo una de estas alternativas los bioconservantes (Rodríguez 2011).

Uno de los bioconservantes en investigación es el propóleo, ampliamente reconocido por sus propiedades antimicrobianas (Gutiérrez 2012), es un producto compuesto principalmente por resinas y exudados recolectados por las abejas, también contienen cera, polen y algunas secreciones (Vargas *et al.* 2013). En la colmena es usado para sellar las entradas y cumple funciones de antioxidante, antimicrobiano, y anti fúngicas. Varios estudios destacan los beneficios que puede brindar en la salud del hombre como: efecto antioxidante, antitumoral, antiinflamatorio. No obstante, la actividad antimicrobial constituye la propiedad biológica más estudiada y lo convierte en un potencial bioconservante. Esto se confirma por numerosos estudios que señalan el efecto del propóleo contra bacterias, parásitos y virus (Bogdanov 2016).

Los compuestos activos que desempeñan las diferentes funciones biológicas en el propóleo son los flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres. Los flavonoides están más correlacionados con la actividad biológica, sin embargo, no es exclusivo de estas moléculas. La sinergia entre las moléculas que componen el propóleo tiene efecto sobre las bacterias.

El mecanismo de acción del propóleo no tiene una explicación específica. Sin embargo, se demostró en estudios *in vitro* que la quercetina y naringenina, dos compuestos flavonoides, aumentan la permeabilidad de la membrana celular (Mirzoeva *et al.* 1997) haciendo fácil el ingreso de otras moléculas que inhiben las enzimas que participan en la replicación celular (Mori *et al.* 1987). Diferentes estudios corroboran esta afirmación, aunque la principal causa de su efectividad antimicrobial dependerá del origen botánico, composición química y estación del año en que se recolecta (Vargas *et al.* 2013).

En Zamorano se han realizado investigaciones como: “evaluación del efecto antimicrobiano en mermelada de mango”. El estudio no demostró efecto antimicrobiano del extracto etanólico aplicado en mermelada en comparación con Benzoato de sodio (Gerónimo 2009). En otro estudio, el extracto etanólico de propóleo, demostró actividad bactericida contra *Listeria monocytogenes* en estudios *in vitro*, sin embargo, no resultó efectivo al tratar melones inoculados con *L. monocytogenes* (Vicente y escobar 2012). El interés de la investigación es demostrar el uso potencial del propóleo de Zamorano como bioconservante, usando como matriz alimentaria queso cabaña y comparándose el efecto con el blanco (sin conservante) y otro con Sorbato de potasio. Se pretende buscar una alternativa comercial al propóleo, dando la posibilidad de producir alimentos con aditivos alternativos para estar a la vanguardia de las tendencias del mercado.

El estudio incluyó los siguientes objetivos:

- Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) de propóleo Zamorano contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Evaluar el efecto preservante del extracto etanólico de propóleo en queso cabaña.
- Evaluar la aceptabilidad del extracto etanólico de propóleo en queso cabaña.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio. El estudio se realizó en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, departamento de Francisco Morazán Honduras. La primera fase de extracción, se ejecutó en el laboratorio de análisis de alimentos (LAAZ). La segunda y tercera fase, que consiste en buscar la concentración mínima bactericida (CMB) y evaluar el efecto conservante en queso cabaña respectivamente, se realizó en el laboratorio de microbiología Zamorano (LMAZ). La elaboración del queso cabaña se realizó en la planta de lácteos.

Fase 1. Obtención del extracto de propóleo.

Extracto blando de propóleo. La muestra de propóleo bruto fue recolectada durante la época seca del 2015 con mallas sarán, que se colocaron en el interior de la colmena. El propóleo se mantuvo almacenado a una temperatura de 0 °C.

Para la extracción se siguió el procedimiento descrito por Carrillo (2011) adaptada por el autor. Inicialmente el propóleo en bruto se congeló a -20 °C durante 24 horas, con el fin de obtener una textura firme, después se trituró en un mortero hasta conseguir partículas finas. Se pesaron 19 ± 1 gramos en cada dedal, se colocó en el equipo Soxhlet. Seguidamente se agregaron 80 mL de etanol al 95% en cada dedal. El reflujo fue de 1 hora a 140 °C. Inmediatamente después de recolectar el extracto de cada vaso extractor, se puso nuevamente en reflujo con 80 mL del material restante. El Extracto etanólico de propóleo (EEP) se puso en congelamiento a -20°C por 24 horas para solidificar la cera. Se filtró en vacío con papel Whatman # 40 y bomba al vacío Buchi V-710. Seguidamente los extractos totales se transfirieron a un rota vapor tipo Buchi y se mantuvo en evaporación hasta desaparecer el solvente. El sólido obtenido se secó en una estufa a 60 °C por cuatro horas para obtener el extracto blando total.

Extracto etanólico de propóleo (EEP). A partir del extracto blando, se realizó la dilución a una concentración de 6% p/v (60 mg /mL) en etanol de 95%. Esta solución se almacenó a una temperatura inferior a 10 °C y se evitó el contacto con la luz hasta su posterior uso.

Fase 2. Estudio de susceptibilidad in vitro

Preparación de inóculos. Se utilizaron cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19112, *Salmonella thipymurium* ATCC 14028 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 2783 proporcionados por el

Laboratorio de Microbiología de Alimentos Zamorano (LMAZ) conservadas en medio agar soya tripticasa (TSA, por sus siglas en inglés) almacenadas a temperatura de 3 °C. Para preparar el cultivo se tomó con un asa una colonia de la cepa en almacenamiento, sembrándose por estriado en medio TSA. Luego se llevó a la incubadora Thermo Scientific a 35 °C por 24 horas. Con las colonias rejuvenecidas se tomó una asada y se transfirió a 10 mL de caldo Universal de Pre Enriquecimiento (UPE). Se incubó a 35 °C por 6 ± 1 horas, la turbidez de la suspensión bacteriana se comparó con el estándar N°0.5 de la escala de MacFarland (1.5×10^8 células/ml) (CLSI 2012)

Evaluación del efecto bactericida. Para establecer la concentración mínima bactericida (CMB) se usó el método de macro dilución en caldo propuesta por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) y modificada por Tolosa y Cañizares 2002. Se preparó una serie de 10 tubos, el primero fue de 2 mL de caldo nutritivo a doble concentración y los nueve restantes la misma cantidad de caldo a concentración simple. Al primer tubo se añadieron 2 mL de extracto blando de propóleo al 6% y se homogenizó en un Vortex-T Genie 2 Scientific Industries. Con una alícuota de 2 mL se añadió al siguiente tubo repitiendo el procedimiento hasta la décima dilución (Cuadro 1). Esto se realizó por duplicado para cada microorganismo. El procedimiento de dilución se repitió para el testigo con etanol a 95%.

Cuadro 1. Descripción de concentraciones de propóleo en caldo nutritivo.

Tubos	Concentración de propóleo (mg/mL)	Control*
1	30	10^{-1}
2	15	10^{-2}
3	7.5	10^{-3}
4	3.75	10^{-4}
5	1.88	10^{-5}
6	0.94	10^{-6}
7	0.47	10^{-7}
8	0.23	10^{-8}
9	0.12	10^{-9}
10	0.06	10^{-10}

*etanol a 95%.

A cada serie de tubos se inoculó 0.1 mL de suspensión de bacterias. Después se incubaron a 35 °C durante 24 horas. Posterior a las 24 horas de incubación se sembró por la técnica de estriado en Agar Müller Hinton. La ausencia de colonias se usó como indicador de efecto bactericida.

Análisis estadístico. En esta etapa no se usó análisis estadístico, solo se reportó la mayor concentración de propóleo en caldo nutritivo que tuvo un efecto bactericida de dos repeticiones.

Etapas 3. Evaluación de efecto conservante en queso cabaña y análisis químico de pH.

Elaboración del queso. La formulación es la empleada en la planta de lácteos de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano los tratamientos se describen a continuación:

- Sin conservante
- Extracto etanólico de propóleo (0.23mg/g)
- Sorbato de potasio (1 mg/g)

La leche previamente descremada fue pasteurizada a 65°C por 30 min. Se enfrió hasta 4°C, después se agregó el cultivo láctico, cloruro de calcio y cuajo (quimosina). Se dejó en reposo por 12 horas hasta alcanzar 0.6% de ATECAL, seguidamente se cortó la cuajada. Luego se calentó lentamente hasta los 40 °C. Posteriormente se desueró, se lavó con agua a 24°C previamente filtrada. Finalmente se separó la cuajada en 3 porciones para los tratamientos. El queso cabaña se empacó en el envase comercial de 230 g y se almacenó a 4°C.

Análisis microbiológico. Se realizaron los análisis a los días 0, 8 y 16. Se utilizaron 10 gramos de cada muestra, mezclados con 90 mL de buffer de fosfatos estériles y agitados en Stomacher IUL Instruments Masticator durante 120 segundos, obteniéndose la dilución 10^{-1} . Posteriormente se realizaron diluciones de 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} utilizando buffer de fosfatos estéril. El recuento de psicrótrofos fue realizado sembrando las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , por el Método de vaciado en placa en Agar Cuenta Estándar (ACE), incubadas a 7°C por 10 días. Para el recuento de Enterobacterias se realizó sembrando las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} por método de vaciado en placa en Agar Bilis Rojo Violeta-Glucosa (ABRV-G), incubado a 35°C por 24 horas. El recuento de Coliformes se realizó por el Método de Número Más Probable; se sembraron las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} en Caldo Lauril Triptosa con campana de gases, incubados a 35°C por 48 horas. Luego se confirmó los Coliformes totales en caldo Bilis Verde Brillante y Medio EC para Coliformes fecales, se incubó a 45°C por 48 horas.

Análisis químico de pH. Se midió el pH de una porción comercial de queso cabaña (240 g) de cada tratamiento. Para este análisis se utilizó el potenciómetro Thermo Scientific Orion 5 Star con un electrodo tipo aguja de vidrio.

Diseño experimental. Se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA), utilizando tres tratamientos por tres repeticiones (Cuadro 2), con medidas repetidas en el tiempo a los días 0, 8, 16 para evaluación microbiológica y 0,6 y 12 para análisis de pH. Se realizó un análisis de varianza con un nivel de significancia de $P < 0.05$ y se separación de medias LSMEANS. Para los análisis se usó el programa estadístico “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.4).

Cuadro 2. Descripción de tratamientos evaluados.

Bloque[¥]	Blanco (B)	Propóleo(P)	Sorbato de Potasio(SP)
Lote 1	BL1	PL1	SPL1
lote 2	BL2	PL2	SPL2
lote 3	BL3	PL3	SPL3

Blanco: sin preservante, EEP: Extracto Etanólico de Propóleo, SP: Sorbato de potasio

¥: Diferentes lotes de leche.

Etapá 4. Análisis sensorial.

Pruebas de aceptación hedónicas. Se realizó la prueba al día 0 y 12. Se utilizaron 36 panelistas no entrenados para cada bloque, evaluando atributos como apariencia, color, olor, sabor, textura y aceptación general. Se utilizó una escala hedónica de 9 puntos (1= me desagrada extremadamente y 9= me agrada extremadamente) (Anexo 2).

Diseño experimental. Se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA). Utilizando tres tratamientos por tres repeticiones (Cuadro 2), con medidas repetidas en el tiempo a los días 0 y 12. Se realizó un análisis de varianza con un nivel de significancia de $P < 0.05$ y se separación de medias LSMEANS. Para los análisis se usó el programa estadístico “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.4).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase 2. Concentración Mínima Bactericida. La concentración bactericida para cada patógeno fue la dilución de propóleo en la que no presentó crecimiento (Cuadro 3). Para ello, se utilizó una solución matriz con 6% (p/v) de propóleo en etanol al 95%. Además se utilizó como el control negativo etanol al 95%.

Cuadro 3. Concentración mínima bactericida (CMB) del Extracto etanólico de propóleo.

Microorganismos		CMB (mg/mL) ^a
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	>7.5
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	>7.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 2783	0.23
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	3.75
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19112	1.88

^a :valores corresponden a la mayor concentración que tuvo efecto bactericida de 2 repeticiones.

Escherichia coli y *Salmonella typhimurium* no presentaron crecimiento a concentración de 7.5 mg/mL de propóleo al igual que en el control con etanol. El etanol también resulta tener acción bactericida sobre estos microorganismos (Canahuí 2009). Por la tanto, no se logró contrastar el componente que tuvo acción sobre estas bacterias.

Estos dos microorganismos enterobacterias Gram negativas no resultaron sensibles al propóleo; lo que concuerda con otro estudio donde las bacterias Gram negativas presentaron nula o reducida efectividad ante el propóleo (Velásquez *et al.* 2007). Sin embargo, aunque el propóleo independientemente de la zona recolectada tiene efecto reducido sobre Gram negativos, se encontró que con mayor cantidad de flavonoides y ácidos terpénicos se tiene efecto bactericida (Kalogeropoulos *et al.* 2009). Lo anterior sugiere que el propóleo de Zamorano tiene reducida proporción de estos componentes.

La sensibilidad de cada una de las especies de enterobacterias puede ser diferente (Gil *et al.* 2012). Estudios concuerdan que *Escherichia coli* tiene una nula o reducida sensibilidad (Serra y Lacalle 2012). No obstante, *Salmonella typhimurium* sí presenta sensibilidad al extracto de propóleo (Bogdanov 2016). Un estudio realizado en Grecia, demostró que independiente de la región recolectada, la concentración mínima bactericida de propóleo fue de 2.5 mg/mL (Kalogeropoulos *et al.* 2009).

El efecto reducido para microorganismos Gram negativos es debido a la compleja membrana que presentan, que evita la acción de los compuestos como la quercetina, naringenina, compuestos fenólicos, que en pruebas in vitro funcionan permeabilizando la membrana celular (Mirzoeva *et al.* 1997) y que facilita el ingreso de otros compuestos que tienen efecto inhibitor sobre enzimas de replicación celular (Anandhi *et al.* 2014).

Pseudomonas aeruginosa fue el microorganismo que presentó alta susceptibilidad a pesar de ser un Gram negativo. Esto concuerda con los resultados de Tolosa y Cañizares (2002) que demostraron la alta sensibilidad del microorganismo al propóleo de Campeche (México). Contrastando con lo encontrado por Mercan *et al.* (2006) donde muestra que *P. aeruginosa* tiene baja o nula sensibilidad al propóleo recolectado de diferentes zonas de Turquía. *Pseudomonas aeruginosa* no es una enterobacteria, sin embargo, es una bacteria Gram negativa. Estudios muestran que las enterobacterias tienen una menor sensibilidad al propóleo de los microorganismos Gram negativos (Kalogeropoulos *et al.* 2009).

Listeria monocytogenes y *Staphylococcus aureus* tuvieron una CMB de 1.88 y 3.75 mg/mL respectivamente. Los dos microorganismos resultan ser sensibles al propóleo. Son microorganismos Gram positivos y estudios señalan que son sensibles al propóleo (Bogdanov 2016). No obstante, las concentraciones reportadas en el estudio son diferentes a otros, aunque sí se encontró similitud de la bacteria más susceptible (Mercan *et al.* 2006). La diferencia de concentración bactericida reportada por otros autores, es ocasionada por la diferencia en la composición química del propóleo, que está dado por la ubicación geográfica y período de recolecta (Bogdanov 2016).

Fase 3. Efecto preservante en queso cabaña. El queso cabaña es un producto lácteo fresco con alta humedad, bajo en calorías y pH. Sin embargo, es susceptible a microorganismos patógenos y descomponedores como los psicrótrofos siendo la principal especie *Pseudomonas spp.* (Ledenbach y Marshall 2007). Por tal razón se determinó usar la concentración bactericida de *Pseudomonas aeruginosa* (0.23 mg / mL) para evaluar el efecto preservante del propóleo.

Recuento de enterobacterias. El recuento de enterobacterias (Log_{10} UFC/g) no tuvo diferencia significativa a lo largo del tiempo, así también entre los tratamientos (Cuadro 4). Sin embargo, es necesario mencionar que los conteos reportados en este estudio están por debajo del conteo permitido que causen riesgos para la salud ($n=4 \log_{10}$) establecidas por la comunidad Europea (Ledenbach y Marshall 2007).

Cuadro 4. Media (Log_{10} UFC/g) y desviación estándar (D.E) del recuento de enterobacterias en queso cabaña

Tratamientos	Enterobacterias		
	Día 0 ^(ns)	Día 8 ^(ns)	Día 16 ^(ns)
Blanco	1.64 ± 0.73	1.72 ± 0.10	2.72 ± 1.86
EEP (0.23 mg/g)	0.90 ± 0.35	1.08 ± 0.66	1.96 ± 1.35
SP (1 mg/g)	1.16 ± 0.41	0.80 ± 0.17	1.22 ± 0.65
C.V (%) [¥]	56.36		

^(ns): No significativo entre días y tratamientos ($P > 0.05$)

[¥]: Coeficiente de variación.

Blanco: sin preservante, EEP: Extracto Etanólico de Propóleo, SP: Sorbato de potasio.

El crecimiento de las enterobacterias no fue significativo en el tiempo ($P < 0.05$) esto se puede relacionar a la temperatura de almacenamiento del queso (4 °C), pues son microorganismos mesófilos, por lo que su crecimiento en temperaturas de refrigeración es reducido. Algunas especies pueden ser psicrótrofos, sin embargo, su crecimiento en este estudio no fue significativo (Ledenbach y Marshall 2007).

El EEP no tuvo efecto alguno sobre las enterobacterias en queso cabaña. Esto concuerda con lo reportado en la primera etapa de este estudio, en la que *E. coli* y *S. typhimurium* dos miembros de enterobacterias, no reportaron sensibilidad a una concentración más alta a la que fue utilizada en esta fase del estudio. Por esto se puede confirmar que el propóleo de Zamorano no tiene efecto sobre este grupo de microorganismos. Algunas especies de enterobacterias evaluadas *in vitro* mostraron reducido o casi nula sensibilidad al propóleo (Silici *et al.* 2007) lo que concuerda con este estudio. No obstante, en otro estudio realizado *in vitro* sí se encontró efecto bactericida sobre algunas especies (Gil *et al.* 2012), esto debido a la diferencia de la composición química que tiene el propóleo de acuerdo a la zona de recolección (Bogdanov 2016).

El sorbato de potasio no tuvo efecto significativo sobre las enterobacterias, esto concuerda con estudios en los que concentración de 2 mg/g, el doble de lo usado en este estudio, no tiene efecto sobre algunas especies evaluadas, por lo que se esperaría un efecto nulo para este grupo de microorganismos (Molier y Rojas 2007). Las enterobacterias son resistentes a inhibidores y conservantes alimentarios. Su resistencia está asociada a la compleja membrana que tienen por ser Gram negativas. Las capas celulares externas limitan el ingreso de los compuestos que tienen acción directa sobre las enzimas u organelos de la célula bacteriana (Russell y Gould 1988).

Recuento de coliformes totales. Los coliformes son microorganismos que incluyen especies fecales y ambientales (Herrera 2001). Los coliformes totales son usados en alimentos como indicadores de calidad sanitaria de la planta. Los recuentos reportados en este estudio están por debajo de 3 log_{10} UFC/g establecido por la norma peruana para quesos frescos (DIGESA 2003).

Cuadro 5. Media (Log_{10} NMP/g) y desviación estándar (D.E) del recuento de coliformes totales en queso cabaña.

Tratamientos	Coliformes Totales		
	Día 0 ^(ns)	Día 8 ^(ns)	Día 16 ^(ns)
Blanco	2.57 ± 0.58 ^a	2.11 ± 0.89 ^a	2.59 ± 0.78 ^a
EEP (0.23 mg/g)	2.13 ± 0.50 ^a	1.69 ± 0.23 ^a	1.64 ± 0.50 ^{ab}
SP (1mg/g)	1.93 ± 0.44 ^a	1.83 ± 0.60 ^a	1.43 ± 0.22 ^b
C.V (%) [¥]	27.91		

^(ns) :No significativo entre días ($P > 0.05$)

^{abc} Letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

[¥] Coeficiente de variación.

Blanco: sin preservante, EEP: Extracto Etanólico de Propóleo, SP: Sorbato de potasio.

El recuento de coliformes totales no tuvo diferencias significativas ($P < 0.05$) a lo largo del tiempo (Cuadro 5).

Entre los tratamientos se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) únicamente al día 16. El EEP evidenció actividad bactericida significativa al día 16, siendo el conteo inferior al día 0. Los coliformes totales son un grupo de bacterias Gram negativas fermentadores de lactosa que no están exclusivamente integradas por bacterias de la familia enterobacteriaceae (Gaitán 2001) sino también por otras bacterias Gram negativas de vida libre. El EEP no tuvo acción sobre las enterobacterias como lo señalan otros estudios (Silici *et al.* 2007).

Los resultados difieren del reportado por Gutiérrez y Suarez (2012) que no encontraron ninguna acción de EEP sobre coliformes totales usando concentración de 0.8 mg/g evaluado en chorizo. Esto pudo ser por diferencia de composición que presenta el propóleo de acuerdo a la región donde se recolecta (Gil *et al.* 2012), otra posible causa pudo ser el bajo pH del queso cabaña que ronda valores de 4.6, el cual ayudaría al efecto bactericida del EEP (Vicente y Escobar 2012).

El sorbato de potasio presentó actividad bactericida significativa únicamente en el día 16, al igual que el EEP. El sorbato sí demuestra eficacia contra coliformes totales y demuestra un mejor funcionamiento a pH inferior a 6 (Jay *et al.* 2005), el queso cabaña al encontrarse a un pH de 4.6 favorecería a la acción del Sorbato.

Recuento de psicrótrofos. Los psicrótrofos son bacterias mesófilas que crecen en temperaturas de refrigeración (3-7 °C) pueden tener tiempos de generación de 8-12 horas a 3 °C (Carrillo y Audisio 2007). El principal motivo del acortamiento de la vida útil de quesos frescos, como el queso cabaña, son los psicrótrofos que hidrolizan las proteínas y grasas confiriéndole un sabor a pastura verde (Ho *et al.* 2016). La mayoría de estos microorganismos deterioradores son eliminados en la pasteurización de la leche, sin embargo, en el lavado de la cuajada para elaboración del queso cabaña se puede introducir un número considerable (Ledenbach y Marshall 2007).

Cuadro 6. Media (Log_{10} UFC/g) y desviación estándar (D.E) del recuento de psicrótrofos en queso cabaña.

Tratamientos	Psicrótrofos		
	Día 0 ^(ns)	Día 8 ^(ns)	Día 16 ^(ns)
Blanco	5.92 ± 0.77	6.93 ± 0.48	6.89 ± 0.57
EEP (0.23 mg/g)	5.72 ± 0.62	6.72 ± 0.65	6.64 ± 0.58
SP (1mg/g)	5.39 ± 1.12	6.40 ± 1.02	6.36 ± 0.18
C.V % [¥]	10.72		

^(ns) :No significativo entre días y tratamientos ($P > 0.05$)

[¥] Coeficiente de variación.

Blanco: sin preservante, EEP: Extracto Etanólico de Propóleo, SP: Sorbato de potasio.

El crecimiento de los psicrótrofos en el estudio no fue significativo en el tiempo ($P < 0.005$) para el queso almacenado a 4 °C (Cuadro 6). En la temperatura y pH del queso cabaña se tendría que reportar crecimiento de psicrótrofos (Ledenbach y Marshall 2007) pero los resultados muestran contradicción. Es posible que los conteos se debieron a las bacterias Ácido lácticas que tienen un rango de crecimiento de 5-45 °C (Carrillo y Audisio 2007) estando dentro los 7 °C usados para incubación por tal razón, lograron formar colonias contables en el ACE durante los 10 días.

El EEP y el Sorbato de potasio no tuvieron efecto significativo sobre los microorganismos entre los días evaluados. Aunque en las pruebas de CMB el microorganismo susceptible fue la *Pseudomona aeruginosa*. El principal psicrótrofo descomponedor de los productos lácteos es del género *Pseudomonas spp.* (Ledenbach y Marshall 2007) por esto se esperaría que presentara acción sobre los microorganismos. No pudo ser contrastado por los altos conteos de Bacterias ácido lácticas, las cuales no presentan susceptibilidad al EEP (Kalegeropoulos *et al.* 2009).

Análisis químico del pH. El queso cabaña se obtiene por coagulación ácida. Se acidifica la leche con la ayuda de bacterias ácido lácticas, hasta llegar al punto isoeléctrico de la caseína (pH=4.6) en la que se precipita (Ho *et al.* 2016).

EL pH inicial reportado de los diferentes tratamientos (Cuadro 7) está por debajo del pH recomendado (4.65 – 4.7) (Bodyfelt y Potter 2009). Eso pudo ser causado por el corte de la cuajada que se hizo al pH más bajo del punto isoeléctrico de la caseína, o por usar temperaturas bajas durante la cocción. (Boittetfroy *et al.* 2000). En consecuencia el bajo pH inicial reduce la capacidad de retención de agua y cambios indeseables en la textura.

Cuadro 7. Media (pH) y desviación estándar de pH en queso cabaña.

Tratamientos	pH		
	Día 0	Día 6	Día 12
Blanco	4.44 ± 0.03 ^{X(b)}	4.43 ± 0.03 ^{X(b)}	4.25 ± 0.05 ^{Y(b)}
EEP (0.23 mg/g)	4.44 ± 0.05 ^{X(b)}	4.44 ± 0.04 ^{X(b)}	4.27 ± 0.03 ^{Y(b)}
SP (1mg/g)	4.53 ± 0.09 ^{X(a)}	4.53 ± 0.06 ^{X(a)}	4.33 ± 0.11 ^{Y(a)}
C.V % [¥]	0.84		

^{XYZ}: Letras diferentes en la misma fila son significativamente diferente entre días (P<0.05).

^{abc} : Letras diferentes en la misma columna son Significativamente diferente entre tratamientos (P<0.05).

[¥]: Coeficiente de variación.

Blanco: sin preservante, EEP: Extracto Etanólico de Propóleo, SP: Sorbato de potasio.

A través del tiempo, se observa que todos los tratamientos son estadísticamente iguales hasta el día 6, para el día 12 se observa un descenso significativo (P<0.05) del pH en todos los tratamientos. La disminución del pH en queso cabaña se debe al aumento de ácido láctico producido por el cultivo láctico agregado en la elaboración (Ramírez y Vélez 2012). La disminución del pH del queso cabaña en el tiempo frecuentemente se da por inestabilidad en la temperatura, acortando su vida anaquel (Makhal *et al.* 2014).

El bajo pH favorece la acción bactericida del Propóleo como también del Sorbato de potasio (Boittefroy *et al.* 2000). En este estudio únicamente los coliformes totales presentaron sensibilidad al propóleo, coincidiendo la acción bactericida del día 16 donde también hubo una disminución significativa del pH (4.27). Por ende, se puede afirmar que un bajo pH contribuye a la acción bactericida del propóleo sobre los microorganismos (Vicente y Escobar 2012). Por el contrario, únicamente un bajo pH sin preservante puede funcionar como bacteriostático sobre los coliformes totales como se puede observar en el tratamiento blanco (Cuadro 5) (Ledenbach y Marshall 2007)

Entre los tratamientos se encontraron diferencias significativas (P<0.05). El tratamiento con sorbato de potasio tuvo un pH significativamente superior el día 0 manteniendo esta tendencia al día 6 y 12 (Cuadro 7). El pH superior observado en el tratamiento con sorbato de potasio, se debe al preservante, que al disociarse el ion potasio actúa como alcalinizante. Por lo que, a una mayor cantidad de sorbato usado en la matriz alimentaria se puede encontrar un aumento significativo del pH (Flores 2010)

Fase 3. Evaluación sensorial.

Análisis sensorial de la apariencia. En el queso cabaña generalmente se espera que las partículas de cuajada se encuentren separadas y presenten una regular uniformidad en tamaño y forma. También debe de exhibir brillo leve, color blanco y una mínima presencia de crema libre (Bodyfelt y Potter 2009).

Los panelistas no encontraron diferencias significativas entre días como también entre los tratamientos (Cuadro 8). Además, se puede mencionar que la calificación tiene un aproximado de 7, indicando que la textura del queso cabaña tuvo una aceptación de, me gusta moderadamente por parte de los panelistas. Así mismo, se puede observar que el extracto etanólico de propóleo no tuvo efecto sensorial sobre la apariencia.

Cuadro 8. Media y desviación estándar del atributo apariencia evaluada sensorialmente del queso cabaña.

Tratamientos	Apariencia*	
	Día 0 ^(ns)	Día 12 ^(ns)
Blanco	6.99 ± 1.4	6.84 ± 1.6
EEP (0.23 mg/g)	6.82 ± 1.5	6.86 ± 1.4
SP (1mg/g)	6.62 ± 1.6	6.74 ± 1.5
C.V % [¥]	22.63	

^(ns): No significativo entre días y tratamientos (P>0.05)

[¥]: Coeficiente de variación.

*: Escala hedónica: 1: me disgusta extremadamente, 9: me gusta extremadamente.

Blanco: sin preservante, EEP: Extracto Etanólico de Propóleo, SP: Sorbato de potasio.

Los principales factores que modifican la apariencia en el queso son el pH o la temperatura de cocción de la cuajada. En este estudio inicialmente el pH fue inferior al punto isoeléctrico de la caseína, Por esta razón las partículas de la cuajada presentaron formas y tamaños desiguales, y exudación de suero (Bodyfelt y Potter 2009). No obstante, los panelistas no consideran esas cualidades al no ser entrenados, por lo que basan su criterio de calificación en la percepción visual de la cuajada.

Análisis sensorial del color. El queso cabaña no es muy diferente a otros quesos en lo que respecta a color. El color puede ir de blanco a crema claro. Cuanto más blanca es la cuajada se tiene mayor aceptación (De la Torre y Suchini 2011)

No se encontraron diferencias significativas (P>0.05) a través del tiempo ni entre tratamientos (Cuadro 9). Por otro lado, se puede observar que los tratamientos tienen una calificación de, me gusta moderadamente. Esto indica que la cantidad agregada del extracto etanólico de propóleo no modifica el color blanco del queso a la percepción del panelista a pesar de que el extracto del propóleo utilizado, es de color verde oscuro. Un estudio realizado con propóleo de Zamorano indica que si hubo cambio de color al ser evaluado en mermelada (Gerónimo 2009),

Cuadro 9. Media y desviación estándar del atributo color evaluado en queso cabaña.

Tratamientos	Color*	
	Día 0 ^(ns)	Día 12 ^(ns)
Blanco	7.30 ± 1.3	7.30 ± 1.4
EEP (0.23 mg/g)	7.02 ± 1.4	7.18 ± 1.4
SP (1mg/g)	7.15 ± 1.2	7.04 ± 1.5
C.V % [‡]	19.77	

^(ns): No significativo entre días y tratamientos.

[‡]: Coeficiente de variación.

*: Escala hedónica: 1: me disgusta extremadamente, 9: me gusta extremadamente.

Blanco: sin preservante, EEP: Extracto Etanólico de Propóleo, SP: Sorbato de potasio.

Análisis sensorial de olor. El queso cabaña no presenta olor característico, sin embargo, el uso de determinadas bacterias ácido lácticas demostraron conseguir olores que aumentan su preferencia. (Bodyfelt y Potter 2009).

El olor del queso cabaña no fue significativo a través del tiempo (Cuadro 10), es decir, los panelistas tuvieron la misma preferencia tanto al día 0 y 16. Por otro lado, se puede observar que la calificación aproximada fue de 7 lo que indica una preferencia moderada a este atributo.

Entre tratamientos sí se encontró diferencias significativas ($P < 0.05$) únicamente el día 0, esto indica que el EEP le confiere olores que puede percibir el panelista. El propóleo tiene olor a bálsamo, resinas o puede ser inodora. Sin embargo, los panelistas en la descripción indican un olor a desinfectante lo que se atribuye al uso del etanol y no el propóleo.

Al día 12 los tratamientos no presentaron diferencia significativa, indicando que el olor diferente percibido en el tratamiento con EEP al día 0 no persistió para el día 12, esto estaría relacionado con la disminución del pH o aumento de ácido láctico que hace que se sienta un olor a yogurt o mantequilla que puede contrastar otros olores (Bodyfelt y Potter 2009).

Cuadro 10. Media y desviación estándar del atributo olor evaluado en queso cabaña.

Tratamientos	Olor*	
	Día 0 ^(ns)	Día 12 ^(ns)
Blanco	7.18 ± 1.2 ^a	6.86 ± 1.4 ^a
EEP (0.23 mg/g)	6.74 ± 1.5 ^b	6.56 ± 1.5 ^a
SP (1mg/g)	6.93 ± 1.4 ^{ab}	6.68 ± 1.4 ^a
C.V % [‡]	21.63	

^(ns): No significativo entre días ($P < 0.05$)

^{abc}: Letras diferentes son significativamente diferente entre tratamientos ($P < 0.05$).

[‡]: Coeficiente de variación.

*: Escala hedónica: 1: me disgusta extremadamente, 9: me gusta extremadamente.

Blanco: sin preservante, EEP: Extracto Etanólico de Propóleo, SP: Sorbato de potasio.

Análisis sensorial del sabor. El queso cabaña con crema debe de tener un sabor fresco, ligera acidez y un sabor suave a mantequilla. No debe de presentar sabores adicionales más que el sabor salado, sin embargo, se presentan variaciones de acidez y sensación a mantequilla (Diacetilo) de acuerdo al cultivo láctico usado para la acidificación (Bodyfelt y Potter 2009). La proporción de crema añadida está directamente relacionada a una mayor aceptación del queso, pues está oculto el sabor amargo causado por la baja acidez (Martin *et al.* 2016).

Se encontraron diferencias significativas a través del tiempo ($P < 0.05$). El tratamiento blanco y sorbato de potasio tuvieron una calificación significativamente inferior al primer día (Cuadro 11). Esto concuerda con otro estudio que menciona que el queso cabaña pierde cualidades sensoriales a través del tiempo (Memisi *et al.* 2014). El principal motivo de pérdida de sabor es la disminución del pH, esto causado por actividad bacteriana. Cuando más se acidifica el queso cabaña se percibe un sabor amargo producido por el ácido láctico (Bodyfelt y Potter 2009). Por otro lado, el tratamiento con el EEP no presentó diferencia significativa en el tiempo, es decir, no cambió el sabor inicial.

Cuadro 11. Media y desviación estándar del atributo sabor evaluado en queso cabaña.

Tratamientos	Sabor*	
	Día 0	Día 12
Blanco	7.44 ± 1.2 ^{X(a)}	6.68 ± 1.7 ^{Y(a)}
EEP (0.23 mg/g)	6.10 ± 1.7 ^{X(c)}	5.92 ± 2.0 ^{X(b)}
SP (1mg/g)	6.85 ± 1.4 ^{X(b)}	6.35 ± 1.7 ^{Y(ab)}
C.V % [¥]	25.91	

^{XYZ}: Letras diferentes son significativamente diferente entre días ($P < 0.05$).

^{abc} : Letras diferentes son Significativamente diferente entre tratamientos ($P < 0.05$).

[¥]: Coeficiente de variación.

*: Escala hedónica: 1: me disgusta extremadamente, 9: me gusta extremadamente.

Blanco: sin preservante, EEP: Extracto Etanólico de Propóleo, SP: Sorbato de potasio.

El sabor fue significativamente diferente ($P < 0.05$) entre tratamientos, tanto en el primer como al doceavo día (Cuadro 11).

Para el día 0, el tratamiento que no tiene conservante es el que presenta mejor aceptación teniendo una puntuación de 7 correspondido a una valoración de me gusta moderadamente. El tratamiento con sorbato de potasio (1mg/g) tuvo una preferencia significativamente inferior al blanco. El sorbato de potasio tiene un sabor ligeramente amargo y puede ser percibido a concentraciones superiores de 1.25 mg/g (Collins y Moustafa 1968). El bajo pH contribuyó a realzar el ligero sabor amargo del sorbato hasta ser percibido por el panelista (Bodyfelt y Potter 2009). Análogamente para el tratamiento con EEP el pH inicial (Cuadro 7) contribuyó a realzar el sabor amargo picante que presenta el propóleo de Zamorano, el cual es más intenso. Es por ello que tuvo la menor puntuación ($P < 0.05$). A pesar de todo el tratamiento con EEP tuvo una valoración promedio de 6 lo que corresponde a una calificación de me gusta poco.

Así mismo, al doceavo día se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos, siendo el tratamiento blanco el único que presentó una calificación significativamente superior al resto de tratamientos. Para el doceavo día se observó un pH inferior al primero (Cuadro 7), sin embargo, esto no influyó en el realce del sabor amargo picante del propóleo, por el contrario, si ocurrió con el Sorbato de potasio.

Análisis sensorial de textura. La textura debe ser firme y carnosa para absorber la crema, ya que el sobrante le confiere una textura fangosa. Además, no debe ser harinoso, desmenuzable, pegajoso o presentar viscosidad (USDA 2001).

La textura (Cuadro 12) no presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) a través del tiempo. Esto indica, que los tratamientos no sufren cambio sustancial de textura en el tiempo. Por ende la concentración usada de EEP no modifica en el tiempo la textura del queso. Esto concuerda con un estudio realizado en queso fresco usando concentraciones de 5 o 10% de propóleo y no presentó efecto en la textura en un período de almacenamiento de 30 días (Metwalli 2011).

Cuadro 12. Media y desviación estándar del atributo textura evaluado en queso cabaña.

Tratamientos	Textura*	
	Día 0 ^(ns)	Día 12 ^(ns)
Blanco	7.22 ± 1.3 ^a	6.78 ± 1.7 ^a
EEP (0.23 mg/g)	6.37 ± 1.6 ^b	6.42 ± 1.8 ^a
SP (1mg/g)	6.73 ± 1.6 ^b	6.62 ± 1.6 ^a
C.V % [‡]	24.61	

^(ns): No significativo entre días.

^{abc}: Letras diferentes son Significativamente diferente entre tratamientos ($P < 0.05$).

[‡]: Coeficiente de variación.

*: Escala hedónica: 1: me disgusta extremadamente, 9: me gusta extremadamente.

Blanco: sin preservante, EEP: Extracto Etanólico de Propóleo, SP: Sorbato de potasio.

Los tratamientos presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) únicamente en el primer día. El tratamiento que tuvo mejor valoración fue el blanco con una puntuación promedio de 7 que equivale a una aceptación moderada. Los tratamientos menos aceptados fueron el de EEP y sorbato de potasio pese a estar dentro de una calificación me gusta moderadamente. La menor valoración de la textura para el tratamiento con EEP, se debe al etanol que está relacionado con la alteración de la matriz de caseína, disminuyendo la estabilidad de la cuajada.

Análisis de la aceptación general. El cuadro 13 muestra los resultados obtenidos de la aceptación general en cuanto a evaluación sensorial de cada tratamiento aplicado al queso cabaña. En ella no se encontró diferencias significativas ($P < 0.05$) en el tiempo indicando que los tratamientos son igualmente aceptados.

Por el contrario, si hubo diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$) tanto en el primer como en el doceavo día. Estos resultados muestran un patrón semejante al atributo sabor, perfilando como el atributo que tuvo una mayor relevancia en el panelista al momento de la valoración final del tratamiento. El tratamiento blanco tuvo una mayor valoración en ambos días. Los tratamientos con Sorbato de potasio y EEP presentaron igual valoración significativa.

Cuadro 13. Media y desviación estándar de la aceptación general evaluado en queso cabaña.

Tratamientos	Aceptación General	
	Día 0	Día 12
Blanco	7.33 ± 1.1 ^(a)	6.92 ± 1.5 ^(a)
EEP (0.23 mg/g)	6.48 ± 1.5 ^(b)	6.32 ± 1.7 ^(b)
SP (1mg/g)	6.80 ± 1.3 ^(b)	6.64 ± 1.5 ^(ab)
C.V % [¥]	22.27	

^{XYZ}: Letras diferentes son significativamente diferente entre días ($P < 0.05$).

^{abc} : Letras diferentes son Significativamente diferente entre tratamientos ($P < 0.05$).

[¥]: Coeficiente de variación.

Blanco: sin preservante, EEP: Extracto Etanólico de Propóleo, SP: Sorbato de potasio.

Preferencia. La preferencia se analizó a través de una prueba estadística de Chi-cuadrado (figura 1). Para el día 0 se observó que la muestra más preferida fue el tratamiento blanco, seguida del tratamiento con sorbato de potasio y la menos preferida el tratamiento con EEP. En el día 12 el porcentaje de panelistas que prefirieron el tratamiento blanco disminuyó en 14 puntos porcentuales, sin embargo sigue siendo el de mayor preferencia. Por otro lado, el tratamiento con EEP aumentó su preferencia a 12 puntos porcentuales, el tratamiento con sorbato de potasio obtuvo la menor preferencia al doceavo día.

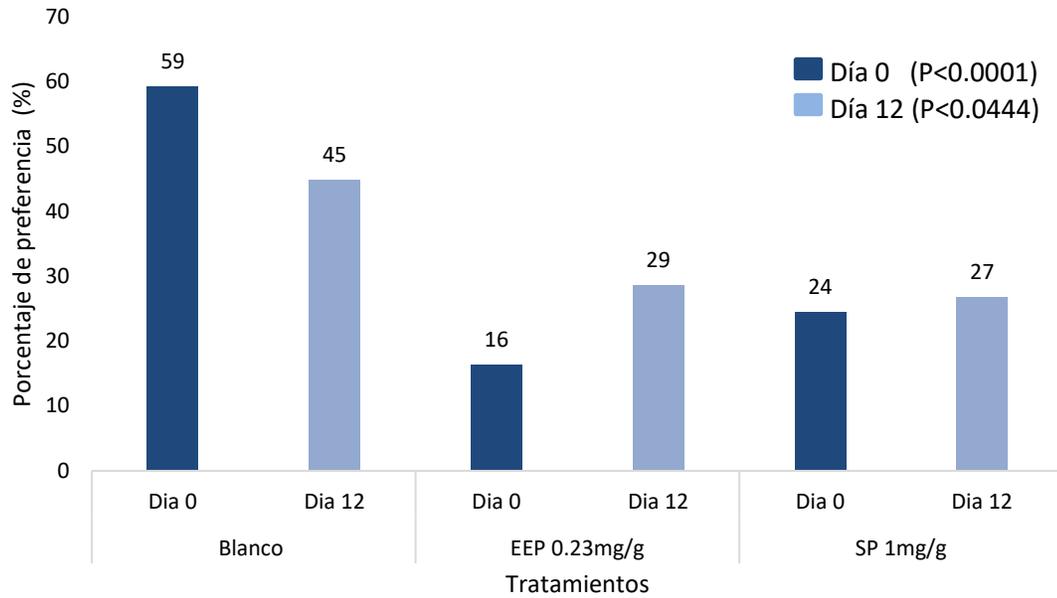


Figura 1. Preferencia de los consumidores medidos a través del tiempo por prueba de chi-cuadrado ($P < 0.05$).

Blanco: sin preservante, EEP: Extracto Etanólico de Propóleo, SP: Sorbato de potasio.

4. CONCLUSIONES

- *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium* (Gram Negativos) no presentan sensibilidad al propóleo, sin embargo *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Gram positivos) tuvieron sensibilidad con concentración mínima bactericida de 3.75 mg/mL y 1.88 mg/mL.
- El microorganismo más susceptible fue *Pseudomonas aeruginosa* con una concentración mínima bactericida de 0.23 mg/mL.
- El propóleo de Zamorano tiene potencial uso como preservante en alimentos, aunque no presentó efecto sobre las enterobacterias y psicrótrofos, sí demostró efecto sobre los coliformes totales en queso cabaña.
- Los consumidores pueden encontrar diferencias en atributos como el olor, sabor y textura, esto hace que extracto etanólico de propóleo aplicado en queso sea menos aceptado que el producto tradicional.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar una caracterización fisicoquímica y sensorial del propóleo de Zamorano y una evaluación de la efectividad microbiana del propóleo por períodos de cosecha.
- Evaluar el uso del propóleo en alimentos con alta humedad, bajo pH y sabores más intensos para ocultar el sabor amargo que se puede percibir en bajas concentraciones.
- Evaluar propiedades anti fúngicas y antioxidantes usando otros solventes de grado alimenticio.
- Evaluar propiedades antioxidante celular del propóleo zamorano.
- Evaluar efecto sensorial del etanol en el queso.

6. LITERATURA CITADA

Alzamora S, Guerrero S, Nieto A, Vidales S. 2004. Conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas: Manual de capacitación. 1er ed. Roma (Italia): [consultado 2016 oct 15] <http://www.fao.org/3/a-y5771s.pdf>.

Anandhi D, Srinivasan P, Praveen G, Jagatheesh S. 2014. DNA fragmentation induced by the glycosides and flavonoids from *C. coriaria*. International journal of Current Microbiology and Applied Sciences. [consultado 2016 nov 26]. 666-673 pag. <http://www.ijcmas.com/vol-3-12/D.Anandhi,%20et%20al.pdf>

Bodyfelt F, Potter D. 2009. Creamed cottage cheese [SPRINGER]. Springer US. Dept. Food Science & Human Nutrition, Washington State University, Dept. Food Science & Human Nutrition, Washington State University, Department of Food Science, North Carolina State University, Department of Food Science, Oregon State University.

Bogdanov S. 2016. Propolis: Composition, Health, Medicine: A review. Bee Product Science. [consultado 2016 sep 26]. 1-42p. <http://www.bee-hexagon.net/files/file/fileE/Health/PropolisBookReview.pdf>.

Boittetfroy A, Mansour M, Linder M, Millere J. 2000. Inhibitory combinations of nisin, sodium chloride, and pH on *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in broth by an experimental design approach. [PufMed]. 10;54 (1-2):109-15.

Canahuí A. 2009. Comparación de la capacidad bactericida del alcohol etílico 95%, amonio cuaternario y pvp iodine como ingredientes activos de los desinfectantes por el método del coeficiente fenólico [Tesis]. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 91p

Carrillo L. y Audisio M. 2007. Manual de microbiología de alimentos. 1er ed. Jujuy (Argentina). UNJU; (consultado 2016 oct 22). <http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/14%20leche%20y%20derivados.pdf>.

Carrillo M, Castillo L, Mauricio R. 2011. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de propóleos de la Huasteca Potosina (México). Información Tecnológica. Vol.22 (5), 21-28 (2011) doi: 10.4067/S0718-07642011000500004

Clayton K, Bush D, Keener K. 2016. Emprendimientos alimentarios: Métodos para la conservación de alimentos. PURDUE EXTENSION. EEUU; (consultado 2016 oct 23). <https://www.extension.purdue.edu/extmedia/FS/FS-15-S-W.pdf>

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 9th ed. Pennsylvania (EE.UU): [consultado 2016 oct 25] https://www.google.hn/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwir2P_q6PzPAhVGRSYKHbEaBGgQFggaMAA&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffile.PostFileLoader.html%3Fid%3D564ceedf5e9d97daf08b45a2%26assetKey%3DAS%253A297254750572544%25401447882463055&usg=AFQjCN E6KeHugRFV-Kc76YHAKgQq9wUubw&sig2=VRsFhsLvXeKIT_rUiw67MA

Collins E, Hassan H. 1968. Sensory- life evaluations of cottage cheese treated with potassium sorbate. Department on Food Science and Technology. University of California. Vol 52. N° 4. Doi : 10.3168/jds.S0022-0302(69)86584-7

Digesa. 2012. Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano [Internet]. [consultado 2016 nov 26]. http://www.digesa.sld.pe/norma_consulta/Proy_RM615-2003.pdf

Elsser-Gravesen D, Elsser- GravEsen A. 2013. Biopreservatives. Adv Biochem Eng Biotechnol (2014) 143: 29-49p. doi: 10.1007/10_2013_234

Flores J. 2010. Efecto conservante (Sorbato de potasio) y un mejorador (Carboimetilcelulosa) sobre las características sensoriales y la vida anaquel de las empanadas de viento (pasteles) elaboradas en la planta artesanal Taty [Tesis]. Universidad Técnica de Ambato. Ambato- Ecuador. 92p

Gerónimo A, 2009. Comparación del efecto antimicrobiano del propóleo y el benzoato de sodio en mermelada de mango de la Escuela Agrícola Panamericana (Tesis). Zamorano-Honduras. 1-30p.

Gil M, Perelli A, Riloarbert A, Arias Y, Blumenthal E. 2012. Actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas. Scielo. [consultado 2016 nov 26] http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-71382012000300006

Gutiérrez C, Suárez H. 2012 Actividad Microbiana de Propóleos y Efecto en las características fisicoquímicas y sensoriales en chorizos. Colombia. Scielo. [consultado 2016 set 26]. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042014000200003

Herrera A. 2001. Coliforms. Food Microbiology Protocols.14: 29-36p. doi: 1016/S0944-5013(97)80034-1

Ho T, Howes T, Bhandari. 2016. Methods to extend the shelf-life of cottage cheese. International Journal of Dairy Technology. 313-328p. Vol 69. Doi:10.1111/1471-0307.12.309

Jay J, Loessner M, Golden D. 2005. Modern Food Microbiology. Seventh Edition. United State: Editorial board; [consultado 2016 oct 06]. <http://www.springer.com/la/book/9780387231808>

Kalogeropoulos N, Konteles S, Troullidou E, Mourtzinis I, Karathanos V. 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. Food Chemistry 116 (2009) 452-461. [consultado 2016 oct. 16]. 453-461p <http://sci-hub.cc/10.1016/j.foodchem.2009.02.060>

Ledenbach L, Marshall R. 2007. Microbiological Spoilage of dairy Products. Food Microbiology and Food Safety-Springer. 41-67. Ingles DOI: 10.1007/978-1-4419-0826-1_2

Lu L, Chen Y, Chou C. 2003. Antibacterial and DPPH Free Radical- scavenging Activities of the Ethanol Extract of Propolis Collected in Taiwan. Journal of Food and Drug Analysis. Vol 11, N°4, 2003. [consultado 2016 oct 12]. 277-282p. https://www.researchgate.net/publication/279627641_Antibacterial_and_DPPH_free_radical-scavenging_activities_of_the_ethanol_extract_of_propolis_collected_in_Taiwan

Lu L, Chen Y, Chou C. 2005. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus* [ELSEVIER]. International Journal of Food Microbiology 102 (2005).2003-2004. 213-220p.

Makhal S, Kumar S, Giri A. 2012. Effectiveness of thymol in extending keeping quality of cottage cheese. J Food Sci Technol. Doi: 10.1007/s13197-012-0715-y

Martin C, Schoumacker R, Bourjade D, Danguin T, Guichard E, Le J, Laboure H. 2016. Sensory properties linked to fat content and tasting temperature in cottage cheese. Dairy Sci. & Technol. 736-745 eng. Doi: 10.1007/s13594-016-0301-6

Memisi N, Veskovic S, Skrinjar M, Ilicic m, Ac M. 2014. Storage temperature: factor of shelf life of dairy products. Original scientific paper. APTEFF, 45, 1-283. 55-66. Eng. Doi: 10.2298/APT1445055M

Mercan N, Kivrak I, Duru M, Katircioglu H, Gulcan S, Malci S, Acar G, Salih B. 2006. Chemical composition effects onto antimicrobial and antioxidant activities of propolis collected from different regions of Turkey. Annals of Microbiology, 56(4) 373-378 (2006). [consultado 2016 oct 16]. 373-378p. <http://link.springer.com/article/10.1007/BF03175035>

Metwalli S. 2011. Extended shelf life of kareish cheese by natural preservatives. Egypt. J. Agric. [consultado 2016 nov 26]. Vol 2. 639-649 pag. <http://www.arc.sci.eg/ejar/UploadFiles/Publications/111242%D8%A7%D9%84%D8%A8%D8%AD%D8%AB%20%D8%A7%D9%84%D8%AB%D8%A7%D9%84%D8%AB%20%D8%AA%D9%83%D9%86%D9%88%D9%84%D9%88%D8%AC%D9%8A%D8%A7.pdf>

Mirzoeva O, Grishanin R, Calder P. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. Microbiological Research. 239-246 p. doi: 10.1016/S0944-5013(97)80034-1

Molier T, Rojas N. 2007. Evaluación de la actividad antibacteriana de preservativos industriales. Revista CENIC Ciencias Biológicas. Vol 38. Núm 1. 45-48p. <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181221557005.pdf>

Mori, A, Nishio C, Enoki N, Tawata S. 1987 Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. Pergamos Journal. 26: 2231-2234p. doi: 10.16/S0944-5013(97)80034-1

Ramirez C, Vélez J. 2012. Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. Temas selectores de ingeniería de alimentos. [consultado 2016 nov 28]. Vol. 6, Numero 2, 131-148p. <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-62Ramirez-Lopez-et-al-2012.pdf>

Rodríguez N. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. Ra Ximhai. [consultado 2016 sep 28]. Vol. 7, Número 1. Enero- Abril 2011. 153-170p. <http://www.redalyc.org/pdf/461/46116742014.pdf>

Russell A, Gould G. 1988. Resistance of Enterobacteriaceae to preservatives and disinfectants. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement. 168S-195S eng. Doi: 10.1111/j.1365-2762.1988.tb04651.x

Samarzija D, Zamberlin S, Pogacic. 2012. Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. Pregledni rad. [Consultado 2016 Nov 15]. Vol 62. 77-95p. <http://hrcak.srce.hr/file/124020>

Silici S, ÜnlüGülhan M, Ünlü V. 2007. Antibacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions. World J Microbiol Biotechnol. Volume 23. 1797-1803. Doi: 10.1007/s11274-007-9430-7.

Tolosa L, Cañizares E. 2002. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de propóleos de Campeche [Tesis]. Universidad Autónoma de Campeche-México. 55p

USDA (United States Department of Agriculture). 2001. Specifications for cottage cheese and dry curd cottage cheese [Internet]. United States. [consultado 2016 nov 24]. <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/cottagecheese.pdf>

Vargas S, Torrescano U, Mendoza W, Vallejo G, Acedo F, Sánchez E, Peñalba G, Sánchez A. 2013. Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleos. Biotecnia. [consultado 2016 oct 16]. Volumen XVI, Número 1. 32-37p

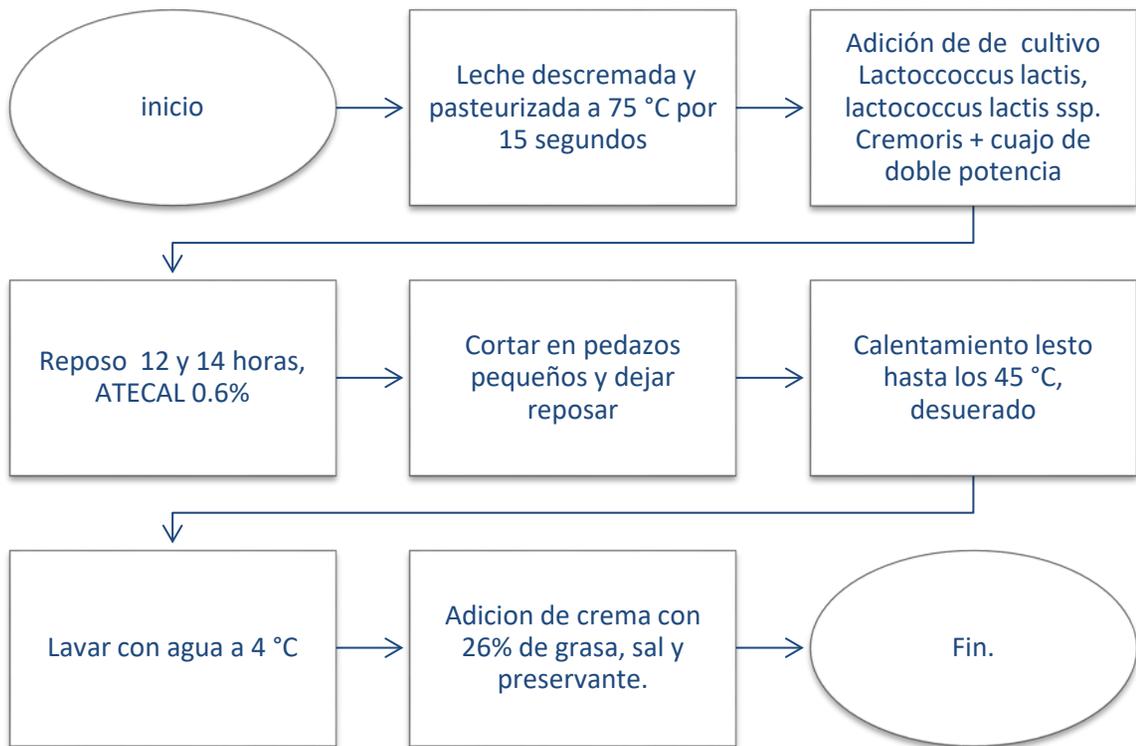
Velazquez C, Navarro M, Acosta A, Angulo A, Domínguez Z, Robles R, Robles-Zepeda Z, Lugo E, Goycoolea F, Velazquez E, Astiazaran H, Hernandez J. 2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072. 1747-1756p. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03409.x

Vicente E, Escobar V. 2012. Efecto antibacterial del propóleo sobre *Listeria monocytogenes in vitro* y en la superficie de melón (*Cucumis melo*) [Tesis]. Zamorano-Honduras. 1-27 p.

Wiley H. The Effect of Preservatives on Metabolism [JSTOR]. Proceedings of the American Philosophical Society, Vol. 44, N°. 179 (Jan.-Apr., 1905). 66-68p. <http://www.jstor.org/stable/983606>

7. ANEXOS

Anexo 1. Flujo de proceso para elaboración de queso cabaña



Anexo 2. Boleta de análisis sensorial.

Evaluación sensorial de aceptación

Nombre _____ **Fecha** _____

Instrucciones:

- Se le presentara 3 muestras codificadas de queso cabaña, galletas de soda y un vaso de agua.
- Limpie su paladar con galleta y agua al iniciar la evaluación, antes y después de degustar cada muestra.
- Realice su evaluación tomando las muestras de izquierda a derecha
- Marque con “x”, según su calificación de acuerdo a los atributos: color, textura, sabor,

Código de muestra: _____

1	2	3	4	5	6	7	8	9
me disgusta extremada mente	me disgu sta much o	me disgusta moderada mente	me disgu sta poco	Ni me gusta /Ni me disgu sta	Me gus ta poc o	Me gusta moderada mente	me gust a muc ho	me gusta extremada mente

Código de muestra: _____

Atributo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Apariencia									
Color									
Olor									
Sabor									
Textura									
Aceptación general									

Código de muestra: _____

Atributo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Apariencia									
Color									
Olor									
Sabor									
Textura									
Aceptación general									

Código de muestra: _____

Atributo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Apariencia									
Color									
Olor									
Sabor									
Textura									
Aceptación general									

Ordenar de mayor a menor preferencia:

Más preferida: 1. _____
2. _____
3. _____

Justifique su preferencia:

¡Muchas gracias por su ayuda!

Anexo 3. Sintaxis de las variables evaluadas.

Source	Enterobacterias	Coliformes Totales	Psicrotrofos
	Pr > F	Pr > F	Pr > F
trt	0.0600	0.0363	0.2829
blk	0.1181	0.2767	0.1650
día	0.1130	0.3743	0.0097
trt*día	0.8137	0.7143	1.0000

Anexo 4. Mínimos cuadrados para enterobacterias

trt	día	conteo LSMEAN	i/j	1	2	3	4	5	6	7	8	9
B	0	1.64	1		0.9025	0.124	0.287	0.421	0.639	0.487	0.229	0.539
B	8	1.72	2	0.903		0.153	0.238	0.356	0.728	0.415	0.188	0.463
B	16	2.72	3	0.124	0.1533		0.015	0.026	0.269	0.033	0.011	0.039
P	0	0.90	4	0.287	0.2383	0.015		0.788	0.134	0.703	0.883	0.643
P	8	1.08	5	0.421	0.3557	0.026	0.788		0.21	0.91	0.678	0.845
P	16	1.96	6	0.639	0.7283	0.269	0.134	0.21		0.251	0.103	0.285
SP	0	1.16	7	0.487	0.4151	0.033	0.703	0.91	0.251		0.598	0.934
SP	8	0.80	8	0.229	0.1882	0.011	0.883	0.678	0.103	0.598		0.542
SP	16	1.22	9	0.539	0.463	0.039	0.643	0.845	0.285	0.934	0.542	

Anexo 5. Mínimos cuadrados para coliformes totales

trt	día	conteo LSMEAN	i/j	1	2	3	4	5	6	7	8	9
B	0	2.57	1		0.3263	0.96	0.351	0.072	0.057	0.18	0.124	0.024
B	8	2.11	2	0.326		0.303	0.96	0.373	0.316	0.703	0.551	0.156
B	16	2.59	3	0.96	0.3031		0.326	0.065	0.052	0.166	0.114	0.021
P	0	2.13	4	0.351	0.9597	0.326		0.347	0.294	0.666	0.518	0.143
P	8	1.69	5	0.072	0.3726	0.065	0.347		0.908	0.605	0.762	0.575
P	16	1.64	6	0.057	0.3162	0.052	0.294	0.908		0.528	0.676	0.655
SP	0	1.93	7	0.18	0.7025	0.166	0.666	0.605	0.528		0.829	0.287
SP	8	1.83	8	0.124	0.5511	0.114	0.518	0.762	0.676	0.829		0.392
SP	16	1.43	9	0.024	0.1558	0.021	0.143	0.575	0.655	0.287	0.392	

Anexo 6. Mínimos cuadrados para psicrótrofos

trt	día	conteo LSMEAN	i/j	1	2	3	4	5	6	7	8	9
B	0	5.92	1		0.0881	0.097	0.727	0.167	0.21	0.356	0.393	0.436
B	8	6.93	2	0.088		0.958	0.045	0.719	0.616	0.014	0.362	0.325
B	16	6.90	3	0.097	0.9575		0.05	0.759	0.654	0.015	0.39	0.35
P	0	5.72	4	0.727	0.0453	0.05		0.09	0.116	0.56	0.235	0.265
P	8	6.72	5	0.167	0.7185	0.759	0.09		0.887	0.029	0.576	0.525
P	16	6.64	6	0.21	0.6162	0.654	0.116	0.887		0.039	0.675	0.62
SP	0	5.39	7	0.356	0.0138	0.015	0.56	0.029	0.039		0.086	0.099
SP	8	6.41	8	0.393	0.3621	0.39	0.235	0.576	0.675	0.086		0.939
SP	16	6.36	9	0.436	0.3246	0.35	0.265	0.525	0.62	0.099	0.939	

Anexo 7. Sintaxis del variable pH.

Variable	Pr > F
trt	0.0002
blk	<.0001
día	<.0001
trt*día	0.8999

Anexo 8. Sintaxis de las variables de la evaluación sensorial.

Variables	Apariencia	Color	olor	Sabor	Textura	Aceptacion General.
	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F	Pr > F
trt	0.2639	0.2196	0.0292	<.0001	0.0011	<.0001
día	0.9453	0.8864	0.0312	0.0004	0.2358	0.0596
panelista	<.0001	<.0001	<.0001	0.1419	0.0099	0.0002
trt*día	0.6470	0.6408	0.8824	0.2260	0.2715	0.3294