

**Validación del tratamiento térmico durante la
elaboración de queso para el control de
Salmonella enterica y *Listeria monocytogenes***

**Carmen Graciela Velásquez Moreno
Alvaro Gustavo García Lira**

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Octubre, 2014**

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Validación del tratamiento térmico durante la
elaboración de queso para el control de
Salmonella enterica y *Listeria monocytogenes***

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

Presentado por:

**Carmen Graciela Velásquez Moreno
Alvaro Gustavo García Lira**

Zamorano, Honduras
Octubre, 2014

Validación del tratamiento térmico durante la elaboración de queso para el control de *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes*.

Presentado por:

Carmen Graciela Velásquez Moreno
Alvaro Gustavo García Lira

Aprobado:

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Asesor Principal

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

Mayra Márquez, Ph.D.
Asesora

Raúl H. Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Validación del tratamiento térmico durante la elaboración de queso para el control de *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes*.

Carmen Graciela Velásquez Moreno
Alvaro Gustavo García Lira

Resumen: El queso es un producto lácteo elaborado mayormente de forma artesanal a base de leche cruda. En su preparación la cuajada es acidificada, fundida y estirada mediante un tratamiento térmico hasta alcanzar la textura deseada. El objetivo de este estudio consistió en asegurar la ausencia de *S. enterica* y *L. monocytogenes* en el proceso actual de cocción de la cuajada. Se caracterizó el proceso de elaboración de queso para comparar las temperaturas y tiempos alcanzados durante el proceso. La sobrevivencia de *S. enterica* y *L. monocytogenes* se evaluó a partir de cuajada inoculada con los patógenos en concentraciones de 10^6 UFC/g. Se elaboró queso a partir de cuajada inoculada y se determinó la concentración de microorganismos sobrevivientes después de la aplicación del tratamiento térmico. Se evaluaron las temperaturas de 48, 54, 60, 65 y 70 °C, con ocho puntos de muestreo a diferentes tiempos. Cada curva de muerte térmica se realizó por triplicado, estimando el valor D para cada temperatura y cada patógeno, mediante el uso de modelos de microbiología predictiva. Se determinó el valor Z a partir de los valores D obtenidos en cada temperatura utilizada. Mediante esta información se obtuvieron los tiempos más factibles de 39.68, 8.80 y 3.96 minutos correspondientes a 65, 70 y 75 °C respectivamente para la reducción de 7 logaritmos. La aplicación de 65 °C durante 39.68 minutos y 75 °C durante 3.96 minutos aseguran la eliminación de 5.58 ± 0.476 logaritmos de *S. enterica* y 6.36 ± 0.572 logaritmos para *L. monocytogenes* de la población bacteriana, lo cual se observó durante la validación del estudio.

Palabras clave: Curva de muerte térmica, microbiología predictiva, valor D, valor Z.

Abstract: Queso is a dairy product made mostly crafted shape from raw milk. During the preparation, the curd is acidified, melted and stretched by a heat treatment to obtain the desired texture. The goal of this study was to ensure the absence of *S. enterica* and *Listeria monocytogenes* in the current process of cooking the curd. The process of making queso was characterized to compare the temperatures and times achieved during the actual process. The survival of *S. enterica* and *Listeria monocytogenes* were evaluated from inoculated curd with these pathogens in concentrations of 10^6 CFU/g. Queso was made from this inoculated curd and the concentration of surviving microorganisms was determined after the application of heat treatment. Temperatures of 48, 54, 60, 65 and 70 °C, with eight sampling points were assessed at different times. Each thermal inactivation curve was performed by triplicate, estimating the D value for each temperature and each pathogen using predictive microbiology models. The Z value was determined from the D values obtained at each temperature used. Using this information the times of 39.68, 8.80 and 3.96 minutes were obtained as the most feasible times corresponding to 65, 70 and 75 °C respectively to reduce 7 logarithms. The applications of 65 °C for 39.68 minutes and 75 °C for 3.96 minutes ensure the elimination of 5.58 ± 0.476 logarithms of *S. enterica* and 6.36 ± 0.572 logarithms of *L. monocytogenes* from the bacterial population that was observed during the validation of the research.

Key words: D value, predictive microbiology, thermal inactivation curve, Z value.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
4. CONCLUSIONES	23
5. RECOMENDACIONES	24
6. LITERATURA CITADA.....	25
7. ANEXOS.....	28

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Resultados de análisis de propiedades químicas y físicas de la cuajada para la elaboración de queso.	9
2. Resistencia térmica (expresado como valor D en minutos) para <i>S. enterica</i> en cuajada a 48-70°C.	12
3. Resistencia térmica (expresado como valor D en minutos) para <i>L. monocytogenes</i> en cuajada a 48-70°C.	12
4. Valores Z para <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i> durante la cocción de cuajada. ...	17
5. Análisis de varianza de acuerdo a los valores D para cada temperatura por medio de SAS 9.4 (Statistical Analysis System) utilizando Tukey.	18
6. Resultados de validaciones para ambos patógenos, utilizando 3 diferentes tratamientos.	19
7. Concentración inicial de <i>Salmonella</i> y <i>Listeria</i> en cuajada inoculada.	19
8. Combinaciones de tiempo y temperatura para reducir la carga microbiana de <i>C. burnetii</i> en leche cruda.	21

Figuras	Página
1. Flujo de proceso para la elaboración de queso.	4
2. Flujo de proceso para la elaboración de cuajada.	5
3. Curva de muerte térmica de <i>Salmonella enterica</i>	11
4. Curva de muerte térmica de <i>Listeria monocytogenes</i>	11
5. Curva de muerte térmica de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i> durante la cocción de cuajada a 48°C.	13
6. Curva de muerte térmica de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i> durante la cocción de cuajada a 54°C.	14
7. Curva de muerte térmica de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i> durante la cocción de cuajada a 60°C.	15
8. Curva de muerte térmica de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i> durante la cocción de cuajada a 65 °C.	16
9. Curva de muerte térmica de <i>L. monocytogenes</i> y <i>S. enterica</i> durante la cocción de cuajada a 70 °C.	16

Anexos	Página
10. Valor Z de <i>Salmonella enterica</i> en la cocción de cuajada.....	28
11. Valor Z de <i>Listeria monocytogenes</i> en la cocción de cuajada.....	28
12. Valores D para <i>Salmonella enterica</i> en la cocción de cuajada para la primera repetición.	29
13. Valores D para <i>Salmonella enterica</i> en la cocción de cuajada para la segunda repetición.	29
14. Valores D para <i>Salmonella enterica</i> en la cocción de cuajada para la tercera repetición.	29
15. Valores D para <i>Listeria monocytogenes</i> en la cocción de cuajada para la primera repetición.	29
16. Valores D para <i>Listeria monocytogenes</i> en la cocción de cuajada para la segunda repetición.	30
17. Valores D para <i>Listeria monocytogenes</i> en la cocción de cuajada para la tercera repetición.	30
18. Valores Z para <i>Salmonella enterica</i> en cada repetición durante la cocción de cuajada.	30
19. Valores Z para <i>Listeria monocytogenes</i> en cada repetición durante la cocción de cuajada.	30
20. Tiempos en minutos empleados en cada tratamiento a diferentes temperaturas.	31
21. Recuentos de <i>S. enterica</i> obtenidos a partir de las tres repeticiones para cada temperatura.	31
22. Recuentos de <i>Listeria monocytogenes</i> obtenidos a partir de las tres repeticiones para cada temperatura.	32
23. Tratamientos térmicos recomendados a utilizar a los productores en la elaboración de queso en base a los modelos estadísticos establecidos en el experimento.	33

1. INTRODUCCIÓN

El quesillo es un producto lácteo elaborado mayormente de forma artesanal en varias regiones de Honduras, el cual es un queso tipo mozzarella que se produce con leche ácida, este se elabora a partir de cuajada, a la que se adiciona sal para aportar sabor y al mismo tiempo actúa como bacteriostático (Loma *et al.* 2000). En el proceso, la cuajada es calentada en seco para que esta logre estirarse sin romperse, este calentamiento significa un tratamiento térmico moderado, el que da como resultado un queso blando con un ligero sabor ácido y salado (Revilla y Chi 2002). Debido a que este tratamiento térmico no es equivalente a una pasteurización, este producto puede ser portador de microorganismos patógenos. Dentro de los microorganismos patógenos presentes se encuentra *S. enterica*, la cual es una bacteria Gram negativa que se encuentra principalmente en el lumen intestinal. *L. monocytogenes*, es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa y catalasa positiva. *Coxiella burnetii* es uno de los microorganismos patógenos presentes en la leche cruda, siendo una bacteria Gram negativa, la cual presenta un alto grado de peligrosidad por lo que puede ser utilizada únicamente en laboratorios de bioseguridad nivel 3 (Heizen y Samuel 2012). Las temperaturas necesarias para reducir un logaritmo la población de *C. burnetii* son de 63 °C por 4 minutos y 72 °C por 2 segundos (Cerf y Cordron 2006).

En la República de Honduras, se evaluó la equivalencia del proceso de elaboración de quesillo a la pasteurización. Se utilizó un tratamiento térmico a temperaturas de 65 y 73°C durante 15 a 20 minutos en el proceso de cocción de la cuajada para la elaboración de quesillo. A estas temperaturas, durante este tiempo se comprobó que los recuentos microbianos de *Salmonella.*, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y coliformes fecales, resultaron negativos (FAO/OMS 2005).

Se han reportado casos de listeriosis en Francia y California en 1983, 1985 y 1995 por consumos de quesos estilo mexicano y quesos frescos elaborados con leche cruda. Los quesos elaborados artesanalmente son propicios para crecimiento de *L. monocytogenes*, ya que se producen a base de leche cruda sin pasteurización, prácticas de manufactura inadecuadas y con alto contenido de humedad (Espinoza *et al.* 2004).

El quesillo, es un producto lácteo elaborado a partir del calentamiento de cuajada para obtener la elasticidad característica del mismo. Este calentamiento aplicado a la cuajada significa un tratamiento térmico en el proceso pero no cumple con los requisitos necesarios para ser equivalente a un proceso de pasteurización. No hay un proceso que asegure la ausencia de peligros microbiológicos, convirtiendo al quesillo en un producto que compromete la salud del consumidor.

En la actualidad existe una forma de elaboración de queso basada en un método completamente artesanal. Por esta razón, no existe un proceso específico y detallado con tiempos y temperaturas establecidas para su producción. Para estandarizar el proceso de elaboración, se deben encontrar las temperaturas y tiempos a los cuales se debe someter la cuajada para llegar a eliminar los microorganismos patógenos del producto. La importancia de caracterizar el flujo de proceso para el queso radica en que este posee una amplia elaboración en diferentes países y de manera artesanal en su mayoría, en los cuales no están establecidos las temperaturas y tiempos del proceso.

En California se descubrió que *C. burnetii* podía encontrarse aún en leche pasteurizada de acuerdo a los estándares mínimos recomendados. El director del Departamento de Salud Pública del estado de California, pensó en la posibilidad de realizar un estudio en el que se establecieran tiempos y temperaturas necesarias para la pasteurización y eliminar así *C. burnetii*. Se implementó el proyecto mediante un acuerdo entre la Universidad de California y el Servicio de Salud Pública de California, especificando que se debería determinar también, la curva de muerte térmica para *C. burnetii* en leche sin utilizar los rangos de temperatura y tiempo utilizados en el proceso de pasteurización comercial (Enright *et al.* 1957).

Dentro de los microorganismos patógenos asociados con los productos lácteos, se encuentra *S. enterica*. La posibilidad de sobrevivencia de *S. enterica*, depende de diferentes condiciones propias del producto. Condiciones como la técnica de producción de queso, pH, salinidad, nivel inicial de microorganismos y condiciones de almacenamiento, determinan el crecimiento de este microorganismo patógeno dentro del queso (Alemdar y Agaoglu 2008).

Durante el estudio se creó el flujo de proceso para la elaboración de queso como producto artesanal, estableciendo la temperatura y tiempo de cocción óptimo para asegurar la inocuidad del producto, garantizando la ausencia de *S. enterica* y *L. monocytogenes*. El propósito de este estudio consistió en elaborar una curva de muerte térmica para *S. enterica* y *L. monocytogenes*, las cuales a su vez fueron utilizadas para determinar la sobrevivencia de estos patógenos de acuerdo al proceso de cocción actual de la cuajada en la elaboración de queso. Por lo que el alcance este estudio se basó en los siguientes objetivos.

- Determinar la curva de mortalidad de *S. enterica* y *L. monocytogenes* de acuerdo al proceso de cocción actual de la cuajada en la elaboración de queso.
- Establecer temperatura y tiempo de cocción para garantizar la ausencia de *S. enterica* y *L. monocytogenes* en queso.
- Definir valores D y valor Z para *S. enterica* y *L. monocytogenes* durante el proceso de cocción de la cuajada.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Departamento de Agroindustria Alimentaria.

Investigación de campo. Para la caracterización del proceso de elaboración de quesillo, como producto lácteo artesanal, se realizó una investigación de campo en la quesería Walicy ubicada en Barrio Las Flores, 4ta avenida, municipio de El Paraíso, departamento de El Paraíso, Honduras. Durante la investigación se realizó el flujo de proceso para la elaboración de quesillo desde el recibo de la leche hasta el enfriamiento del producto final. En este flujo de proceso se tomaron en cuenta temperaturas, tiempos, equipos, materiales y las características de cada uno de estos (Figura 1).

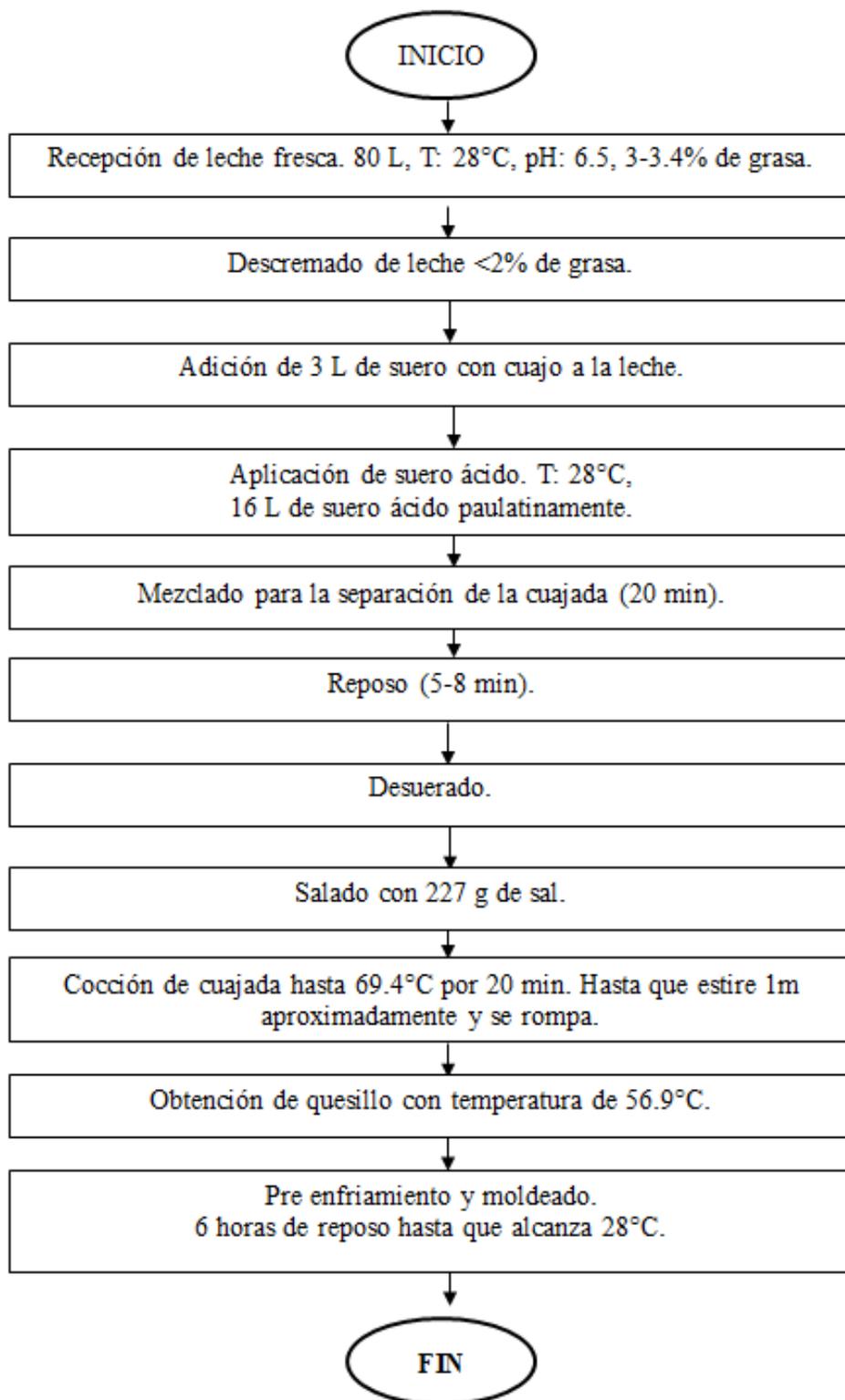


Figura 1. Flujo de proceso para la elaboración de quesillo.

Elaboración de cuajada. La cuajada se elaboró en la Planta de Lácteos de Zamorano bajo condiciones estériles, para la cual se utilizó leche, suero, cuajo y sal. Se utilizó leche cruda entera proveniente del establo de la Escuela Agrícola Panamericana, debido a su calidad estandarizada, porcentaje de grasa, porcentaje de ATECAL y ausencia de antibióticos. También se utilizó suero pasteurizado, el cual se obtuvo de la Planta de Lácteos de Zamorano, como subproducto a partir del procesamiento de quesos blancos, ya que no contenía ningún tipo de colorante; este suero se acidificó, manteniéndolo a temperatura ambiente durante 4 días para obtener un pH aproximado de 4.0. Se utilizó cuajo marca Christian Hansen en presentación de 10 g y sal común. Una vez elaborada la cuajada se trasladó al Laboratorio de Microbiología de Alimentos para llevar a cabo el estudio (Figura 2).

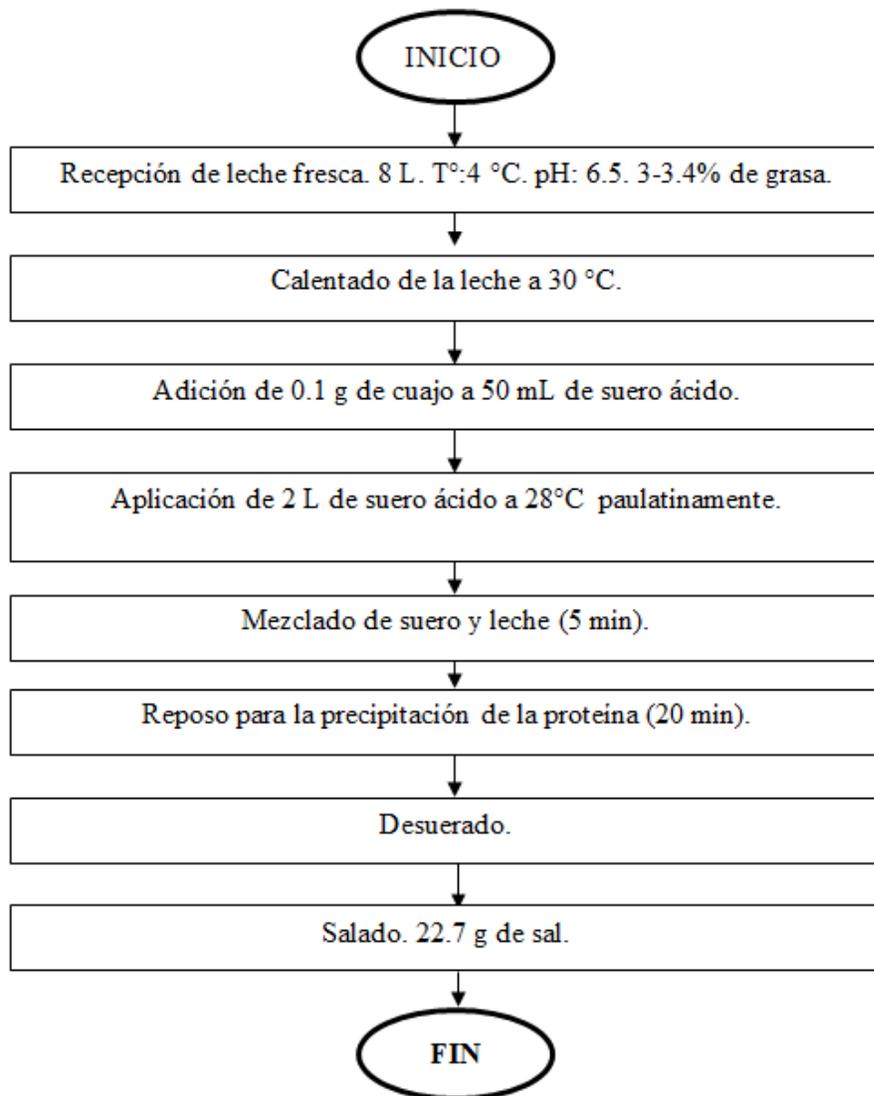


Figura 2. Flujo de proceso para la elaboración de cuajada.

Análisis de propiedades físico-químicas de la cuajada. Para conocer las características del medio en que las bacterias se encontrarían, se realizaron análisis físico-químicos a la cuajada. Para esto se midió humedad mediante el uso del método de determinación de humedad en alimentos sólidos utilizando el horno con aire forzado a 105 °C AOAC 952.08, actividad de agua con el uso del Aqualab® y análisis de contenido de grasa con el método de Babcock para alimentos sólidos. De igual manera, se midió el pH final de la cuajada utilizando un potenciómetro marca Thermo Scientific modelo Orion 5 Star. Los análisis de humedad y grasa se realizaron por duplicado, a diferencia de actividad de agua y pH los cuales se midieron por triplicado para obtener así un promedio de los resultados. Cada uno de estos análisis se realizó para cada uno de los lotes producidos de cuajada, según cada repetición.

Descripción de cepas. Para la preparación del inóculo, se utilizaron cepas de *Salmonella* y *Listeria*, entre ellas *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC® 14028™), *Salmonella enterica* serovar Poona (ATCC® BAA-1673™), *Listeria monocytogenes* (ATCC® 13932™) y *Listeria monocytogenes* (ATCC® 19112™). Estas cepas antes mencionadas, se obtuvieron mediante la compra a ATCC, la cual es un centro privado de recursos biológicos que se dedica a la distribución de microorganismos de referencia estándar, las cuales se mantuvieron en todo momento bajo condiciones adecuadas de refrigeración, para evitar deterioro y contaminación.

Una vez obtenidas las cepas, se procedió a la activación de estas, la cual se realizó mediante el uso de Caldo Soya Trypticasa con Extracto de Levadura en tubos, como medio de enriquecimiento para las colonias de cada una de las cepas, las cuales fueron incubadas a 37 °C por 24 horas. Luego de poseer tubos con cada una de las diferentes cepas, con un asa estéril se estrió una gota biconvexa proveniente de cada una de las cepas en Agar Soya Trypticasa para obtener colonias aisladas de cada una de ellas. Para finalizar la activación, se tomó una colonia aislada y se colocó nuevamente en Caldo Soya Trypticasa con Extracto de Levadura para enriquecer las colonias puras de cada uno de los cuatro tipos de cepas.

La cuajada se inoculó con una mezcla de las cuatro diferentes cepas, en concentraciones de 1% en relación al peso total de cuajada. Se realizó esta concentración de inóculo con el fin de obtener una cuajada con una carga bacteriana inicial de 7 logaritmos. La mezcla resultante de cuajada e inóculo, se homogeneizó mediante el mezclado constante durante ocho minutos, los cuales consistieron en dos minutos en forma circular en el sentido de las manecillas del reloj, dos minutos en sentido contrario, dos minutos en movimientos hacia arriba y hacia abajo y dos minutos más en movimientos hacia el lado derecho e izquierdo.

Una vez obtenida la cuajada inoculada, se elaboraron paquetes de 5 g de la misma. Esta se dispersó uniformemente en un área aproximada de 71 centímetros cuadrados para asegurar la aplicación del tratamiento térmico en toda la cuajada. Cada uno de estos paquetes fueron debidamente rotulados con la temperatura a recibir y el tiempo de exposición. Se realizaron muestras compuestas para cada uno de los diferentes tiempos en cada temperatura, con el fin de reducir la variabilidad tanto en peso como en el tratamiento térmico recibido de cada muestra individual.

Tratamientos térmicos. Se realizaron tres repeticiones del estudio, en las cuales se utilizó un lote de producción de cuajada diferente para cada una de ellas, siguiendo el mismo procedimiento de elaboración. Estas repeticiones se efectuaron bajo los mismos parámetros de tiempo y temperatura, y una concentración inicial de inóculo de 7 logaritmos. Para cada repetición se utilizaron cinco temperaturas (48, 54, 60, 65 y 70 °C), tomando muestras en 8 tiempos diferentes para cada una de las repeticiones se realizó una siembra de cuajada sin inóculo y sin tratamiento térmico, una siembra de leche y una siembra de suero para detectar y conocer la carga inicial de *S. enterica* y *L. monocytogenes* de los ingredientes lácteos y de la cuajada.

Los paquetes de cuajada inoculada fueron sometidos a las temperaturas correspondientes, mediante la completa inmersión de estos en un baño María ajustado a cada una de las temperaturas antes mencionadas. Se realizaron controles negativos, los cuales consistieron en cuajada sin inóculo, con la adición de 1% de agua destilada estéril, para igualar el aumento de líquido de la cuajada inoculada. Estos controles negativos se sometieron únicamente a las temperaturas de 60, 65 y 70 °C para los últimos tres tiempos correspondientes a estas temperaturas.

Posterior al tratamiento térmico, los paquetes fueron enfriados para el debido procesamiento de cada una de las muestras. Se colocaron 90 mL de Buffer de Fosfatos en una de las dos bolsas de la muestra compuesta y se recolectó toda la muestra de la bolsa, con el fin de trasladarla a la otra bolsa y obtener así 10 g de muestra en 90 mL de Buffer de Fosfatos. Cada una de las muestras se homogeneizó utilizando el Stomacher durante un minuto, dando como resultado la dilución 10^{-1} . A partir de esta dilución se realizaron más diluciones y se utilizó la técnica de siembra por superficie en Agar Soya Trypticase con doble capa de Agar XLD y Agar Oxford con Natamicina, para *S. enterica* y *L. monocytogenes* respectivamente. Los platos fueron incubados a 37°C por 24 horas para el posterior conteo de unidades formadoras de colonias de las bacterias sobrevivientes. Pasadas las 24 horas, se contaron las colonias que cumplieran con las características morfológicas correspondientes tanto a *S. enterica* como a *L. monocytogenes*. Color, tamaño, forma y elevación fueron algunas de las características morfológicas tomadas en cuenta para el conteo de colonias.

Estimación de Valor D. Se estimaron valores D para cada uno de los patógenos a las diferentes temperaturas utilizadas haciendo uso de ComBase, el cual es un programa en el que se generan modelos de microbiología predictiva. Se generó un modelo para cada una de las temperaturas, así como para cada uno de los patógenos, tanto para *S. enterica* como para *L. monocytogenes*. El modelo se construyó introduciendo los tiempos y los logaritmos de UFC de las bacterias sobrevivientes en cada uno de ellos, graficando los logaritmos contra el tiempo. A partir de esta curva de muerte térmica, se obtuvo la pendiente, el ajuste del modelo y el error de cada una de ellas. Para estimar el valor D, se calculó el recíproco de la pendiente para conocer los minutos necesarios para reducir a un logaritmo de la carga bacteriana inicial.

Análisis estadístico. Se realizó un análisis estadístico con un diseño completo al azar con un arreglo factorial de 2×2 utilizando una separación de medias Tukey a los valores D obtenidos a partir de las curvas de muerte térmica para cada una de las temperaturas (48,

54, 60, 65 y 70 °C) comparando la diferencia entre *L. monocytogenes* y *S. enterica*. Los datos utilizados fueron los valores D obtenidos de manera individual para cada repetición, con nivel de significancia igual al 5%. El análisis estadístico se llevó a cabo con el objetivo de determinar la diferencia entre los valores D a la misma temperatura para cada bacteria, con el fin de saber si es necesario aplicar un tratamiento térmico diferente para cada bacteria, o si se puede aplicar un valor D igual para las dos bacterias.

Determinación de Valor Z. Al obtener los valores D en minutos para cada temperatura, se elaboró una gráfica utilizando las cinco temperaturas contra el logaritmo del valor D correspondiente a cada una de ellas. Para determinar el valor Z, se calculó el recíproco de la pendiente de la curva resultante para conocer cuántos grados centígrados aumentar al proceso, para reducir en un logaritmo el tiempo necesario para la eliminación a un logaritmo de la población bacteriana.

Validación de resultados. Se realizaron validaciones utilizando 65 y 70°C debido a que fueron las únicas temperaturas que presentaron Valores D viables en el proceso de elaboración de queso, los cuales resultaron en 39.68 y 8.80 minutos respectivamente para la reducción de 7 Log UFC/g de cada microorganismo. Estos datos fueron obtenidos mediante el modelo elaborado a partir de *L. monocytogenes* debido a que esta bacteria es más resistente a tratamientos térmicos que *S. enterica*. Se utilizaron 400 g de cuajada, de los cuales se usaron 100 g de cuajada sin inóculo como control y se utilizaron 300 g de cuajada la cual se inoculó con 1% de la mezcla de ambos patógenos para obtener una carga inicial de 5.58 ± 0.476 Log UFC/g de *S. enterica* y 6.36 ± 0.572 Log UFC/g para *L. monocytogenes*. Se elaboraron cuatro paquetes con cuajada, uno para validar D_{65} de 39.68 minutos, uno para D_{70} de 8.80 minutos, otro para validar valor Z de 10.83 °C que resultó en el tratamiento térmico de 75.8 °C durante 3.96 minutos y uno como control a 65 °C durante 39.68 minutos. Mediante el uso de Baños María, cada uno de los paquetes fue sometido a los parámetros de temperatura y tiempo correspondiente de cada validación. Se tomaron 25 g de cada uno de los quesillos (control, queso a 65°C, queso a 70°C y queso a 75.8 °C) y se colocaron en 225 mL de Caldo de Pre enriquecimiento Universal, esto debido a que debe haber ausencia de ambos patógenos en 25 g de producto (Reglamento Técnico Centroamericano 2009) y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se estirió en Agar XLD y Agar Oxford con Natamicina, una gota biconvexa de cada una de las muestras de queso para asegurar la ausencia de *S. enterica*, *L. monocytogenes* y la efectividad de cada tratamiento.

Se evaluó *Coxiella burnetii* mediante la recaudación de información confiable sobre los valores D de esta bacteria, en investigaciones realizadas en queso artesanal o productos lácteos similares. Con este valor, mediante un modelo matemático se calculó la sobrevivencia de *Coxiella burnetii* entre las temperaturas de 65 y 70 °C.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción de la cuajada. Las propiedades que muestra la cuajada para elaborar queso denotan que este es un producto que tiene alto contenido de grasa, un pH ligeramente ácido, posee una actividad de agua alta y un nivel humedad media (Cuadro 1). El contenido de sal aplicado a la cuajada fue equivalente al 0.28% de la cantidad de leche utilizada.

Cuadro 1. Resultados de análisis de propiedades químicas y físicas de la cuajada para la elaboración de queso.

	% Grasa \pm DE	pH Cuajada \pm DE	A_w \pm DE	% Humedad \pm DE
Cuajada	25.13 \pm 0.250	5.72 \pm 0.061	0.98 \pm 0.001	54.62 \pm 2.784
CV (%)	1	1	0.1	5

DE: Desviación estándar.

CV: Coeficiente de variación

La cantidad de grasa en el queso se generó por utilizar leche entera cruda proveniente del establo de ordeño en Zamorano, la cual tenía un promedio de 3.6% de grasa, que entra a la planta de lácteos para ser procesada. Al utilizar una leche entera provoca que al final se obtenga un porcentaje de grasa de 25.13 \pm 0.250% en el queso final elaborado (cuadro 1). Es importante mencionar que en el proceso artesanal de elaboración de queso se utiliza leche semi-descremada, que tiene un porcentaje de grasa de 1.5 a 2%, con el fin de obtener un ingreso adicional en la elaboración de queso.

El pH y la actividad de agua presentes en la cuajada para la elaboración de queso son ligeramente ácido (5.72 \pm 0.061) y relativamente alto (0.98 \pm 0.001), respectivamente. El rango de pH para *L. monocytogenes* oscila entre 5.6-9.8 y para *S. enterica* entre 4.7-7, sin embargo la actividad de agua para su crecimiento óptimo debe de ser mayor a 0.93 (Mattick *et al.* 2000). Esto significa que las propiedades de la cuajada están entre los rangos ideales de crecimiento de estas bacterias, provocando que las bacterias no generen resistencia (Archer *et al.* 1998). Sin embargo la humedad presente en la cuajada no afecta significativamente en la resistencia de las bacterias a tratamientos térmicos, por ende, tampoco afecta en la determinación de los valores D y Z de la cuajada utilizada en la elaboración de queso.

La resistencia de las bacterias a tratamientos térmicos se ve influenciada debido a que estas entran en condiciones adversas a su crecimiento y desarrollo. Cuando una bacteria sale de su zona ideal genera la resistencia hacia los tratamientos térmicos, debido a que las

bacterias generan mecanismos de defensa para situaciones adversas (Moats *et al.* 1971). Para *S. enterica* y *L. monocytogenes* las situaciones adversas en un alimento se deben al tener pH ácidos debajo de 4.6 (Farber y Pagotto 1992) y al presentar actividades de agua menores a 0.93 (Hsieh *et al.* 1975). Esta resistencia de las bacterias afecta los valores D y Z presentados por el alimento, aumentando significativamente estos valores, teniendo que emplear tratamientos térmicos con mayor temperatura o con mayor tiempo (Cole *et al.* 1993).

Debido a que la cuajada se encuentra entre el rango ideal para pH y actividad de agua, las bacterias no entran en su mecanismo de defensa, evitando la generación de resistencia. Con los valores presentes en la cuajada se determinó que el pH y actividad de agua no afecta en los valores D y Z de la cuajada para la elaboración de quesillo, debido a que no incitan a las bacterias a generar resistencia (Cole *et al.* 1993), lo que ayudaría a obtener que estos valores no sean elevados. Sin embargo, la cantidad de grasa que posee la cuajada para la elaboración de quesillo (Cuadro 1) si afecta los valores D y Z, ocasionado que estos valores presenten un incremento, siendo la grasa el único atributo que aumenta la temperatura y el tiempo necesario para controlar las bacterias en el procesamiento de elaboración de quesillo (Kwast y Verrips 1982). Es importante mencionar que durante el experimento no se recuperaron células de *Listeria monocytogenes* ni *Salmonella entérica* de la leche cruda, suero o cuajada empleada en el estudio, lo que ayuda a no afectar los resultados finales.

Estimación de valor D. A partir de la sobrevivencia de las bacterias al tratamiento térmico aplicado, se encontraron los valores D para cada una de las temperaturas utilizadas. La temperatura presenta una relación inversamente proporcional al tiempo de exposición tal como se observa en los cuadros 2 y 3. El valor D es expresado como el tiempo necesario en minutos para reducir a un logaritmo la concentración bacteriana del producto (Olizewski *et al.* 2007).

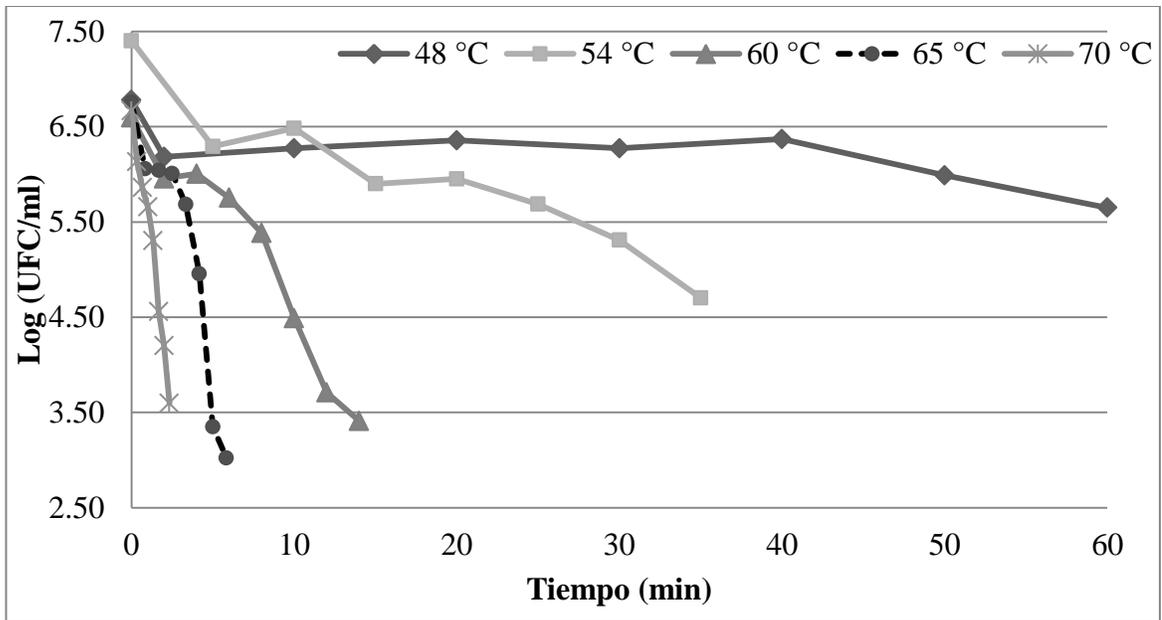


Figura 3. Curva de muerte térmica de *Salmonella enterica*

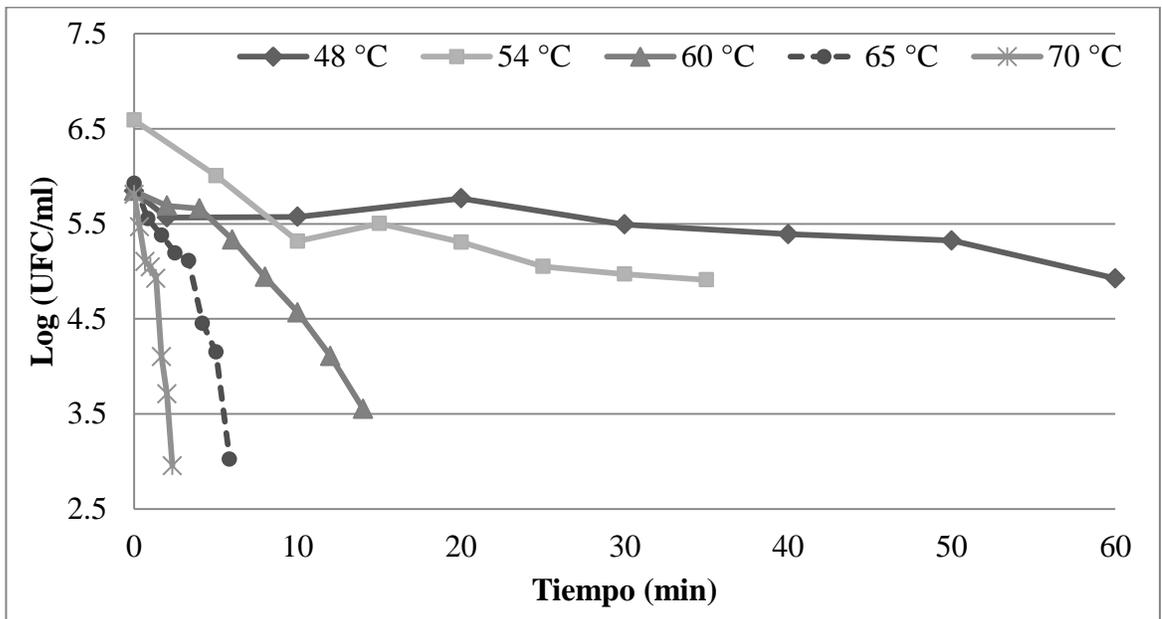


Figura 4. Curva de muerte térmica de *Listeria monocytogenes*

Mediante el uso del programa ComBase, se observó que las bacterias sobrevivientes al tratamiento térmico presentaron un comportamiento lineal ya que entre más tiempo la cuajada permaneció expuesta a la temperatura de cocción, menor resultó ser la población sobreviviente al tratamiento térmico (Cuadro 2 y 3). Al usar el programa predictivo ComBase, se ingresan los resultados de sobrevivencia de las bacterias al tratamiento térmico de las tres repeticiones a la vez. Debido a que la carga inicial era de 6.840 ± 0.323 Log UFC/g para *S. enterica* y 6.002 ± 0.332 Log UFC/g para *L. monocytogenes* (Figura 3

y 4), el ajuste a un modelo de regresión lineal podría verse afectado obteniendo un R^2 bajo (Nassib *et al.* 2003). El programa ComBase proyecta una distribución de modelo lineal, a la cual deben ajustarse los resultados distribuidos en la gráfica, los cuales presentan una distribución lineal similar pero en diferentes magnitudes, variando por los logaritmos de la concentración inicial a la que se dio cada tratamiento térmico. Debido a estas variaciones, se utiliza el ajuste del modelo obtenido a partir del promedio resultante de las tres repeticiones para cada patógeno (Figura 3 y 4).

Cuadro 2. Resistencia térmica (expresado como valor D en minutos) para *S. enterica* en cuajada a 48-70°C.

Temperatura (°C)	Pendiente	Valor D (min)	R^2
48	-0.0109	91.74±0.0056	0.4840
54	-0.0623	16.05±0.0148	0.8771
60	-0.2222	4.50±0.0327	0.9236
65	-0.6182	1.62±0.1098	0.8355
70	-1.2427	0.80±0.1653	0.9270

Al utilizar 48°C para eliminar a un logaritmo la población inicial, se obtuvo el valor D de 91.74 ± 0.0056 minutos con un ajuste del modelo de 0.48. Este valor D, se refiere al tiempo necesario en minutos para reducir a un logaritmo la población bacteriana inicial. Para la temperatura de 54 °C, se obtuvo un valor D de 16.05 ± 0.0148 minutos con un ajuste de 0.88. En caso de utilizar 60 °C, es necesario aplicar esta temperatura durante 4.50 ± 0.0327 minutos, el cual posee un ajuste de 0.92 para lograr reducir a un logaritmo la población bacteriana. Para 65 y 70 °C, las cuales son las temperaturas que se acercan más a las temperaturas que se usan actualmente en la elaboración de quesillo, según los resultados, se necesita de 1.62 ± 0.1098 minutos y 0.80 ± 0.1653 minutos respectivamente, con un ajuste de 0.84 y 0.93 para cada una de las temperaturas.

Cuadro 3. Resistencia térmica (expresado como valor D en minutos) para *L. monocytogenes* en cuajada a 48-70 °C.

Temperatura (°C)	Pendiente	Valor D (min)	R^2
48	-0.0104	96.15±0.0048	0.7200
54	-0.0427	23.42±0.0089	0.7800
60	-0.1644	6.08±0.0215	0.8710
65	-0.4314	2.32±0.0850	0.9330
70	-1.1173	0.90±0.1074	0.8670

Un alimento que posee una cantidad de grasa alta tiene un efecto positivo a la resistencia de las bacterias, lo que aumenta la cantidad de calor suministrado al alimento para poder controlar la bacteria en el alimento. El mismo caso sucede en la cuajada para elaborar

quesillo con *S. enterica* y *L. monocytogenes*, en donde por tener una cantidad de grasa de 22-23%, las bacterias presentes obtienen un aumento en la resistencia a temperaturas (Senhaji 1997). Esto provoca que el tiempo necesario para poder eliminar las bacterias en la cuajada sea más alto en comparación con alimentos de contenido de grasa más bajo, como lo es la leche entera o yogur (Line *et al.* 1991). Por lo que los valores D y Z en alimentos con alto contenido de grasa son mayores en relación a alimentos con menor cantidad de grasa (Senhaji 1997).

En el cuadro 3 se presentan los resultados referentes a los valores D obtenidos según el uso de cinco diferentes temperaturas, para inactivar *L. monocytogenes*. Para 48 °C, se obtuvo un valor D de 96.15 ± 0.0048 minutos con un ajuste de modelo de 0.72. Con el uso de 54 °C, se necesitan 23.4192 ± 0.0089 minutos para reducir a un logaritmo la población bacteriana, con un ajuste de modelo de 0.78. Para 60 °C, es necesario utilizar 6.08 ± 0.02 minutos con un ajuste de modelo de 0.87.

Según un estudio realizado por la FAO y la OMS en la República de Honduras en el 2005 para evaluar la equivalencia del proceso de elaboración de quesillo a la pasteurización, durante la elaboración de este producto, se utilizan temperaturas entre un rango de 65 a 73 °C. En base a lo anterior, las temperaturas del estudio que más se asemejan a las temperaturas actualmente utilizadas por los productores de quesillo resultan ser 65 y 70 °C, las cuales necesitan de 2.31 ± 0.0850 y 0.89 ± 0.1074 minutos respectivamente, cada una con un ajuste de modelo de 0.51 y 0.82 para 65 y 70 °C.

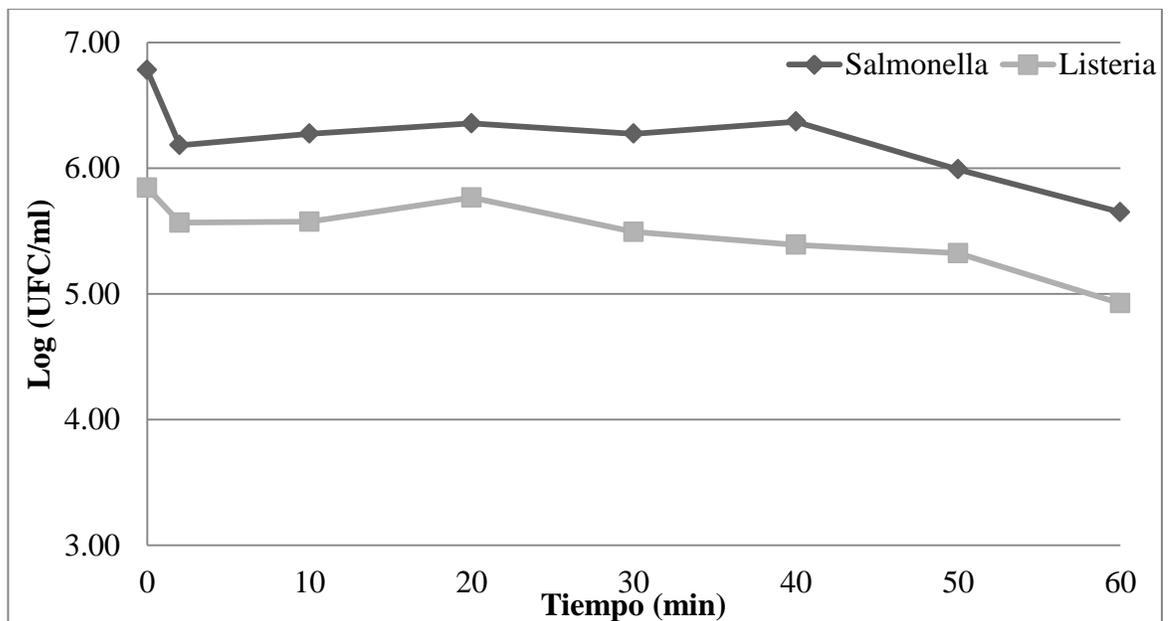


Figura 5. Curva de muerte térmica de *L. monocytogenes* y *S. enterica* durante la cocción de cuajada a 48°C.

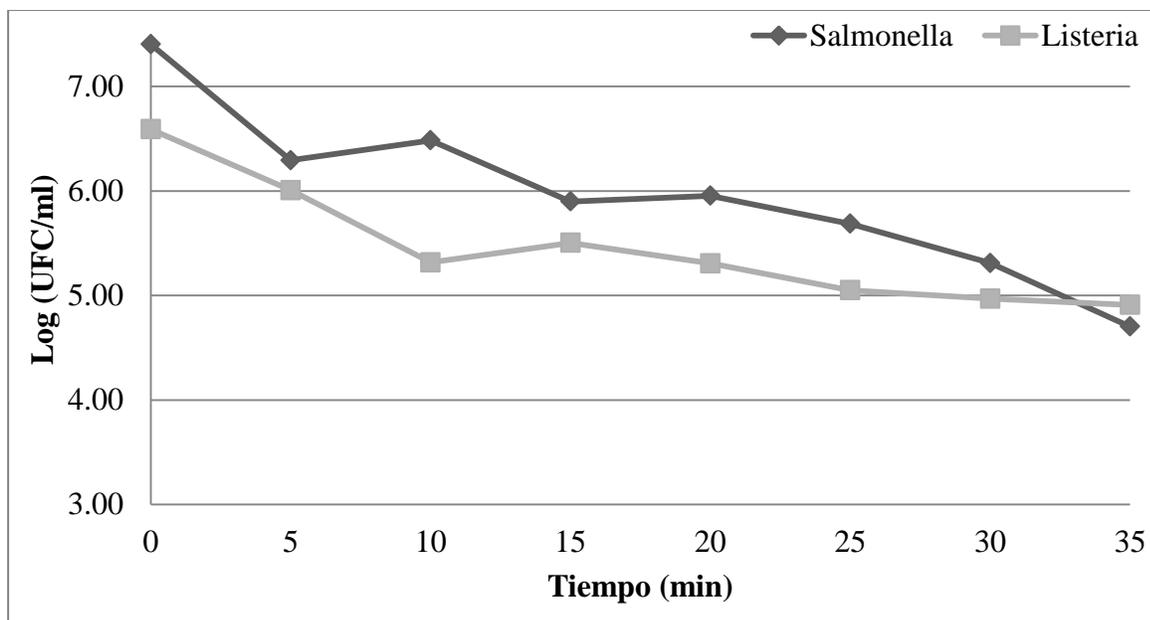


Figura 6. Curva de muerte térmica de *L. monocytogenes* y *S. enterica* durante la cocción de cuajada a 54°C.

L. monocytogenes, consiste en una de las bacterias más peligrosas debido a que es resistente a diferentes características del medio donde se encuentra, tales como bajo pH (menores a 4), altas concentraciones de sal (12-16%), temperaturas de refrigeración hasta -1 °C (Elika 2013) y sobre todo a la incorrecta pasteurización (Espinoza *et al.* 2004). Se han obtenido casos de listeriosis en California, Francia y Massachusetts debido al consumo de quesos elaborados a base de leche cruda. Un estudio realizado en Perú demostró que la presencia de *L. monocytogenes* en quesos artesanales se da al usar leche contaminada (Kozak *et al.* 1996). Entre más grasa tenga el producto, mayor será la sobrevivencia de *L. monocytogenes*, debido a que esta bacteria se protege dentro de los glóbulos de grasa, al igual que la cantidad de minerales presentes en la leche entera.

L. monocytogenes presenta mayor resistencia a altas temperaturas y condiciones características del sustrato en el que se encuentra (Breand *et al.* 1998). En el caso del queso elaborado artesanalmente, se utilizó leche entera por lo que el contenido de grasa favoreció la resistencia de esta bacteria a los diferentes tratamientos térmicos. Para obtener el tiempo necesario para reducir o eliminar completamente la carga microbiana durante la cocción de la cuajada, se utilizaron en los datos obtenidos a partir de *L. monocytogenes* ya que esta bacteria requiere un mayor tiempo de exposición a temperaturas de cocción (Neidhardt 1987) en comparación a los resultados de tiempo obtenidos a partir de *S. enterica* tal como se observa en los cuadros 2 y 3.

A temperaturas menores de 60 °C tanto *S. enterica* como *L. monocytogenes* presentan similar comportamiento al tratamiento térmico (Figura 5, 6 y Cuadro 5), debido a que existe mortalidad de las bacterias, pero se requiere un mayor tiempo de exposición al tratamiento, para lograr reducir a un logaritmo la población bacteriana utilizando una temperatura de 48 °C durante 60 minutos. Sin embargo a la temperatura de 54 °C no

existe diferencia significativa entre *S. enterica* y *L. monocytogenes*, obteniendo reducción de tres logaritmos para *Salmonella* y casi dos para *Listeria* en 35 minutos.

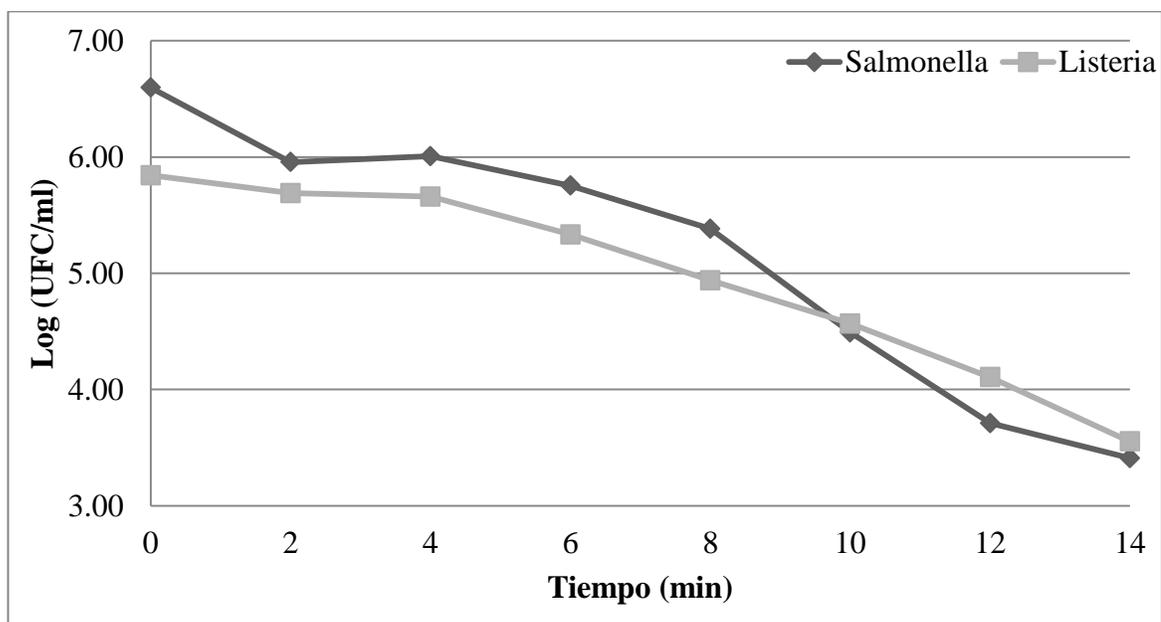


Figura 7. Curva de muerte térmica de *L. monocytogenes* y *S. enterica* durante la cocción de cuajada a 60°C.

Debido a que la cuajada presentó una población inicial de 7 logaritmos, cada uno de los valores D, se multiplicó por 7 y se ajustó con el error brindado en ComBase para cada curva. Estos tiempos resultaron ser los tiempos reales para eliminar 7 logaritmos de la cuajada, los cuales se evaluaron, comparándolos con los tiempos actuales de cocción de la cuajada de manera que sean factibles para los productores ya que es un proceso que no dura más de 50 minutos a temperaturas de calentamiento (Lorentzen *et al.* 2010). Por otro lado, es necesario que la temperatura sea lo suficientemente alta para lograr que la cuajada se funda adecuadamente.

Para conocer las temperaturas y tiempos a evaluar, se utilizaron los resultados para *L. monocytogenes*, debido al buen ajuste del modelo ya que esta bacteria posee una mayor resistencia a temperaturas que *S. enterica* (Andino y Castillo 2010). Debido a esta resistencia la reducción logarítmica usando el tratamiento térmico de 60 °C (Figura 7) *L. monocytogenes* se redujo 2.5 logaritmos en 14 minutos mientras que *S. enterica* al tener menor resistencia disminuyó más de tres logaritmos.

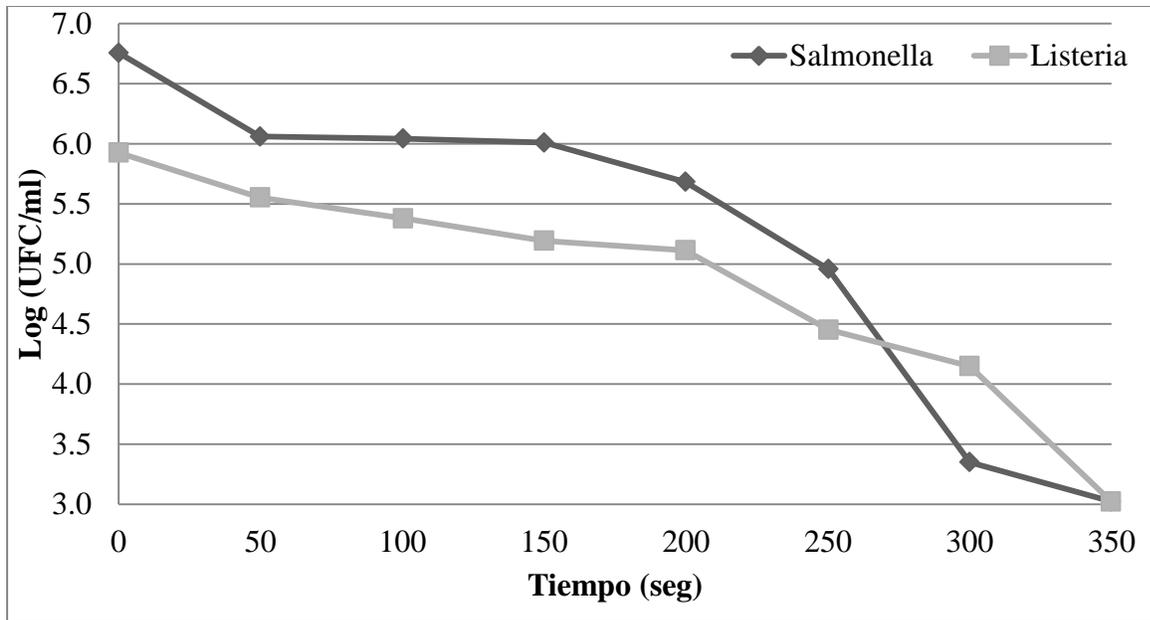


Figura 8. Curva de muerte térmica de *L. monocytogenes* y *S. enterica* durante la cocción de cuajada a 65 °C.

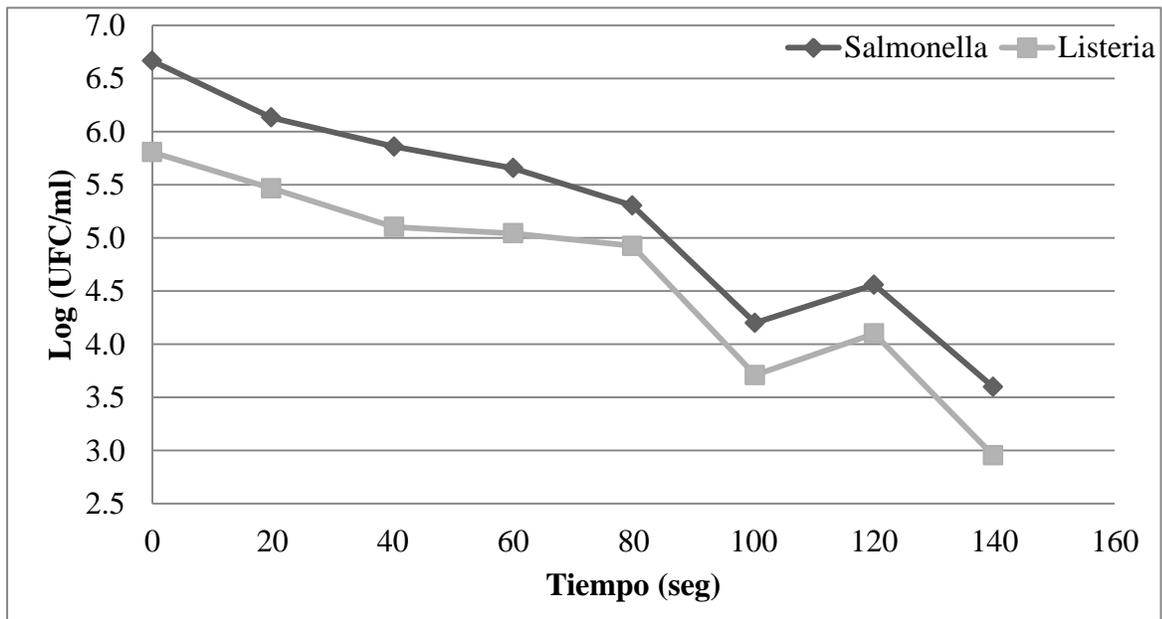


Figura 9. Curva de muerte térmica de *L. monocytogenes* y *S. enterica* durante la cocción de cuajada a 70 °C.

Basados en *L. monocytogenes* para 65 y 70 °C, cada uno de estos tratamientos térmicos con un ajuste de modelo de 0.93 y 0.87 poseen un error de 0.0850 y 0.1074 minutos respectivamente. Al obtener la pendiente, se restan tres desviaciones, para asegurar que el resultado funcione al tomar en cuenta la desviación que este tratamiento presenta. Una vez obtenido el valor resultante de la pendiente menos tres desviaciones, se calcula el

recíproco del mismo y el resultado indicará el tiempo necesario para reducir en un logaritmo la población microbiana, el cual se multiplica por la cantidad de logaritmos que se busca eliminar. En el caso de 70 °C, la pendiente de la curva de muerte térmica de *L. monocytogenes* resultó ser 1.1173, menos 3 desviaciones, se obtuvo un resultado de 1.1764. El recíproco de este valor es de 5.67 minutos, lo cual reducirá a un logaritmo de la población bacteriana. Dado que durante el estudio se trabajó con cuajada inoculada con *L. monocytogenes* a un nivel de 5-6 logaritmos, los 5.67 minutos se multiplicaron por 7 para asegurar la completa eliminación de 5-6 logaritmos en el quesillo durante la cocción de la cuajada.

La cocción de la cuajada para la elaboración de quesillo, es uno de los parámetros más importantes debido a que la temperatura usada oscila entre 65 a 73°C durante 15 a 20 minutos (FAO/OMS 2005), al utilizar una temperatura mínima de 65°C durante 15 minutos, no habría una adecuada reducción o eliminación de la carga microbiana, ya que para poder eliminar 5-6 logaritmos de estos patógenos, debe utilizarse esta temperatura durante 39.68 minutos, lo que hace a este tratamiento térmico ineficiente en términos de inocuidad en el caso de contar con una cuajada con carga bacteriana inicial de 5-6 logaritmos. Al utilizar 73°C durante 20 minutos, se asegura la inocuidad del producto, ya que según los resultados obtenidos, es necesario utilizar 70°C durante 8.80 minutos para eliminar 5-6 logaritmos de la población bacteriana, por consecuente al utilizar una mayor temperatura, durante un tiempo más prolongado se cumple con el mínimo necesario para eliminar 5-6 logaritmos.

Determinación de valor Z. El valor Z se obtuvo mediante la gráfica de los logaritmos de los valores D en minutos en el eje Y, en relación con la temperatura en grados centígrados en el eje X. En este caso el recíproco de la pendiente de la gráfica resultó ser el valor Z expresado en grados centígrados.

Se define el valor Z como la temperatura que hay que aumentar a un tratamiento térmico para reducir a un logaritmo el tiempo necesario para dicho tratamiento. Debido a que los valores Z de las bacterias son similares, se puede tomar un valor Z general para los dos. A partir de los valores D obtenidos que muestran la sobrevivencia de las bacterias a un tratamiento térmico se obtuvo que el valor Z en la cuajada para la elaboración de quesillo es de 10.7-10.9 °C (Cuadro 4).

Cuadro 4. Valores Z para *L. monocytogenes* y *S. enterica* durante la cocción de cuajada.

Patógeno	Pendiente	Valor Z (°C)
<i>S. enterica</i>	-0.0934	10.7066
<i>L. monocytogenes</i>	-0.0923	10.8342

Aplicando el valor Z a los tratamientos se obtiene que si a una temperatura de 65 °C se necesita emplear 39.68 minutos de esta temperatura para eliminar 5-6 logaritmos la carga bacteriana; con el valor Z obtenido se debe aplicar una temperatura de 75.8 °C con un tiempo de 3.96 minutos. De acuerdo a los procedimientos realizados en la elaboración de

quesillo en Honduras se obtuvo que las temperaturas utilizadas fueran de 65 a 73 °C durante 15 a 20 minutos (FAO/OMS 2005). Con esto se asegura que durante el proceso de fundición de la cuajada se eliminan las bacterias de *S. enterica* y *L. monocytogenes* en el quesillo.

Cuadro 5. Análisis de varianza de acuerdo a los valores D para cada temperatura por medio de SAS 9.4 (Statistical Analysis System) utilizando Tukey.

TRT	Bacteria	Mean (min)	Tukey Grouping	Pr > F
D ₄₈	<i>Listeria</i>	94.010±10.52	A	0.9338
	<i>Salmonella</i>	92.380±6.86	A	
D ₅₄	<i>Listeria</i>	28.635±17.29	A	0.2762
	<i>Salmonella</i>	16.051±0.44	A	
D ₆₀	<i>Listeria</i>	6.529±1.94	A	0.1406
	<i>Salmonella</i>	4.134±1.16	A	
D ₆₅	<i>Listeria</i>	2.429±0.68	A	0.2136
	<i>Salmonella</i>	1.710±0.50	A	
D ₇₀	<i>Listeria</i>	0.902±0.09	A	0.4826
	<i>Salmonella</i>	0.825±0.15	A	

D₄₈: valor D a 48 °C. D₅₄: Valor D a 54 °C. D₆₀: Valor D a 60 °C. D₆₅: Valor D a 65 °C. D₇₀: Valor D a 70 °C.

En la determinación de la sobrevivencia de las bacterias de *S. enterica* y *L. monocytogenes* se obtuvieron valores D para cada una de ellas, de acuerdo a las diferentes temperaturas de los tratamientos que van de 48 a 70 °C. Estos valores D no presentaron diferencias estadísticamente significativas (P>0.05). de acuerdo a cada temperatura utilizada en cada uno de los tratamientos (Cuadro 5). Esto indica que el comportamiento de las bacterias ante los tratamientos térmicos empleados en la cuajada para elaboración de quesillo es similar. Esto ayuda de tal manera que para aplicar un tratamiento térmico de acuerdo a los rangos de temperatura establecidos durante el proceso de elaboración de quesillo, se puede tomar en cuenta tanto los valores de *S. enterica* como los de *L. monocytogenes*.

Validación de resultados. Se realizaron 8 validaciones para 65, 70 y 75°C, este último como aplicación del valor Z a 65 °C para lograr corroborar la veracidad de los resultados obtenidos mediante el estudio. Se realizó un control utilizando el tratamiento de 65°C, para asegurar que la cuajada sin inóculo, se encontraba libre de *S. enterica* y *L. monocytogenes* y que estos recuentos iniciales afectaran los resultados finales (Cuadro 6).

Cuadro 6. Resultados de validaciones para ambos patógenos, utilizando 3 diferentes tratamientos.

Validación	Temperatura	Bacteria			
		<i>S. enterica</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
		Log UFC/g*	Resultado	Log UFC/g*	Resultado
1	Control		-		-
	65 °C	5	-	7.25	-
	70 °C		+		-
	75 °C		-		-
Control	-		-		
2	65 °C	5.5	-	6.17	-
	70 °C		+		-
	75 °C		+		-
	Control		-		-
3	65 °C	5.86	+	6.70	-
	70 °C		+		-
	75 °C		+		-
	Control		-		-
4	65 °C	5.95	-	6.12	-
	70 °C		+		-
	75 °C		-		-
	Control		-		-
5	65 °C	5.2	-	5.56	-
	70 °C		+		-
	75 °C		+		-
	Control		-		-
6	70 °C	6.46	+	6.38	-
	75 °C		+		-
7	Control		-		NA
	70 °C	5.42	+	NA	NA
	75 °C		-		NA
Control	-		NA		
8	70 °C	5.28	+	NA	NA
	75 °C		-		NA
	Control		-		NA

*: Conteo de carga inicial

-: Ausencia del patógeno.

+: Presencia del patógeno.

NA: No se aplicó tratamiento.

Cuadro 7. Concentración inicial de *Salmonella* y *Listeria* en cuajada inoculada.

	<i>S. enterica</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Log UFC	5.58 ± 0.476	6.36 ± 0.572
Coefficiente de Variación	8.53%	8.99%

Al realizar la validación para 65 °C durante 39.68 minutos, luego de la correspondiente incubación durante 24 horas, se encontró ausencia de ambos patógenos en 25g de quesillo, lo cual está definido en el Reglamento Técnico Centroamericano. La cuajada se inóculo, de tal manera que la población bacteriana inicial fue de 5.58 ± 0.476 y 6.36 ± 0.572 logaritmos de *S. enterica* y *L. monocytogenes*, respectivamente (Cuadro 7). Al realizar esta validación en repetidas ocasiones, los platos resultaron ser negativos después del tratamiento, es decir que no se encontró presencia de *S. enterica* ni *L. monocytogenes*, asegurando la reducción de la población inicial de estas bacterias. Estas observaciones vuelven válidos los resultados de que al utilizar 65°C durante 39.68 minutos se obtiene un quesillo completamente inocuo en el que se eliminan 5.58 ± 0.476 y 6.36 ± 0.572 logaritmos de la carga bacteriana referente a *S. enterica* y *L. monocytogenes* respectivamente que se pueda encontrar en la cuajada.

A pesar de que los tratamientos térmicos se establecieron mediante cálculos realizados para la eliminación de 7 logaritmos, las validaciones mostraron que al poseer una cuajada con una carga inicial mayor a 5 logaritmos de *S. enterica*, esta no se elimina completamente, e igualmente se observó que a pesar de ser *L. monocytogenes* la bacteria con mayor resistencia a tratamiento térmico, se eliminó antes que *S. enterica*, mostrándose esta última, más resistente al tratamiento térmico de 70 °C.

Durante la ejecución del estudio se obtuvieron los valores D a diferentes temperaturas entre las dos bacterias, tanto para *S. enterica* y *L. monocytogenes*, los cuales a medida que se aumentaba la temperatura no presentaron diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$). Esto indica que el comportamiento de las bacterias ante el tratamiento térmico empleado en la elaboración de quesillo es similar. Esto ayuda de tal manera que para aplicar un tratamiento térmico de acuerdo a los rangos de temperatura establecidos durante el estudio, se pueden tomar en cuenta tanto los valores de *S. enterica* como los de *L. monocytogenes*.

De acuerdo a estos datos es importante mencionar que estos tratamientos fueron para eliminar 5-6 logaritmos la carga microbiana en la cuajada, sin embargo, la carga microbiana de la cuajada en la elaboración de quesillo no presenta concentraciones tan grandes de estas bacterias, por lo que con los tratamientos que lleva el procedimiento de elaboración de quesillo, se lograría eliminar esta carga microbiana en caso de que existiera alguna.

Durante la elaboración de quesillo, los productores someten la cuajada a un tratamiento térmico que permita el estiramiento de la misma hasta más de un metro de altura sin romperse y que luzca brillante, finalizando el tratamiento con una cuajada a 70°C (Revilla y Chi 2002). Estos factores son parámetros que los productores toman en cuenta para la calidad del producto ya que el estiramiento es una de las principales características de este producto. Una vez que la cuajada alcanza los 70°C, los productores deben monitorear esta temperatura, para evitar fluctuaciones durante 8.80 minutos para asegurar la eliminación de 5 a 6 logaritmos de *S. entérica* y *L. monocytogenes* en el producto final.

Una vez elaborado el quesillo, es decir una vez aplicado el tratamiento térmico a la cuajada, este puede sufrir una contaminación debido a que estos productos se dejan

reposando a temperatura ambiente para su correspondiente enfriado. Debido a las condiciones bajo las que se elabora este producto, es de suma importancia seguir las Buenas Prácticas de Higiene (BPH) para evitar cualquier contaminación física o biológica que se pueda dar durante el enfriamiento hasta su posterior distribución. Debe haber un buen control del tiempo y de la temperatura a la que se enfriará el producto para mantener así, la inocuidad del producto (Codex Alimentarius 1997). Se debe evitar contaminación cruzada, procurando que el equipo o utensilios que estuvieron en contacto con la materia prima sean limpiados y sanitizados antes de utilizarse nuevamente (Flores *et al.* 1999).

Coxiella burnetii. Esta es una de las bacterias más resistente a tratamientos térmicos presente en productos lácteos. Debido a esto la pasteurización de productos lácteos está diseñada a reducir por lo menos 5 logaritmos de esta bacteria en los productos lácteos (Enright *et al.* 1957). La presencia de *Coxiella burnetii* en leche cruda es de 33 % según un estudio realizado en un hato ganadero en Japón (Muramatsu *et al.* 1997)

Tratamientos aplicados a productos lácteos determinan que con calentar a 63 °C por 30 minutos se asegura la reducción de más de 5 logaritmos la población de *Coxiella burnetii* en leche cruda (Enright *et al.* 1957). Cuando se utilizan temperaturas mayores el tiempo necesario para el tratamiento térmico se reduce significativamente obteniendo que a 72 °C por 15 segundos los mismos resultados del tratamiento anterior (Enright *et al.* 1957). De acuerdo a las reducciones decimales de *C. burnetii* obtenidos en experimentos, utilizando los valores recomendados para pasteurización en relación de tiempo y temperatura (Johnson *et al.* 1990), se estima que el valor Z para *C. burnetii* es $Z = 4.34$ °C (Cuadro 8).

Cuadro 8: Combinaciones de tiempo y temperatura para reducir la carga microbiana de *C. burnetii* en leche cruda.

Temp. (°C)	Valor D	Combinaciones recomendadas	Reducciones decimales
63	3.72 min	30 min	7.2
72	1.88 s	15 s	6.8

Fuente: O. Cerf y R. Condrón 2006

En la determinación de sobrevivencia de *C. burnetii* se obtuvo de acuerdo a la literatura consultada, que es necesario aplicar un tratamiento térmico de 30 minutos para obtener una reducción de 7 logaritmos en leche fluida a 63°C (Cuadro 8). Esta bacteria presenta un Valor Z igual a 4.34 °C en este mismo producto.

De acuerdo a valores recolectados sobre los tratamientos térmicos necesarios para eliminar un logaritmo la carga microbiana de *S. enterica* y *L. monocytogenes* en leche fluida son 65.6 °C por 1.3 minutos (Silva y Gibbs 2012) y 70 °C por 2.7 segundos (Bunning *et al.* 1988) respectivamente. De acuerdo al incremento obtenido de aplicar un tratamiento térmico pasando de leche fluida a cuajada para la elaboración de queso se encontró un aumento de 7.01 veces debido al cambio de porcentaje de grasa siendo de

3.6% a $22.17 \pm 5.34\%$. Con estos datos se infirió que el valor D para *C. burnetii* en la cuajada para 65 °C es de 20.15 min. De la misma forma en los valores Z reportados para *S. enterica* y *L. monocytogenes* fueron 6.1 y 7 °C respectivamente obteniendo un aumento de 1.65 veces de acuerdo a los cambios que existen entre leche fluida y cuajada por lo que el valor Z de *C. burnetii* es de 7.17 °C.

En un tratamiento térmico de fundición de cuajada a 65 °C durante 39.68 minutos se logra reducir alrededor de 2 logaritmos de la carga microbiana de *Coxiella*. Es importante mencionar que la dosis de infección para provocar fiebre Q en las personas es <10 UFC en el alimento (FDA 2014). Debido a esto, es necesario evitar la presencia de *C. burnetii* en los alimentos, por lo que lo máximo que podría tener la cuajada para lograr eliminar el total de bacterias de *C. burnetii* es de 2 logaritmos.

4. CONCLUSIONES

- Al utilizar los tratamientos térmicos de 65°C por 39.68 minutos y 75°C por 3.9 minutos, se eliminan 5 logaritmos de la carga bacteriana de *S. enterica* y *L. monocytogenes*.
- Los valores D y el valor Z para *S. enterica* y *L. monocytogenes* definidos respectivamente, establecieron que se puede utilizar el mismo valor para ambas bacterias.
- Según los resultados de este estudio, los tiempos y temperaturas utilizados actualmente (70-74 °C por 20 min) durante la cocción de la cuajada para la elaboración de quesillo, aseguran la ausencia de *L. monocytogenes* y *S. enterica*.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar una validación para la prevalencia y niveles de *C. burnetii* en la leche cruda de la región.
- Utilizar leche estandarizada con un porcentaje menor al 2% de grasa para evitar generar resistencia a tratamientos térmicos por parte de las bacterias y aportar un beneficio económico extra para los productores.
- Validar este estudio mediante un monitoreo microbiológico del quesillo proveniente de diferentes zonas del país.

6. LITERATURA CITADA

Alemdar, S. y Agaoglu, S. 2008. Survival of *Salmonella* Typhimurium during the ripening of herby cheese (told peynir). Turkey. Journal of Food Safety.30. 526-236 p.

Andino, F. y Castillo, Y. 2010. Curso Microbiología de los alimentos: Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria. Nicaragua. Universidad Nacional de Ingeniería UNI-Norte. 39 p.

Archer, J., Jervis, E., Bird, J., Gaze, J. 1998. Heat resistance of *Salmonella weltevreden* in low-moisture environments. J. Food Prot.61:969–973.

Breand, S., Fardel, G., Flandrois, J. P., Rosso, L. y Tomassone, R. 1998. Model of the influence of time and mild temperature on *Listeria monocytogenes* nonlinear survival curves. Int. J. Food Microbiol.40:185–195.

Bunning, V., Donnelly, C., Peeler, J., Briggs, E., Bradshaw, J. Crawford, R., Beliveau, C. y Tierney, T. 1998. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* within bovine milk phagocytes. Appl. Environ. Microbiol. 1998, 64(2):364. 364-370 p.

Cerf, O. y Cordron, R., 2006. *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: early application of the precautionary principle. Epidemiology. Infect. United Kingdom. University Press. 134, 946-951 p.

Codex Alimentarius. 1997. Textos Básicos sobre Higiene de los Alimentos. Italia. 21 p.

Cole, M. B., Davies, K. W., Munro, G., Holyoak, C. D. y Kilsby, D. C. 1993. A vitality model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. J. Ind. Microbiol. 12:232–239.

ComeBase. 2014. ComeBase: Predictive Models. En línea. Disponible en: http://modelling.combase.cc/ComBase_Predictor.aspx

Elika. 2013. *Listeria monocytogenes*. Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. España. 6p.

Enright, J., Sadler, W., y Thomas, R. 1957. Pasteurization of Milk Containing the Organism of Q fever. American Journal of Public Health. 47. 695-700 p.

Espinoza, Ana., De La Torre, Magali., Salinas, Marianella y Sánchez Víctor. 2004. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del distrito de ICA. Rev. Peruana de Medicina Experimental y Salud Público. 21(2). 71-77 p.

FAO/OMS. 2005. Conferencia Regional de FAO/OMS sobre Inocuidad de los Alimentos para las Américas y el Caribe: Evaluación de la equivalencia del proceso de elaboración del quesoillo (Queso suave) a la pasteurización en la republica de Honduras. Costa Rica. 71-75 pág.

Farber, J.M. y Pagotto, F. 1992. The effect of acid shock on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology, 15: 197–201. doi: 10.1111

FDA. 2014. Bad Bug Book: Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. 292 p.

Flores, J., Martinez, J. y Casillas, F. 1999. Manual de Buenas Prácticas de Higiene y Seguridad. México. 25 p.

Heizen, R. y Samuel, J. 2012. *Coxiella burnetii*: Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q fever Bacterium, Advances in experimental medicine and biology. Estados Unidos. 406 p. Vol. 984.

Hsieh, F., Acott, K., Elizondo, H. y Labuza, T., P. 1975. The effect of water activity on the heat resistance of vegetative cells in the intermediate moisture range. Lebensm.-Wiss. Technol. 8:78–81.

Johnson, EA. Nelson, JH. y Johnson, M. 1990. Microbiological safety of cheese made from heat-treated milk, Part II. Microbiology. Journal of Food Protection; 53: 519-540.

Kozak, J., Balmer, T., Byrne, R. y Fisher K. 1996. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: Incidence in dairy products. International Dairy Foods Association. Elsevier. Volume 7, Issues 4–5. Pages 215–221

Kwast, R. H. y Verrips C. T. 1982 Heat resistance of *Salmonella senftenberg* 775W at various sucrose concentrations in distilled water. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 14:193–201.

Line, J. E., Fain, A. R., Moran, A. B., Martin, L. M., Lechowich, R. V., Carosella, J. M. y Brown, W. L. 1991. Lethality of heat to *Escherichia coli* O157:H7: D-value and z-value determinations in ground beef. J. Food Prot.54:762–766.

Loma, E., Jené, X., Castillo, R. y Ganoza, V. 2000. Estudio de la Industria Agroalimentaria en Honduras: Opciones de cooperación técnica y empresarial. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Series Agroalimentarias. Honduras. 149 p.

Lorentzen, G., Ytterstad, E., Olsen, R. y Skjerdal, T. 2010. Thermal inactivation and growth potential of *Listeria innocua* in rehydrated salt-cured cod prepared for ready-to-eat products. Food Control. Elsevier. Vol. 21. Norway. 1121-1126 p.

Mattick, K. L., Jørgensen, F., Legan, J. D., Cole, M. B., Porter, J., Lappin-Scott, H. M. y Humphrey, T. J. 2000. The survival and filamentation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 at low water activity. Appl. Environ. Microbiol. 66:1274–1279.

Moats, W. A., Dabbah, R. y Edwards, V. M. 1971. Survival of *Salmonella anatum* heated in various media. Appl. Microbiol. 21:476–481.

Muramatsu, Y., Yanase, T., Okabayashi, T., Ueno, H. y Morita, C. 1997. Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk by PCR-Enzyme-linked immunosorbent assay combined with a novel sample preparation method. Applied and Environmental Microbiology; 63: 2142-2146.

Nassib, T., Zin, M. y Mel-Sharoud, W. 2003. Viability of *Salmonella enterica* Subsp. *Enterica* during the preparation and cold storage of Egyptian soft cheeses and ice-cream. International Journal of Dairy Technology. Vol. 56. No 1. 30-34 p.

Neidhardt, F. 1987. *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium: Cellular and molecular biology. American Society for Microbiology. Vol. 3. 1654 p.

Official Methods of Analysis of AOAC International, AOAC International, (current Ed.). Gaithersburg MD

Oliszewski, R., Cisint, J.C. y Núñez de Kairúz, M. 2007. Manufacturing characteristics and shelf life of Quesillo, an Argentinean traditional cheese. Journal Elsevier. Argentina. Food Control 18 (2007). 736–741 p.

Reglamento Técnico Centroamericano. Alimentos. Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de Alimentos. 2009. 13 p.

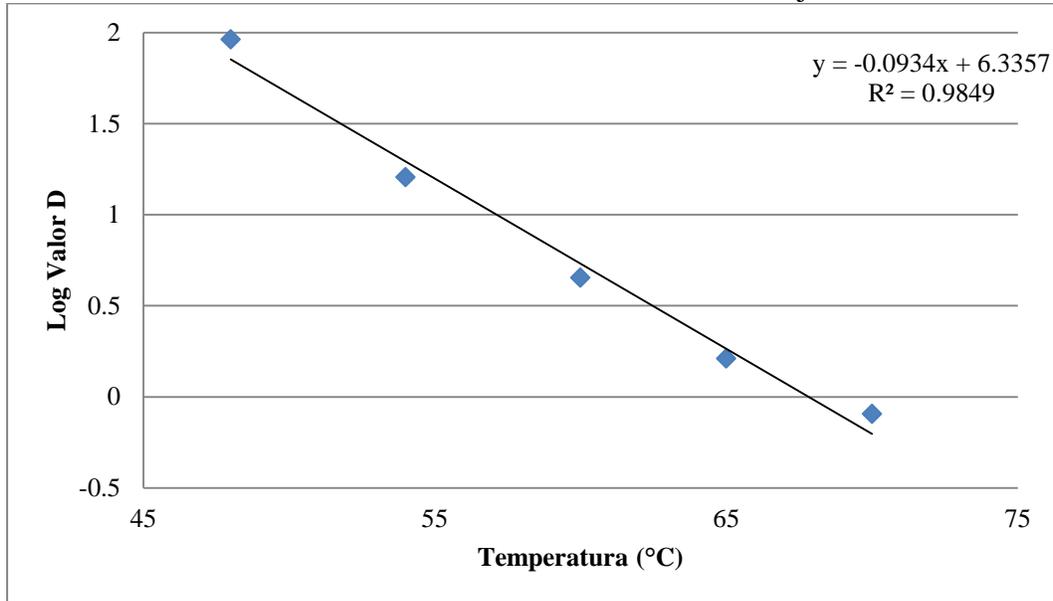
Revilla, A. y Chi, L. 2002. Productos lácteos elaborados de forma artesanal. Honduras. 6 p.

Senhaji, A. F. 1977. The protective effect of fat on the heat resistance of bacteria. J. Food Technol. 12:203–216.

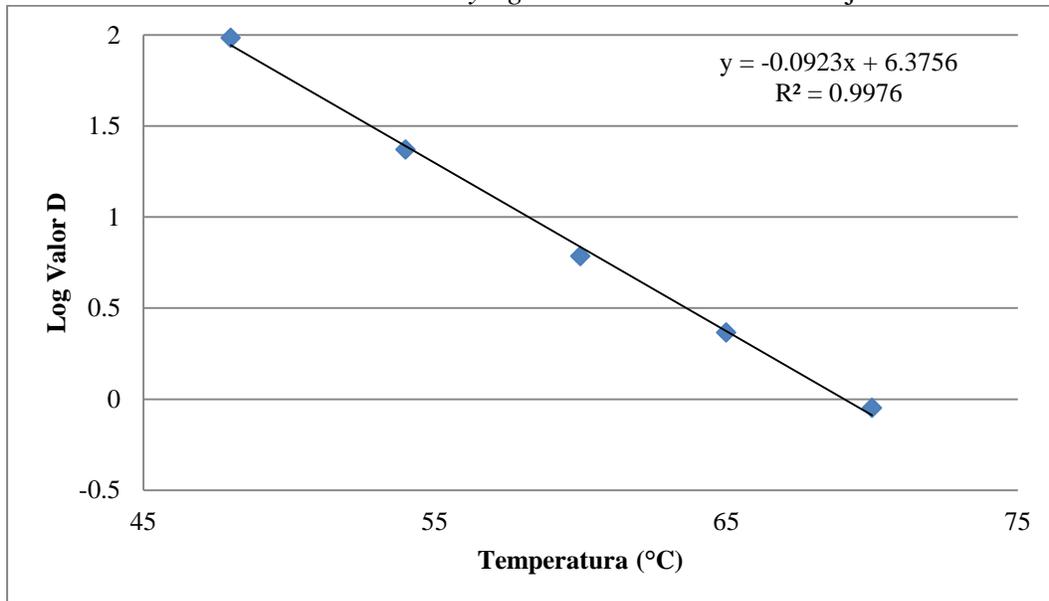
Silva, Filifa y Gibbs, Paul. 2012. Thermal pasteurization requirements for the inactivation of *Salmonella* in foods. Journal Elsevier. Food Research International 45 (2012) 695–699 p.

7. ANEXOS

Anexo 1. Valor Z de *Salmonella enterica* en la cocción de cuajada.



Anexo 2. Valor Z de *Listeria monocytogenes* en la cocción de cuajada.



Anexo 3. Valores D para *Salmonella enterica* en la cocción de cuajada para la primera repetición.

Temperatura (°C)	Pendiente	Valor D (min)	Log Valor D
48	0.011	94.340	1.975
54	0.064	15.552	1.192
60	0.347	2.886	0.460
65	0.777	1.287	0.110
70	1.428	0.700	-0.155

Anexo 4. Valores D para *Salmonella enterica* en la cocción de cuajada para la segunda repetición.

Temperatura (°C)	Pendiente	Valor D (min)	Log Valor D
48	0.010	98.039	1.991
54	0.061	16.420	1.215
60	0.230	4.348	0.638
65	0.441	2.267	0.355
70	1.016	0.985	-0.007

Anexo 5. Valores D para *Salmonella enterica* en la cocción de cuajada para la tercera repetición.

Temperatura (°C)	Pendiente	Valor D (min)	Log Valor D
48	0.012	84.746	1.928
54	0.062	16.181	1.209
60	0.194	5.168	0.713
65	0.635	1.575	0.197
70	1.267	0.789	-0.103

Anexo 6. Valores D para *Listeria monocytogenes* en la cocción de cuajada para la primera repetición.

Temperatura (°C)	Pendiente	Valor D (min)	Log Valor D
48	0.017	58.824	1.770
54	0.058	17.361	1.240
60	0.228	4.390	0.642
65	0.507	1.974	0.295
70	1.225	0.816	-0.088

Anexo 7. Valores D para *Listeria monocytogenes* en la cocción de cuajada para la segunda repetición.

Temperatura (°C)	Pendiente	Valor D (min)	Log Valor D
48	0.008	119.048	2.076
54	0.050	20.000	1.301
60	0.143	7.008	0.846
65	0.312	3.206	0.506
70	0.996	1.004	0.002

Anexo 8. Valores D para *Listeria monocytogenes* en la cocción de cuajada para la tercera repetición.

Temperatura (°C)	Pendiente	Valor D (min)	Log Valor D
48	0.010	104.167	2.018
54	0.021	48.544	1.686
60	0.122	8.190	0.913
65	0.044	22.779	1.358
70	1.127	0.887	-0.052

Anexo 9. Valores Z para *Salmonella enterica* en cada repetición durante la cocción de cuajada.

Repetición	Pendiente	Valor Z (°C)
1	0.098	10.215
2	0.089	11.249
3	0.093	10.799

Anexo 10. Valores Z para *Listeria monocytogenes* en cada repetición durante la cocción de cuajada.

Repetición	Pendiente	Valor Z (°C)
1	0.085	11.765
2	0.090	11.099
3	0.081	12.376

Anexo 11. Tiempos en minutos empleados en cada tratamiento a diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)				
48	54	60	65	70
0	0	0	0.00	0.00
2	5	2	0.83	0.33
10	10	4	1.67	0.67
20	15	6	2.50	1.00
30	20	8	3.33	1.33
40	25	10	4.17	1.67
50	30	12	5.00	2.00
60	35	14	5.83	2.33

Anexo 12. Recuentos de *S. enterica* obtenidos a partir de cada temperatura.

		48 °C		54 °C		60 °C		65 °C		70	
Rep.	Min	Log UFC	Min	Log UFC	Min	Log UFC	Seg	Log UFC	Seg	Log UFC	
1	0	6.85	0	8.87	0	6.91	0.00	7.12	0.00	7.32	
2	0	7.53	0	7.19	0	7.02	0.00	7.11	0.00	6.94	
3	0	5.96	0	6.15	0	5.86	0.00	6.04	0.00	5.74	
1	2	6.68	5	6.58	2	6.47	49.80	6.37	19.80	6.56	
2	2	6.16	5	6.66	2	6.50	49.80	6.77	19.80	6.50	
3	2	5.71	5	5.64	2	4.90	49.80	5.04	19.80	5.34	
1	10	6.36	10	7.44	4	6.36	100.20	6.57	40.20	6.10	
2	10	6.88	10	6.37	4	6.51	100.20	6.56	40.20	6.02	
3	10	5.58	10	5.64	4	5.15	100.20	5.00	40.20	5.46	
1	20	6.59	15	6.58	6	6.17	150.00	6.44	60.00	6.00	
2	20	6.73	15	5.86	6	6.01	150.00	6.55	60.00	5.56	
3	20	5.75	15	5.26	6	5.08	150.00	5.04	60.00	5.41	
1	30	6.58	20	6.57	8	5.83	199.80	6.44	79.80	5.62	
2	30	6.68	20	6.39	8	5.73	199.80	6.31	79.80	ND	
3	30	5.56	20	4.90	8	4.59	199.80	4.30	79.80	4.99	
1	40	6.68	25	6.60	10	4.48	250.20	5.54	100.20	4.38	
2	40	6.70	25	5.68	10	5.21	250.20	5.73	100.20	4.47	
3	40	5.73	25	4.78	10	3.78	250.20	3.60	100.20	3.75	
1	50	6.09	30	6.15	12	ND	300.00	2.60	120.00	4.76	
2	50	6.68	30	5.18	12	4.40	300.00	4.91	120.00	4.75	
3	50	5.20	30	4.60	12	3.02	300.00	2.54	120.00	4.17	
1	60	5.96	35	5.70	14	ND	349.80	2.48	139.80	3.67	
2	60	6.01	35	4.81	14	3.60	349.80	4.41	139.80	4.82	
3	60	4.98	35	3.60	14	3.22	349.80	2.18	139.80	2.30	

ND: Datos Fuera de rango.

Anexo 13. Recuentos de *Listeria monocytogenes* obtenidos a partir de las tres repeticiones para cada temperatura.

Rep.	48°C		54°C		60°C		65°C		70°C	
	Min	Log UFC	Min	Log UFC	Min	Log UFC	Seg	Log UFC	Seg	Log UFC
1	0	6.04	0	7.90	0	6.00	0.0	6.15	0.0	6.00
2	0	6.38	0	6.57	0	6.30	0.0	6.42	0.0	5.88
3	0	5.11	0	5.30	0	5.23	0.0	5.21	0.0	5.54
1	2	5.58	5	5.61	2	5.79	49.8	5.40	19.8	5.62
2	2	5.69	5	6.36	2	6.08	49.8	6.21	19.8	5.48
3	2	5.43	5	6.05	2	5.20	49.8	5.05	19.8	5.30
1	10	5.43	10	5.43	4	5.64	100.2	5.30	40.2	4.99
2	10	6.11	10	5.51	4	6.14	100.2	5.84	40.2	5.16
3	10	5.18	10	5.01	4	5.20	100.2	5.00	40.2	5.16
1	20	5.56	15	5.49	6	5.16	150.0	5.43	60.0	5.37
2	20	6.34	15	5.83	6	5.76	150.0	5.83	60.0	4.83
3	20	5.40	15	5.19	6	5.08	150.0	4.32	60.0	4.93
1	30	5.64	20	5.23	8	5.02	199.8	5.29	79.8	4.93
2	30	5.84	20	5.54	8	5.21	199.8	5.94	79.8	ND
3	30	5.00	20	5.15	8	4.59	199.8	4.11	79.8	4.92
1	40	5.48	25	4.92	10	4.22	250.2	5.06	100.2	3.70
2	40	5.80	25	5.28	10	5.03	250.2	5.30	100.2	3.58
3	40	4.89	25	4.95	10	4.45	250.2	3.00	100.2	3.85
1	50	5.45	30	5.06	12	3.63	300.0	3.61	120.0	4.38
2	50	5.71	30	4.92	12	4.69	300.0	5.12	120.0	3.94
3	50	4.81	30	4.93	12	4.00	300.0	3.72	120.0	3.98
1	60	4.23	35	5.10	14	2.70	349.8	2.48	139.8	2.60
2	60	5.62	35	4.73	14	4.41	349.8	4.29	139.8	3.72
3	60	ND	35	4.90	14	3.55	349.8	2.30	139.8	2.54

ND: Datos fuera de rango. Seg: Segundos

Anexo 14. Tratamientos térmicos recomendados a utilizar a los productores en la elaboración de quesillo en base a los modelos estadísticos establecidos en el experimento.

Temperatura	Reducción				
	Valor D	F _{3D}	F _{5D}	F _{7D}	F _{10D}
60	6.88	20.64	34.40	48.16	68.80
61	5.56	16.69	27.81	38.94	55.63
62	4.50	13.49	22.49	31.48	44.98
63	3.64	10.91	18.18	25.46	36.37
64	2.94	8.82	14.70	20.58	29.40
65	2.38	7.13	11.89	16.64	23.77
66	1.92	5.77	9.61	13.46	19.22
67	1.55	4.66	7.77	10.88	15.54
68	1.26	3.77	6.28	8.80	12.57
69	1.02	3.05	5.08	7.11	10.16
70	49.29	147.87	246.45	345.02	492.89
71	39.85	119.56	199.26	278.96	398.52
72	32.22	96.67	161.11	225.55	322.22
73	26.05	78.16	130.26	182.37	260.53
74	21.06	63.19	105.32	147.45	210.65
75	17.03	51.09	85.16	119.22	170.31
76	13.77	41.31	68.85	96.39	137.71
77	11.13	33.40	55.67	77.94	111.34
78	9.00	27.01	45.01	63.02	90.02
79	7.28	21.84	36.39	50.95	72.79
80	5.89	17.66	29.43	41.20	58.85

Temperaturas de 60 a 69 °C el valor D se presenta en minutos.

Temperaturas de 70 a 80 °C el valor D se presenta en segundos.