

# **Evaluación de Nisina como bioconservante en leche fluida**

**Andrés Roberto Sarmiento Suárez**

**Zamorano, Honduras**

**Diciembre, 2007**

# **Evaluación de Nisina como bioconservante en leche fluida**

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

Presentado por:

**Andrés Roberto Sarmiento Suárez**

**Zamorano, Honduras**  
Diciembre, 2007

El autor concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

---

Andrés Roberto Sarmiento Suárez

**Zamorano, Honduras**  
Diciembre, 2007

## **Evaluación de Nisina como bioconservante en leche fluida**

Presentado por:

Andrés Roberto Sarmiento Suárez

Aprobado:

---

Wilfredo Domínguez, M.Sc.  
Asesor Principal

---

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

---

Edgar Ugarte, M.Sc.  
Asesor

---

Raúl Espinal, Ph.D.  
Decano Académico

---

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.  
Rector

## **DEDICATORIA**

A Dios por alumbrar mi camino y darme las fuerzas para ser alguien mejor en la vida.

A mi abuelos Hugo y Sonia por ser la fuente de inspiración para estudiar en Zamorano.

A mis padres por su sacrificio y apoyo en todo momento.

A mis abuelos Isaac y Ligia por su apoyo incondicional durante toda mi vida

A todas las personas que amo y que hicieron estos cuatro años de estudio la mejor experiencia de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi madre por darme la oportunidad de estudiar en la mejor escuela de agricultura de Latinoamérica.

A mi padre por todos sus consejos y apoyo a la distancia

A mis amigos y colegas que colaboraron durante la elaboración de este estudio

Al Ing. Wilfredo Domínguez por los conocimientos y la ayuda brindada.

Al Dr. Luis Osorio por su amistad, apoyo y comprensión.

Al Ing. Edgar Ugarte por su dedicación y su valiosa colaboración.

## RESUMEN

Sarmiento, A. 2007. Evaluación de nisina como bioconservante en leche fluida. Proyecto del programa de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria, El Zamorano, Honduras. 35 p.

La leche es uno de los alimentos más consumidos a nivel mundial y por sus características representa una excelente fuente de nutrientes para el ser humano; consumida generalmente como leche pasteurizada y/o leche tratada a ultra altas temperaturas. La pasteurización es la forma más común prolongar la vida de anaquel de la leche, por otro lado, la industria ha desarrollado aditivos extraídos de fuentes naturales capaces de potenciar el efecto conservante del tratamiento térmico. Uno de estos aditivos son las bacteriocinas, específicamente la “nisina” considerada por la FDA (Food and Drug Administration) como la única bacteriocina GRAS (generalmente reconocida como segura, por sus siglas en inglés). El propósito de este estudio fue evaluar el efecto conservante de dos concentraciones de “Nisina” comercial aplicada antes y después de la pasteurización, así como los efectos que pudiesen tener en las características que determinan la vida de anaquel de la leche (acidez, color, viscosidad, sabor y recuentos bacterianos) durante un periodo de 16 días con mediciones en intervalos de 4 días utilizando un diseño experimental BCA, con medidas repetidas en el tiempo para realizar el análisis estadístico mediante el paquete informático SAS® “Statistical Analysis System”. Como resultado de la investigación se determinó el poder conservante de la bacteriocina, logrando incrementar en 8 días la vida de anaquel de la leche, reduciendo el número de UFC’s causantes de la acidez de la leche y conservando las propiedades físicas, químicas y sensoriales de la misma.

**Palabras clave:** Bacteriocina, conservante natural, vida de anaquel.

---

Wilfredo Domínguez M.Sc.  
Asesor Principal

## CONTENIDO

Portadilla.....		i
Autoría.....		ii
Hoja de firmas .....		iii
Dedicatoria .....		iv
Agradecimientos.....		v
Resumen .....		vi
Contenido .....		vii
Indice de cuadros.....		viii
Indice de figuras .....		ix
Indice de de anexos .....		x
<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2	ANTECEDENTES.....	2
1.3	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	2
1.4	LIMITANTES.....	2
1.5	OBJETIVOS.....	2
1.5.1	Objetivo General .....	2
1.5.2	Objetivos específicos.....	3
<b>2</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
2.1	ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE LA LECHE .....	4
2.2	FACTORES EXTERNOS QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO BACTERIANO .....	5
2.3	VENTAJAS DEL USO DE BACTERIOCINAS EN ALIMENTOS .....	5
2.4	BACTERIOCINAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS .....	5
<b>3</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>7</b>
3.1	UBICACIÓN.....	7
3.2	MATERIALES Y EQUIPO .....	7
3.2.1	Materiales .....	7
3.2.2	Equipo.....	7
3.3	METODOLOGÍA.....	8
3.3.1	Determinación de los tratamientos a utilizar .....	8
3.3.2	Preparación de los tratamientos.....	8
3.3.3	Diseño experimental.....	9
3.3.4	Medición de variables.....	9

3.3.5	Análisis químico.....	10
3.3.6	Análisis físicos.....	10
3.3.7	Análisis microbiológico.....	10
3.3.8	Análisis sensorial.....	10
3.3.9	Análisis estadístico.....	10
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>13</b>
4.1	ACIDEZ.....	13
4.2	COLOR.....	14
4.3	VISCOSIDAD.....	15
4.4	CONTEO BACTERIAL.....	17
4.5	EVALUACIÓN SENSORIAL.....	18
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>19</b>
<b>6</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>20</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>21</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>23</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Principales microorganismos que afectan las propiedades de la leche .....	4
2. Bacteriocinas de la clase I producidas por bacterias ácido lácticas.....	6
3. Leyenda de los tratamientos .....	8
4. Diseño experimental.....	9
5. Análisis de Acidez a través del tiempo.....	13
6. Análisis de color, valor L* .....	14
7. Análisis de color, valor a* .....	15
8. Análisis de color, valor b* .....	15
9. Análisis de viscosidad a través del tiempo .....	16
10. Conteo bacterial a través del tiempo (Log UFC/ml) .....	17

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura	Página
1. Diagrama de flujo para el experimento .....	11
2. Diagrama de flujo para las siembras microbiológicas.....	12
3. Relación Acidez-Tiempo.....	14
4. Relación Viscosidad-Tiempo .....	16
5. Curvas de crecimiento bacteriano para mesófilos aerobios totales.....	18

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Página
1. Análisis de costo para la aplicación de nisina en leche fluida.....	24

# 1. INTRODUCCIÓN

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas ejercen una influencia positiva en la salud o en la fisiología del hospedero. Una de las formas de acción de los probióticos es a través de la resistencia otorgada contra la invasión de microorganismos patógenos, lograda mediante la generación de diversas sustancias antimicrobianas entre las que se encuentran las bacteriocinas, consideradas como “péptidos biológicamente activos, poseen propiedades bactericidas contra especies estrechamente relacionadas con la cepa productora” Gonzáles et al. (2003).

Las bacterias productoras de ácido láctico (consideradas como probióticos) se han utilizado durante mucho tiempo en la industria alimentaria debido a las sustancias que producen, cuyo efecto conservante ha sido ampliamente estudiado. Por otra parte, las bacterias ácido lácticas (BAL) proporcionan características como sabor y textura en algunos alimentos. Actualmente, la industria ha logrado aislar bacteriocinas de BAL para ser utilizadas como bioconservantes en alimentos.

La nisina, un péptido de 34 aminoácidos y bajo peso molecular producido por la bacteria ácido láctica *Lactococcus lactis ssp lactis* (Cintas et al. 2001), es el bioconservante más estudiado en la actualidad. Considerada por la FDA como la única bacteriocina GRAS (generalmente reconocida como segura, por sus siglas en inglés), es utilizada ampliamente en la industria láctea para la conservación de quesos y productos fermentados, sin embargo, existen pocas referencias sobre su aplicación directa en leche fluida.

## 1.1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La planta procesadora de lácteos de Zamorano procesa leche fluida pasteurizada y homogenizada, estandarizada al 2% de grasa. La misma tiene marcada una vida de anaquel de 10 días, almacenada a  $6\pm 1^{\circ}\text{C}$  (Peña, 2006). Sin embargo, este tiempo de duración varía en la mayoría de los casos a causa del manejo inadecuado de la cadena de frío al momento de su comercialización.

Mediante la presente investigación se evaluó una alternativa que logre prolongar la duración de la leche pasteurizada sin afectar sus características físicas, químicas y sensoriales, manteniendo al mismo tiempo su estatus de leche 100% natural.

## **1.2. ANTECEDENTES**

La evaluación microbiológica de la leche cruda recibida y de la línea de procesamiento de la leche fluida en la planta de lácteos de zamorano realizada por Enamorando (2003); dejó en evidencia la corta duración de la leche fluida a causa de contaminación tanto anterior como posterior a su procesamiento.

Peña (2006) realizó un estudio sobre la vida de anaquel de la leche fluida en función del conteo microbiano inicial, elaborando una ecuación de regresión utilizando la cantidad inicial de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes en la leche cruda, para generar como resultado la cantidad de días de duración de la leche.

Actualmente, el único tratamiento efectivo realizado en la planta de lácteos de Zamorano para disminuir las devoluciones de leche en mal estado es el incremento de la temperatura de pasteurización a 80-85°C por 15 segundos (Enamorado, 2003).

## **1.3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

Por su origen natural las bacteriocinas permiten su uso como protector de alimentos, por otro lado, su incorporación en los alimentos permite reducir o eliminar la utilización de aditivos sintéticos que cada vez son menos deseados por el consumidor (Food-info, University of Wageningen). Además, por ser resistentes al calor y a la acidez entre otros, se pueden utilizar para incrementar la vida útil de muchos alimentos, en este caso, la leche procesada por la planta de lácteos de Zamorano.

## **1.4. LIMITANTES**

La disponibilidad de Nisina comercial en el mercado Hondureño.

La cantidad de placas a usar para los conteos microbianos a lo largo del experimento y el costo de las mismas.

## **1.5. OBJETIVOS**

### **1.5.1. Objetivo General**

Determinar el efecto en la vida de anaquel de la leche pasteurizada mediante el uso de nisina como bioconservante.

### **1.5.2. Objetivos específicos**

Evaluar el efecto conservante a lo largo del tiempo de almacenamiento de la leche tratada con Nisina en función de la concentración utilizada, con aplicaciones antes y después de pasteurización.

Determinar niveles de detección para determinada concentración de nisina en leche mediante el uso de paneles sensoriales familiarizados con el producto.

Evaluar mediante análisis de laboratorio cambios causados por los tratamientos de nisina en leche pasteurizada (Acidez, color, viscosidad y recuento bacterial).

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DE LA LECHE

La leche es una excelente fuente de nutrientes y energía para los microorganismos, algunos de los cuales pueden suponer un riesgo para la salud o bien causar el deterioro en la calidad y vida de anaquel de la leche.

Los efectos que se producen por la acción microbiológica también están determinados por la interacción de las bacterias con el medio que las rodea; la acción bacteriana modifica el medio y este a su vez, determina cuáles son las bacterias que pueden proliferar (Walstra et al, 2001).

La leche contiene inhibidores bacteriales naturales como ser: inmunoglobulinas, enzimas como la lisozima y la lactoferrina o el sistema peroxidasa tiosanato-H<sub>2</sub>O (Walstra et al, 2001).

**Cuadro 1.** Principales microorganismos que afectan las propiedades de la leche

<b>Microorganismo</b>	<b>producto metabólico</b>	<b>Defecto</b>
Bacterias psicrótrofas <i>Bacillus cereus</i>	péptidos amargos	Amargor
Bacterias psicrótrofas	ácidos grasos libres	Ranciedad
Bacterias psicrótrofas	esteres de etilo	Afrutado
<i>Bacillus sp.</i>	desestabilización de la caseína	Coagulación
Bacterias lácticas	acido láctico y acético	Acidificación
Bacterias lácticas	3-metil butanal	Malteado
Bacterias lácticas	Exopolisacáridos	Viscosidad

**Fuente:** Muñoz, A (2006)

## 2.2. FACTORES EXTERNOS QUE AFECTAN EL CREMIENTO BACTERIANO

El crecimiento de las bacterias está limitado en gran medida por las variaciones de las condiciones externas que pueden soportar y las condiciones óptimas para su desarrollo, entre las que se encuentran: Disponibilidad de elementos nutrientes, humedad del medio, actividad de agua, temperatura, oxígeno, acidez y concentración de sales (Madrid, 2001). La industria ha desarrollado aditivos sintéticos como una alternativa capaz de limitar el crecimiento bacteriano en ciertos productos, otra opción relativamente nueva es el uso de aditivos naturales o bioconservantes como es el caso de las bacteriocinas.

## 2.3. VENTAJAS DEL USO DE BACTERIOCINAS EN ALIMENTOS

Su origen natural permite su uso como protector de alimentos.

Su incorporación en los alimentos permite reducir o eliminar el uso de aditivos químicos de síntesis.

Por ser resistentes al calor, alta acidez, baja actividad de agua; se pueden utilizar para incrementar la vida útil de muchos alimentos (Arques, 2003).

## 2.4. BACTERIOCINAS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacteriocinas se pueden clasificar de acuerdo al tipo de bacterias que la producen, la forma más común de clasificar esta sustancia es en dos grupos: Bacteriocinas producidas por bacterias Gram-negativa y bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positiva (Muñoz, 2006). Dentro del grupo de las bacteriocinas Gram-Positiva, las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas son las más utilizadas dentro de la industria Láctea.

En 1988, Klaenhammer propuso una clasificación para las Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (BAL).

**Clase I:** Lantibióticos, llamados así por contener aminoácidos modificados como Lantionina o  $\beta$ -metil Lantionina. Con un tamaño menor a los 5KDa. Este grupo a su vez se subdivide en Lantibióticos del tipo A y B.

Los Lantibióticos del tipo A, grupo al cual pertenece la Nisina, actúan mediante la despolarización de la membrana citoplasmática. Los Lantibióticos del tipo B, funcionan por medio de la inhibición enzimática (Seppo et al, 1998).

**Clase II:** Bacteriocinas no modificadas, de pequeño tamaño y estables al calor. Es el grupo más numeroso y comprende las bacteriocinas de tamaño inferior a 10KDa,

son termoestables y sin aminoácidos modificados en su estructura a diferencia de las bacteriocinas del tipo I.

**Clase III:** Bacteriocinas no modificadas, de gran tamaño y sensibles al calor. Son las bacteriocinas de mayor tamaño (más de 30Kda). Termolábiles. Son las de menor interés industrial.

Por su abundancia y sus posibles usos en la industria alimenticia las bacteriocinas pertenecientes a las clases I y II han sido las más estudiadas (Seppo et al; 1998).

**Cuadro 2.** Bacteriocinas de la clase I producidas por bacterias ácido lácticas

<b>Lantibiótico</b>	<b>Cepa Productora</b>	<b>Masa molecular</b>	<b>Actividad antimicrobiana</b>
Carnocina UI49	<i>Carnobacterium piscicola</i> UI49	4635 Da	<i>Carnobacterium, Lactobacillus, Pediococcus</i> y <i>Lactococcus</i>
Citolisina L1	<i>Enterococcus faecalis</i>	4164 Da	
Citolisina L2	<i>Enterococcus faecalis</i>	2631 Da	
Lacticina 418	<i>Lc. lactis</i> 481	2901 Da	<i>Bacterias ácido lácticas</i> y <i>Clostridium tyrobutyricum</i>
Lactocina S	<i>Lb. Sake</i> 145	3769 Da	<i>Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc</i>
Lactococcina	<i>Lc. Lactis</i> ADRI85L030	2300 Da	<i>C. tyrobutyricum, Lb. helveticus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>
Mutacina	<i>Sc. mutans</i>	3245 Da	
Nisina A	<i>Lc. lactis ssp lactis</i>	3488 Da	<i>Lactococcus, Streptococcus, Staphylococcus, Pediococcus, Lactobacillus, Listeria, Mycobacterium, Clostridium</i> (+ esporas) y <i>Bacillus</i> (+ esporas)
Nisina Z	<i>Lc. lactis ssp. Lactis</i> NIZO 22186	3453 Da	Igual a la anterior
Salvaricina A	<i>Sc. salivarius</i> 20P3	2315 Da	<i>Micrococcus luteus</i>
Streptococcina A-FF22	<i>Sc. pyogenes</i>	2795 Da	

Fuente: Seppo, von Wright (1998).

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. UBICACIÓN**

Muestras de leche cruda fueron recolectadas en la planta de procesamiento de productos lácteos de Zamorano, para posteriormente ser tratadas con Nisina y realizar análisis de laboratorio y determinar el efecto de la misma. Los análisis físicos y microbiológicos se realizaron en los laboratorios de análisis de alimentos y laboratorio de microbiología de alimentos respectivamente, ubicados en el campus de la escuela Agrícola Panamericana en el Departamento Francisco Morazán, Km. 32 al Este de Tegucigalpa, Honduras.

### **3.2. MATERIALES Y EQUIPO**

#### **3.2.1. Materiales**

Leche cruda 3.5% de contenido graso (1kg/tratamiento)  
Nisina Comercial: Delvo®Plus/Nisin.  
Medio de cultivo para microorganismos aerobios totales, PCA  
Agua peptonada (0.1%)  
Fenofaleína  
NaHO 0.1N  
Alcohol al 70%

#### **3.2.2. Equipo**

Beaker, capacidad 1 litro  
Termómetro Oakton modelo 35639  
Hornilla para el calentamiento de la leche Fisher Scientific  
Balanza analítica Mettler modelo AE200  
Agitador magnético  
Refrigeradora doméstica para mantener la leche tratada a  $6\pm 1$  °C.  
Pipetas de 10 ml  
Micropipetas graduadas en 1000  $\mu$ l. Fisher Scientific  
Puntas estériles para micropipeta  
Tubos de ensayo con tapadera  
Platos Petri  
Vasos estériles para transporte de muestras  
Autoclave Market Forge, Sterilmatic

Campana extractora de flujo laminar, Labconco, modelo 3609  
 Viscosímetro Brookfield modelo RVDV-II, serie RT61255  
 Acople #1 para viscosímetro Brookfield  
 Colorímetro Colorflex HunterLab modelo 45/0, serie CX0687  
 Incubadora, 37±1 °C Fisher Scientific

### 3.3. METODOLOGÍA

Se evaluó el efecto de la nisina en el crecimiento microbiano y en las propiedades físico-químicas y sensoriales de la leche. Realizando un seguimiento con pruebas de laboratorio con intervalos de 4 días comenzando en el día 0 y terminando en el día 16.

#### 3.3.1. Determinación de los tratamientos a usar

Con base en las especificaciones de la nisina comercial y lineamientos para la ingesta diaria admisible según regulaciones europeas, se determinó la cantidad de nisina a utilizar y las variaciones entre los tratamientos. Escogiendo dos concentraciones de bacteriocina: 50 ppm y 150 ppm. Y dos momentos de aplicación: antes de la pasteurización y después de la pasteurización.

**Cuadro 3.** Leyenda de los tratamientos

Control	Leche pasteurizada a 80°C por 15 segundos
Tratamiento 1	Leche con nisina (50ppm) aplicada antes de pasteurización a 80°C por 15 segundos
Tratamiento 2	Leche con nisina (50ppm) aplicada después de pasteurización a 80°C por 15 segundos
Tratamiento 3	Leche con nisina (150ppm) aplicada antes de pasteurización a 80°C por 15 segundos
Tratamiento 4	Leche con nisina (150ppm) aplicada después de pasteurización a 80°C por 15 segundos

#### 3.3.2. Preparación de los tratamientos

La leche usada (leche cruda al 3.5% de grasa) se recogió del tanque de recibo de la planta de lácteos de Zamorano, fue almacenada en botes de 1/2gal respectivamente rotulados para cada tratamiento y se transportaron al laboratorio de microbiología, donde recibieron tratamiento térmico utilizando un calentador de laboratorio marca Fisher. La leche con una temperatura inicial de 12°C fue calentada por aproximadamente 30 minutos hasta

alcanzar una temperatura de 80°C, dejando la leche a esta temperatura por 15 segundos asegurando de este modo su pasteurización, la aplicación de nisina se realizó antes o después de la pasteurización, dependiendo del tratamiento. Una vez pasteurizada y con la nisina agregada, cada muestra se enfrió en baño María con agua y hielo a una temperatura de 24±1 °C y fueron inmediatamente almacenadas en un refrigerador doméstico a 6±1 °C.

### 3.3.3. Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar, BCA, con medidas repetidas en el tiempo. La preparación de los bloques se hizo en intervalos de dos semanas entre bloque y bloque.

**Cuadro 4.** Diseño experimental

	día 0	día 4	día 8	día 12	día 16
<b>Bloque 1</b>	Control	Control	Control	Control	Control
	TRT1	TRT1	TRT1	TRT1	TRT1
	TRT2	TRT2	TRT2	TRT2	TRT2
	TRT3	TRT3	TRT3	TRT3	TRT3
	TRT4	TRT4	TRT4	TRT4	TRT4

	día 0	día 4	día 8	día 12	día 16
<b>Bloque 2</b>	Control	Control	Control	Control	Control
	TRT1	TRT1	TRT1	TRT1	TRT1
	TRT2	TRT2	TRT2	TRT2	TRT2
	TRT3	TRT3	TRT3	TRT3	TRT3
	TRT4	TRT4	TRT4	TRT4	TRT4

	día 0	día 4	día 8	día 12	día 16
<b>Bloque 3</b>	Control	Control	Control	Control	Control
	TRT1	TRT1	TRT1	TRT1	TRT1
	TRT2	TRT2	TRT2	TRT2	TRT2
	TRT3	TRT3	TRT3	TRT3	TRT3
	TRT4	TRT4	TRT4	TRT4	TRT4

### 3.3.4. Medición de variables

Durante un periodo de 16 días con intervalos de 4 días, se recopilaron datos de acidez, color, viscosidad y conteo de bacterias totales mas una prueba sensorial de diferenciación al día 8 entre el tratamiento con la mayor concentración de nisina y el control.

### **3.3.5. Análisis químico**

La cantidad de ácido láctico, principal indicador de la vida de anaquel de la leche se midió utilizando la prueba de acidez titulable expresada como ácido láctico (ATECAL). Tomando como referencia el estudio de Peña (2005) se determinó que 0.20% ATECAL sería el límite para la vida útil de los tratamientos.

### **3.3.6. Análisis físicos**

Se midió el color y la viscosidad de cada tratamiento a través del tiempo mediante los equipos Colorflex HunterLab y Viscosímetro Brookfield respectivamente. Para medir la viscosidad se tomaron muestras de los tratamientos a  $23 \pm 0.5$  °C, utilizando la espina #1 para fluidos con baja viscosidad y a una velocidad de 100rpm.

### **3.3.7. Análisis microbiológico**

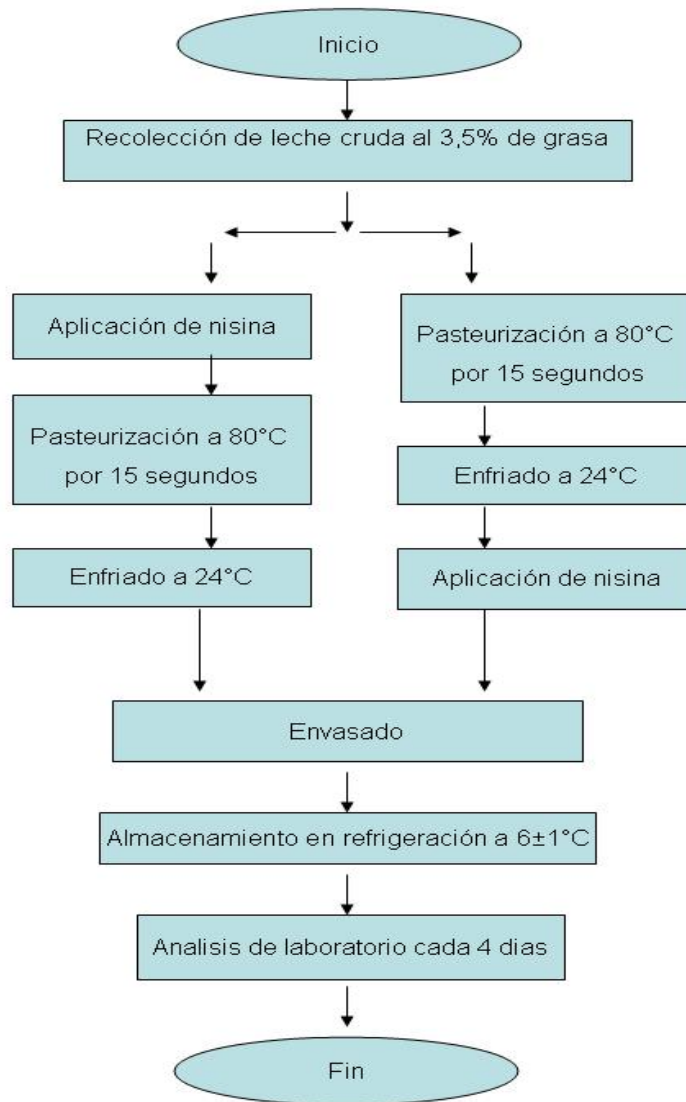
Se realizaron las siembras microbiológicas en medio de cultivo PCA (Plate Count Agar), para mesófilos aerobios totales en tres diluciones ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) con duplicados. Incubando las placas durante 48 horas a una temperatura de  $37 \pm 1$  °C para hacer el conteo tomando en cuenta solo las placas que presentaron entre 25 a 250 unidades formadoras de colonia.

### **3.3.8. Análisis sensorial**

Se utilizó una prueba triangular con 35 panelistas entrenados para determinar diferencias entre los tratamientos y leche pasteurizada sin ningún tipo de aditivo.

### **3.3.9. Análisis estadístico**

Para determinar si existieron o no diferencias entre los tratamientos y su efecto en las características evaluadas a través del tiempo se utilizó el programa SAS®, “Statistical Analysis System” utilizando un modelo de bloques completos al azar, con medidas repetidas en el tiempo.



**Figura 1.** Diagrama de flujo para el experimento



**Figura 2.** Diagrama de flujo para las siembras microbiológicas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Morales, S. 2005. Predicción de conteos microbiológicos en la leche cruda con base en la prueba de azul de metileno.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. ACIDEZ

La medición de acidez se realizó en intervalos de 4 días hasta el día 16. El cuadro 5, muestra los cambios de acidez en el control y los tratamientos durante los 16 días que duró el experimento. Se puede apreciar que a partir del día 4, el control fue significativamente diferente de los tratamientos ( $P < 0.05$ ). Mientras que la que la acidez entre los tratamientos con nisina resultaron estadísticamente iguales durante todo el experimento.

La proliferación de bacterias productoras de ácido láctico como ser: *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Lactobacillus*, entre otras, fue controlada por la nisina aplicada en los tratamientos, logrando que la acidez se mantenga relativamente constante en la mayoría de estos como se aprecia en el cuadro 5.

La pasteurización del control sin nisina no fue lo suficientemente efectiva para controlar el crecimiento de bacterias ácido lácticas en comparación con los tratamientos pasteurizados y con nisina. También se pudo observar el incremento sustancial de la acidez en la leche cruda tomada como un punto de referencia adicional dentro del experimento.

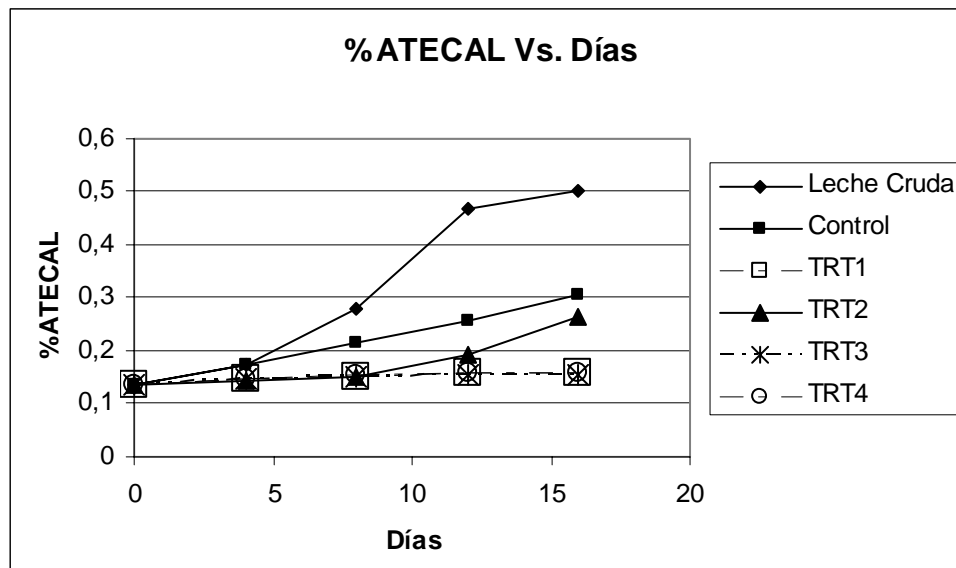
**Cuadro 5.** Análisis de acidez a través del tiempo

Tratamiento	%ATECAL (Separación de medias Tukey)				
	día 0	día 4	día 8	día 12	día 16
Leche cruda <sup>1</sup>	0.13	0.17	0.28	0.46	0.50
Control	0.13±0.005a	0.17±0.005 a	0.21±0.005a	0.25±0,015 a	0.30±0.032 a
50ppm Ap <sup>2</sup>	0.13±0.005 a	0.14±0.005 b	0.15±0.00 b	0.15±0.005 b	0.16±0.010 b
50ppm Dp <sup>3</sup>	0.13±0.005 a	0.14±0.005 b	0.15±0.00 b	0.19±0.04 b	0.26±0.098 ab
150ppm Ap <sup>2</sup>	0.13±0.005 a	0.14±0.005 b	0.15±0.00 b	0.15±0.005 b	0.15±0.005 b
150ppm Dp <sup>3</sup>	0.13±0.005 a	0.14±0.005 b	0.15±0.05 b	0.15±0.005 b	0.15±0.005 b

<sup>1</sup>No forma parte del diseño experimental

<sup>2</sup>Antes de pasteurización <sup>3</sup>Después de pasteurización

Tratamientos seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ )



**Figura 3.** Relación Acidez-Tiempo

La figura 3 evidencia el efecto conservante de la nisina en función del porcentaje de ATECAL en los cuatro tratamientos a lo largo del tiempo, la diferencia entre la acidez de los tratamientos a través del tiempo no fue sustancial, También se puede observar el incremento de la acidez tanto del control como de la leche cruda con valores por encima de los tratamientos.

## 4.2. COLOR

El análisis estadístico no determinó inferencia del tiempo en el color de las muestras. El valor  $L^*$  que determina la intensidad de luz entre blanco y negro resultó estadísticamente igual ( $P > 0.05$ ) entre el control y los tratamientos durante los 16 días que duró el experimento (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Análisis de color valor,  $L^*$ .

Tratamiento	Color, valor $L^*$ (Separación de medias Tukey)				
	día 0	día 4	día 8	día 12	día 16
Leche cruda <sup>1</sup>	90.55	90.37	90.29	90.58	90.33
Control	90.82±1.32 a	91.42±0.55 a	91.39±0.54 a	91.07±0.31 a	91.16±0.07 a
50ppm Ap <sup>2</sup>	90.79±1.42 a	91.76±0.17 a	91.82±0.30 a	91.61±0.49 a	91.52±0.59 a
50ppm Dp <sup>3</sup>	90.73±1.20 a	91.72±0.26 a	91.80±0.27 a	91.72±0.36 a	91.54±0.60 a
150ppm Ap <sup>2</sup>	90.77±1.24 a	91.63±0.18 a	91.54±0.25 a	91.34±0.44 a	91.31±0.42 a
150ppm Dp <sup>3</sup>	90.79±1.24 a	91.64±0.14 a	91.77±0.34 a	91.63±0.43 a	91.58±0.50 a

<sup>1</sup>No forma parte del diseño experimental

<sup>2</sup>Antes de pasteurización <sup>3</sup>Después de pasteurización

Tratamientos seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ )

Los valores a\* (rojo-verde) y b\* (azul-amarillo) no mostraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) en ninguno de los tratamientos durante la duración del experimento (cuadros 7 y 8).

**Cuadro 7.** Análisis de color, valor a\*

Tratamiento	Color, valor a* (Separación de medias Tukey)				
	día 0	día 4	día 8	día 12	día 16
Leche cruda <sup>1</sup>	-1.77	-1.75	-1.75±	-1.74	-1.72
Control	-1.64±0.60a	-2.16±0.60a	-1.84±0.42a	-2.25±0.55a	-2.21±0.51a
50ppm Ap <sup>2</sup>	-1.56 ±0.34a	-2.15±0.45a	-1.71±0.86a	-2.23±0.22a	-2.23±0.33a
50ppm Dp <sup>3</sup>	-1.79 ±0.57a	-2.16±0.52a	-2.33±0.36a	-2.25±0.23a	-2.23±0.21a
150ppm Ap <sup>2</sup>	-1.58±0.45a	-2.17±0.51a	-2.41±0.31a	-2.39±0.28a	-2.21±0.42a
150ppm Dp <sup>3</sup>	-1.59±0.47a	-2.09±0.62a	-2.19±0.18a	-2.14±0.14a	-2.04±0.26a

<sup>1</sup>No forma parte del diseño experimental

<sup>2</sup>Antes de pasteurización <sup>3</sup>Después de pasteurización

Tratamientos seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P\leq 0.05$ )

**Cuadro 8.** Análisis de color, valor b\*

Tratamiento	Color, valor b* (Separación de medias Tukey)				
	día 0	día 4	dia8	dia12	dia16
Leche cruda <sup>1</sup>	13.03	13.93	14.10	14.05	14.16
control	12.99±0.01a	13.68±0.24a	13.77±0.32a	13.71±0.33a	14.00±0.26a
50ppm Ap <sup>2</sup>	13.12±0.36a	13.87±0.44a	13.95±0.16a	14.06±0.30a	14.20±0.36a
50ppm Dp <sup>3</sup>	12.94±0.01a	13.79±0.44a	13.93±0.22a	13.91±0.27a	14.26±0.19a
150ppm Ap <sup>2</sup>	13.00±0.16a	13.79±0.53a	13.78±0.38a	13.71±0.38a	14.08±0.38a
150ppm Dp <sup>3</sup>	12.93±0.23a	13.69±0.60a	13.95±0.13a	14.16±0.24a	14.41±0.13a

<sup>1</sup>No forma parte del diseño experimental

<sup>2</sup>Antes de pasteurización <sup>3</sup>Después de pasteurización

Tratamientos seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P\leq 0.05$ )

#### 4.3. VISCOSIDAD

La viscosidad de las muestras, expresada en centipoise, fue medida con un viscosímetro Brookfield, utilizando el acople #1 para fluidos de baja viscosidad, a una velocidad de 100rpm y con una temperatura constante de las muestras de  $23\pm 0.5^\circ\text{C}$ . La viscosidad del control y los tratamientos con nisina no fue significativamente diferente ( $P>0.05$ ) durante los 16 días en que se evaluó. La leche cruda, evaluada como punto de comparación adicional al control y los tratamientos incrementó su acidez a lo largo de los 16 días del experimento (cuadro 7). Se puede afirmar que independientemente de la nisina agregada, el tratamiento térmico logró controlar el crecimiento de bacterias causantes de la viscosidad, como ser: *Alcaligenes*, *Streptococcus*, algunas especies de *Lactobacillus* (Walstra et al,2001), por mencionar las más importantes.

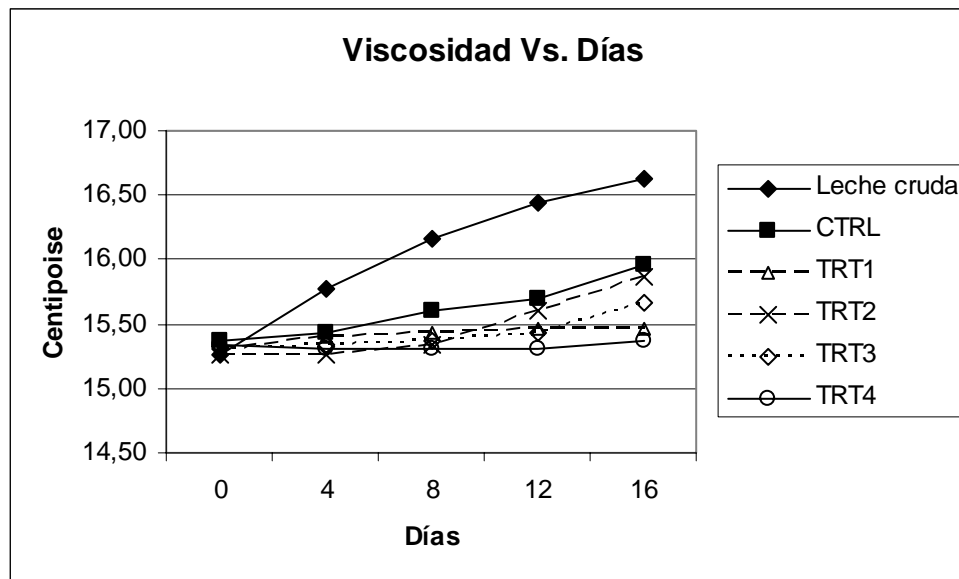
**Cuadro 9.** Análisis de viscosidad a través del tiempo

Viscosidad en Cp (Separación de Medias Tukey)					
Tratamiento	día 0	día 4	día8	día12	día16
Leche cruda <sup>1</sup>	15.26	15.76	16.15	16.43	16.63
Control	15.36±0.15 a	15.43±0.20 a	15.60±0.20 a	15.70±0.20 a	15.96±0.40 a
50ppm Ap <sup>2</sup>	15.30±0.17 a	15.40±0.26 a	15.43±0.28 a	15.46±0.23 a	15.46±0.23 a
50ppm Dp <sup>3</sup>	15.26±0.15 a	15.26±0.15 a	15.33±0.20 a	15.60±0.34 a	15.86±0.57 a
150ppm Ap <sup>2</sup>	15.30±0.17 a	15.33±0.20 a	15.36±0.25 a	14.43±0.25 a	15.66±0.64 a
150ppm Dp <sup>3</sup>	15.33±0.15 a	15.30±0.17 a	15.30±0.17 a	15.30±0.17 a	15.36±0.20 a

<sup>1</sup>No forma parte del diseño experimental

<sup>2</sup>Antes de pasteurización <sup>3</sup>Después de pasteurización

Tratamientos seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes ( $P \leq 0.05$ )



**Figura 5.** Relación Viscosidad-Tiempo

En la figura 5, se observa el incremento sustancial de la viscosidad de la leche cruda, mientras la viscosidad del control y los tratamientos con nisina no aumentó sustancialmente durante los 16 días que duró el experimento.

#### 4.4. CONTEO BACTERIAL

Comparando el logaritmo de unidades formadoras de colonia (UFC) en el control y los tratamientos (cuadro 10) se observó que la nisina aplicada logró disminuir el crecimiento bacteriano si se comparan los valores de estos con la leche cruda, no obstante, el análisis estadístico no determinó diferencias entre la cantidad de UFC presentes en los tratamientos.

En consecuencia, si bien el efecto de la nisina sobre bacterias de la especie *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pediococcus* y *Lactobacillus* se hizo evidente gracias a la disminución del ácido láctico presente en las muestras con nisina, el análisis microbiológico demuestra que bacterias de este tipo no son las únicas presentes en la leche, esto explica el porque de la igualdad entre la cantidad de UFC de todas las muestras.

**Cuadro 10.** Conteo Bacterial a través del tiempo (Log UFC/ml)

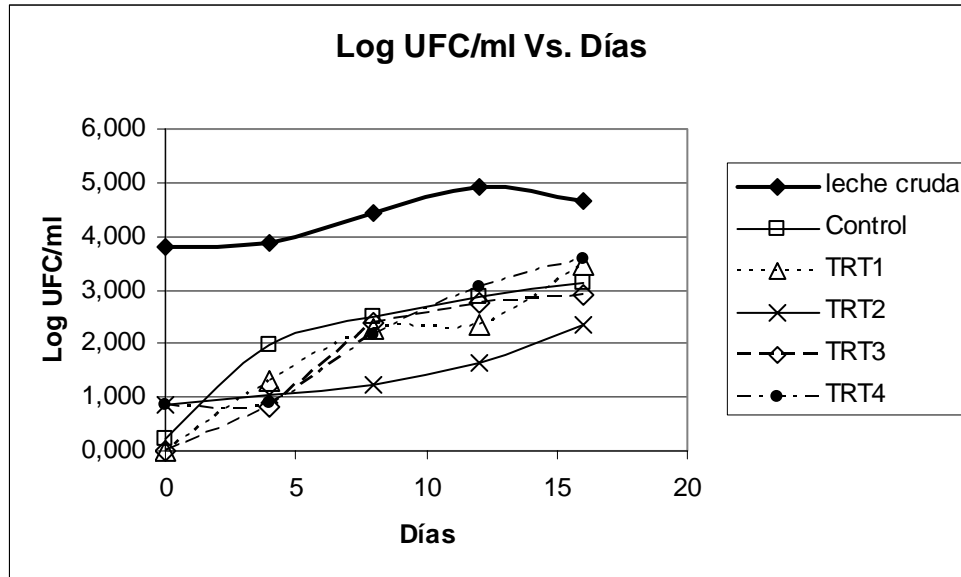
Tratamiento	Log UFC/ml (Separación de medias Tukey)				
	día 0	día 4	día8	día12	día16
Leche cruda <sup>1</sup>	3.802	3.874	4.437	4.937	4.657
control	0.233±0.40a	1.970±1.77a	2.511±2.18a	2.875±2.52a	3.123±0.344a
50ppm Ap <sup>2</sup>	0.000±0.00a	1.315±2.27a	2.285±2.07a	2.345±2.13a	3.465±0.80a
50ppm Dp <sup>3</sup>	0.867±1.50a	1.026±1.77a	1.240±2.14a	1.634±2.83a	2.347±2.03a
150ppm Ap <sup>2</sup>	0.000±0.00a	0.805±1.39a	2.383±2.35a	2.762±2.66a	2.907±2.58a
150ppm Dp <sup>3</sup>	0.871±1.50a	0.878±1.52a	2.149±2.00a	3.070±0.82a	3.584±1.19a

<sup>1</sup>No forma parte del diseño experimental

<sup>2</sup>Antes de pasteurización <sup>3</sup>Después de pasteurización

Tratamientos seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes (P≤0.05)

La figura 7 muestra las curvas de crecimiento de mesófilos aerobios totales durante los 16 días del experimento, en el control, los tratamientos y la leche cruda. Se puede apreciar que el tratamiento térmico logró disminuir el logaritmo UFC/ml del mismo modo, los tratamientos con nisina tuvieron un efecto adicional en la pasteurización logrando reducir el logaritmo de UFC/ml en los primeros 4 días del experimento.



**Figura 7.** Curvas de crecimiento bacteriano para mesófilos aerobios totales

#### 4.5. EVALUACIÓN SENSORIAL

Se realizó una prueba triangular a 35 panelistas, obteniendo 9 respuestas correctas y 26 repuestas incorrectas. Mediante la tabla G.7 para valores críticos de  $\chi^2$ , de Fisher y Yates, se determinó un  $\chi^2$  de 3,84 con un grado de libertad y  $p=0,05$ . Se comparó el resultado obtenido de la evaluación ( $\chi^2$  observado = 0,91) con el valor obtenido de la tabla. Determinando que los panelistas no detectaron diferencias entre las muestras

## 5. CONCLUSIONES

- La adición de nisina logró conservar la leche por 8 días más a comparación de la leche únicamente pasteurizada.
- No existieron cambios significativos en las características físicas y químicas evaluadas entre el control y la leche tratada con nisina
- Las concentraciones de nisina utilizadas no resultaron diferentes en cuanto a su actividad conservante.
- El momento de aplicación de la nisina en los tratamientos no influyó en las propiedades bacteriostáticas de la bacteriocina.
- Diferencias de sabor entre la leche tratada con nisina y la leche pasteurizada sin ningún tipo conservante no fueron detectadas por los consumidores.

## **6. RECOMENDACIONES**

- Realizar el mismo experimento con un número mayor de repeticiones para reducir la variabilidad de los datos y lograr mayor precisión en los resultados
- Puesto que las concentraciones de nisina utilizadas en el experimento no resultaron diferentes en cuanto a su actividad conservante, se recomienda realizar el mismo experimento con concentraciones de nisina menores, que permitan observar diferencias.
- Realizar un estudio de factibilidad para leche tratada con nisina para la planta de lácteos de Zamorano.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Arques, J. 2003. Tratamientos combinados de bacteriocinas y otros tratamientos inhibitorios para la mejora de la seguridad de los productos lácteos. Madrid, España. Departamento de Nutrición y bromatología. Universidad Complutense de Madrid. 198p.
- Cintas, L; Herranz, P. 2001. Review: Bacteriocins of Acid Lactic Bacteria. Food Science and Technology International. Consejo superior de investigaciones científicas. Madrid, España. 24p.
- Enamorado, M. 2003. Evaluación microbiológica de la leche cruda recibida y de la línea de procesamiento de la leche fluida en bolsa al 2% de grasa en la planta de lácteos de Zamorano. Tesis Ing. Agroindustrial. Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 43p.
- González, B; et al. 2005. Bacteriocinas de Probióticos. Mundo Alimentario. Facultad de salud Pública y Nutrición. Nuevo León, México. 19 p.
- Peña, P 2006. Vida de anaquel de la leche fluida en función del conteo microbiano inicial. Tesis Ing. Agroindustrial. Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 44p.
- Madrid, A; Madrid, J. 2001. Nuevo manual de industrias alimentarias. Madrid, España. A. Madrid Vicente Ediciones. 608 p.
- Morales, M. 2002. Evaluación microbiológica de seis productos lácteos y seis productos cárnicos elaborados en zamorano. Tesis Ing. Agroindustrial. Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 68p.
- Morales, S. 2005. Predicción de conteos microbiológicos en la leche cruda con base en la prueba de azul de metileno. Tesis Ing. Agroindustrial. Honduras, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 38p.
- Muñoz, J. 2006. Bacteriocinas: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano. Programa de ecología molecular y microbiana. Cuernavaca, Morelos. México. Universidad Nacional Autónoma de México. 20p.
- Muñoz, A. 2006. Optimización de la producción de la enterocina AS-48 y ensayo de su eficacia como bioconservante en alimentos. Granada, España. Departamento de Microbiología. Universidad de Granada. 304p.
- Seppo, S; von Wright, A. 1998. Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects. New York, E.E.U.U. Editorial Marcel Dekker. 617 p.

Walstra, P; Geurts, A; et al. 2001. Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos. Departamento de ciencia de los alimentos. Universidad Agrícola de Wageningen, Países Bajos. Editorial Acribia. 729 p.

## **8. ANEXOS**

**Anexo 1.** Análisis de costo para la aplicación de nisina en leche fluida

Frasco de nisina 500g	\$us135 (L 2565)
Aplicación de nisina	50g/1000kg de leche
Costo de procesar 1000kg de leche con nisina	\$us13.5 (L 257)
Costo de procesar 1kg de leche con nisina	\$us0.0135 (L 0.25)

Asumiendo que el costo de producir 1kg de leche es L12 entonces el nuevo costo de procesar leche con nisina sería L12.25