

Efecto de dos concentraciones de cloruro de sodio y dos temperaturas en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado

Ángel Jeanpier Acosta Chávez

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2015

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Efecto de dos concentraciones de cloruro de sodio y dos temperaturas en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado

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

Presentado por

Ángel Jeanpier Acosta Chávez

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2015

Efecto de dos concentraciones de cloruro de sodio y dos temperaturas en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado

Presentado por:

Ángel Jeanpier Acosta Chávez

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

Efecto de dos concentraciones de cloruro de sodio y dos temperaturas en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado.

Ángel Jeanpier Acosta Chávez

Resumen: En Latinoamérica es popular la elaboración de queso fresco estilo hispano a partir de leche pasteurizada; sin embargo, es un producto susceptible a crecimiento de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*. Se evaluó el efecto de dos concentraciones de cloruro de sodio (1.5 y 2.5%) y dos temperaturas (4 y 7 °C) en crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado durante 15 días de almacenamiento. Se elaboró el queso fresco pasteurizado y se inoculó con una concentración inicial de 10^4 UFC/g. Se determinó la tasa máxima de crecimiento a partir del modelo matemático de crecimiento microbiológico de Baranyi y Roberts proporcionado por la aplicación en línea DMFit y el programa predictivo para crecimiento de *Listeria monocytogenes* disponible en ComBase. Mediante esta información se obtuvo una tasa de crecimiento de $0.008 \log_{10}(\text{UFC/g} \times \text{h})$ con 2.5% de cloruro de sodio a 4 °C, asegurando una concentración de $1.93 \log_{10}(\text{UFC/g})$ en día 15, menor a dos logaritmos límite permisibles para consumo humano. Se concluyó que existió efecto por temperatura ($P < 0.05$) y no por concentración cloruro de sodio en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado. Se recomienda mantener el queso fresco pasteurizado a una temperatura menor o igual a 4 °C en toda la cadena de frío, asegurando que no exista una multiplicación acelerada de las células de *Listeria monocytogenes*.

Palabras clave: Lácteos, modelo predictivo, patógenos, psicrótrofos, sobrevivencia.

Abstract: The elaboration of Hispanic style cheese from pasteurized milk is very popular in Latin America; however, it is very susceptible to microbial growth, which represents a serious problem in the food industry among which is highlighted *Listeria monocytogenes*. The effect of two concentrations of sodium chloride (1.5 to 2.5%) and two temperatures (4 and 7 °C) in growth of *Listeria monocytogenes* in pasteurized fresh cheese during 15 days of storage was assessed. The pasteurized fresh cheese was prepared and inoculated with an initial concentration of 10^4 CFU/g. The maximum growth rate was determined by Baranyi and Roberts mathematical model of microbial growth provided by DMFit, an online application; and predictive program for *Listeria monocytogenes* growth available in ComBase. Based on this information a growth rate of $0.008 \log_{10}(\text{UFC/g} \times \text{h})$ h with 2.5% sodium chloride at 4 °C was obtained, ensuring a concentration of $1.93 \log_{10} \text{CFU/g}$ on day 15, less than 2 permissible logarithms for human consumption. It was concluded that effect of temperature was significant ($P < 0.05$) and the sodium chloride was not significant in the growth of *Listeria monocytogenes* in pasteurized fresh cheese. It is recommended to keep the pasteurized fresh cheese at a temperature less than or equal to 4 °C throughout the cold chain, avoiding a rapid multiplication of *Listeria monocytogenes* cells.

Keywords: Dairy, predictive model, pathogens, psychrotrophic, survival.

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.....	8
4. CONCLUSIONES	16
5. RECOMENDACIONES	17
6. LITERATURA CITADA.....	18
7. ANEXOS	21

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Tratamientos utilizados para medir efecto de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco pasteurizado.	3
2. Formulación de queso fresco pasteurizado con 1.5% de sal.	5
3. Formulación del queso fresco pasteurizado con 2.5% de sal.	5
4. Contenido de actividad de agua del queso fresco pasteurizado.	8
5. Contenido de humedad del queso fresco pasteurizado.	9
6. Nivel de pH del queso fresco pasteurizado.	10
7. Nivel de Textura del queso fresco pasteurizado.	11
8. Análisis de varianza para crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i>	12
9. Estimación de la tasa máxima de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco pasteurizado.	13
10. Estimación de la tasa máxima de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco pasteurizado utilizando el modelo estático de crecimiento predictivo ComBase.	14
11. Estimación de la concentración final de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco pasteurizado utilizando el modelo estático predictivo de ComBase.	15
Figuras	Página
1. Flujo de proceso para la elaboración de queso fresco pasteurizado.	4
2. Curva de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i>	12

Anexos	Página
1. Estimación de la tasa máxima de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco pasteurizado por repetición.....	21
2. Resumen ANDEVA de los análisis fisicoquímicos y microbiológicos realizados al queso fresco pasteurizado.....	22
3. Curva de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> correspondiente al tratamiento 1.....	23
4. Curva de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> correspondiente al tratamiento 2.....	24
5. Curva de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> correspondiente al tratamiento 3.....	25
6. Curva de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> correspondiente al tratamiento 4.....	26
7. Estimación de la tasa máxima de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> correspondiente al tratamiento 1 con el modelo estático disponible en ComBase.	27
8. Estimación de la tasa máxima de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> correspondiente al tratamiento 2 con el modelo estático disponible en ComBase.	27
9. Estimación de la tasa máxima de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> correspondiente al tratamiento 3 con el modelo estático disponible en ComBase.	28
10. Estimación de la tasa máxima de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> correspondiente al tratamiento 4 con el modelo estático disponible en ComBase.	28
11. Estimación de la concentración de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco pasteurizado correspondiente al tratamiento 1 con modelo estático disponible en ComBase.	29
12. Estimación de la concentración de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco pasteurizado correspondiente al tratamiento 2 con el modelo estático disponible en ComBase.	29
13. Estimación de la concentración de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco pasteurizado correspondiente al tratamiento 3 con el modelo estático disponible en ComBase.	30
14. Estimación de la concentración de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco pasteurizado correspondiente al tratamiento 4 con el modelo estático disponible en ComBase.	30

1. INTRODUCCIÓN

En Latinoamérica es popular la elaboración de queso fresco estilo hispano a partir de leche pasteurizada, obteniendo queso con textura quebradiza y suave (Leggett *et al.* 2011). El queso fresco se define como blanco y brillante, con alto contenido de humedad, por lo general se desmorona y no se funde, además se connota con un sabor moderadamente salado (Van Hekken *et al.* 2012). El queso fresco es obtenido a partir de un proceso de coagulación total o parcial de la leche por medio de la acción del cuajo u otros agentes coagulantes, y eliminación parcial del lactosuero (Scott *et al.* 1998).

Estudios realizados determinaron una caracterización para el queso fresco, con 46 a 57% de humedad, pH de 5.90 a 6.40 y 1 a 3% de sal (Van Hekken *et al.* 2012). El queso fresco tiene una vida de anaquel cercana a 20 días (Gomes *et al.* 2011). El queso fresco, por su alto contenido de humedad, pH casi neutro y contenido moderado de sal, es un medio propicio para el crecimiento de bacterias patógenas especialmente *Listeria monocytogenes* (Leggett *et al.* 2012). En algunos países estos quesos tienen un contenido de sal de 3 - 5%, lo cual no es suficiente para aumentar significativamente su intrínseca corta vida anaquel (Cunningham y Enrique 2000).

Los patógenos transmitidos por alimentos representan un grave problema en la industria de los alimentos, entre ellos destaca *Listeria monocytogenes* (Bernini *et al.* 2013) que ha tenido un gran desplazamiento a nivel mundial en diferentes tipos de alimentos, atribuyéndose principalmente a productos lácteos (Villalobos y Martínez 2007). El patógeno es causante de dos tipos de enfermedades transmitidas por alimentos, una grave, a veces mortal conocida como listeriosis que se transmite principalmente en mujeres embarazadas, niños recién nacidos y personas con enfermedades inmunocomprometidas (Jemmi y Stephan 2006). La otra enfermedad leve no invasiva se llama gastroenteritis listerial (FDA 2008), es una inflamación de la mucosa del estómago y del intestino delgado y grueso causando vómitos y diarrea.

En 1985 se produjo un brote de listeriosis atribuido a *Listeria monocytogenes* encontrada en queso suave de estilo hispano que fue preparado con leche sin pasteurizar, causando 142 casos de infección y un total de 48 muertos, por cuanto fue considerado como el mayor brote en queso suave en la historia (Uhlich *et al.* 2006). *Listeria monocytogenes* es la única especie de *Listeria* patógena que puede atacar contra la salud del hombre; es un microorganismo psicotrófico que puede multiplicarse en alimentos almacenados en condiciones de refrigeración (Lobacz y Kowalik 2014).

La supervivencia y crecimiento de *Listeria monocytogenes* depende de las condiciones de fabricación y almacenamiento para los quesos, incluso cuando el queso se almacena en temperatura de refrigeración (Bernini *et al.* 2013). El patógeno crece en un amplio rango

de temperatura de uno hasta 43 °C (Cole *et al.* 1989), siendo un patógeno de suma relevancia para alimentos refrigerados.

La aplicación de tratamientos térmicos elimina al patógeno en la leche cruda, pero durante la manipulación de moldeado del queso, almacenamiento y en contacto con el medio ambiente puede existir contaminación cruzada (Bernini *et al.* 2013). El patógeno tiene la capacidad de formar biopelículas en las máquinas procesadoras de alimentos, permitiéndole tener una supervivencia a largo tiempo y por ende darse posibles contaminaciones de productos (Lobacz y Kowalik 2014).

Durante siglos se ha utilizado la sal como un conservante para alimentos que sirve para mantener propiedades físicas y microbiológicas de los alimentos. Pese a esto existen microorganismos capaces de crecer en altas concentraciones de cloruro de sodio como *Listeria monocytogenes* que alcanza un crecimiento con 10% de cloruro de sodio (Marzocca *et al.* 2004). Algunos patógenos toleran altas concentraciones del cloruro de sodio (Harper y Getty 2012), *Listeria monocytogenes* puede tolerar pero sin crecimiento hasta 25.5% de sal (Albrecht 2005).

Estudios demuestran que *Listeria monocytogenes* se desarrolla notablemente con una concentración de 2 - 2.5% de cloruro de sodio a una temperatura menor a 10 °C (Cole *et al.* 1989). Existen varias formas de determinar crecimiento de *Listeria monocytogenes* en diferentes alimentos, una de ellas obteniendo la tasa máxima de crecimiento en el tiempo, el dato se puede obtener a partir de modelos ya establecidos. ComBase es uno de los programas más utilizados para ver relaciones de comportamiento del patógeno en estudio, dentro de ComBase se encuentra la aplicación DMFit que es una aplicación utilizada para ajustar curvas bacterianas y se encuentra disponible en la página oficial de ComBase (www.ComBase.cc).

La tendencia actual en la industria alimentaria es la utilización de modelos predictivos enfocado a la inocuidad de los alimentos, con el fin de encontrar una respuesta rápida que tienen los microorganismos en los alimentos, permitiendo obtener resultados en un menor tiempo y reducir costos en análisis microbiológicos (Lobacz y Kowalik, 2014). El programa de predicción ComBase es una base de datos que permite una simulación de crecimiento en diferentes condiciones de varios microorganismos que incluye *Listeria monocytogenes*.

La finalidad de este proyecto de investigación fue evaluar el efecto de dos concentraciones de cloruro de sodio y dos temperaturas en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado. Por lo tanto, la investigación se fundamenta en los siguientes objetivos:

- Evaluar el efecto de dos concentraciones de cloruro de sodio y dos temperaturas en crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado.
- Predecir el comportamiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco con el uso de modelo predictivo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio. La investigación tuvo lugar en las instalaciones de la Planta de Lácteos, Laboratorio de Microbiología de Alimentos Zamorano (LMAZ) y Laboratorio de Análisis de Alimentos Zamorano (LAAZ). Las infraestructuras están localizadas en Departamento de Agroindustria Alimentaria Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano en el Departamento de Francisco Morazán, 32 km al este de Tegucigalpa, Honduras.

Diseño del estudio. El diseño experimental utilizado para determinar crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado fue bloques completos al azar (BCA) con arreglo factorial 2×2 (Cuadro 1), usando dos concentraciones de cloruro de sodio (1.5 o 2.5%) y dos temperaturas de almacenamiento (4 o 7 °C) por cada concentración de cloruro de sodio, analizando independiente para cada tratamiento. Se realizaron tres repeticiones para un total 60 unidades analizadas.

Cuadro 1. Tratamientos utilizados para medir efecto de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado.

Tratamientos	Parámetros Evaluados	
	Cloruro de sodio (%)	Temperatura (°C)
TRT 1	1.5	4
TRT 2	1.5	7
TRT 3	2.5	4
TRT 4	2.5	7

Elaboración del queso fresco pasteurizado. La leche tuvo origen en el establo de la Escuela Agrícola Panamericana y se estandarizó a 2.5% de grasa total y con un ATECAL de 0.14. El queso fresco pasteurizado se elaboró siguiendo las Buenas Prácticas de Higiene. Se realizaron tres tandas de queso fresco, utilizando 37 L de leche por tanda. Se trabajó de acuerdo al volumen y cantidades requeridas por cada repetición y tratamiento. Se pasteurizó a 63 °C durante 30 minutos. Luego se enfrió hasta 32 °C y se adicionó cloruro de calcio, cultivo láctico R-704 y cuajo (cuadro 2 y 3), la mezcla se dejó reposar 30 a 45 minutos. Se calentó lentamente durante 10 minutos y luego se agitó hasta llegar a 43 °C. Se eliminó un 30% del suero, se adicionó las concentraciones de cloruro de sodio requeridas por cada tratamiento. Se dejó reposar por 30 minutos y se colocó en moldes para su almacenamiento a 4 °C (Figura 1).

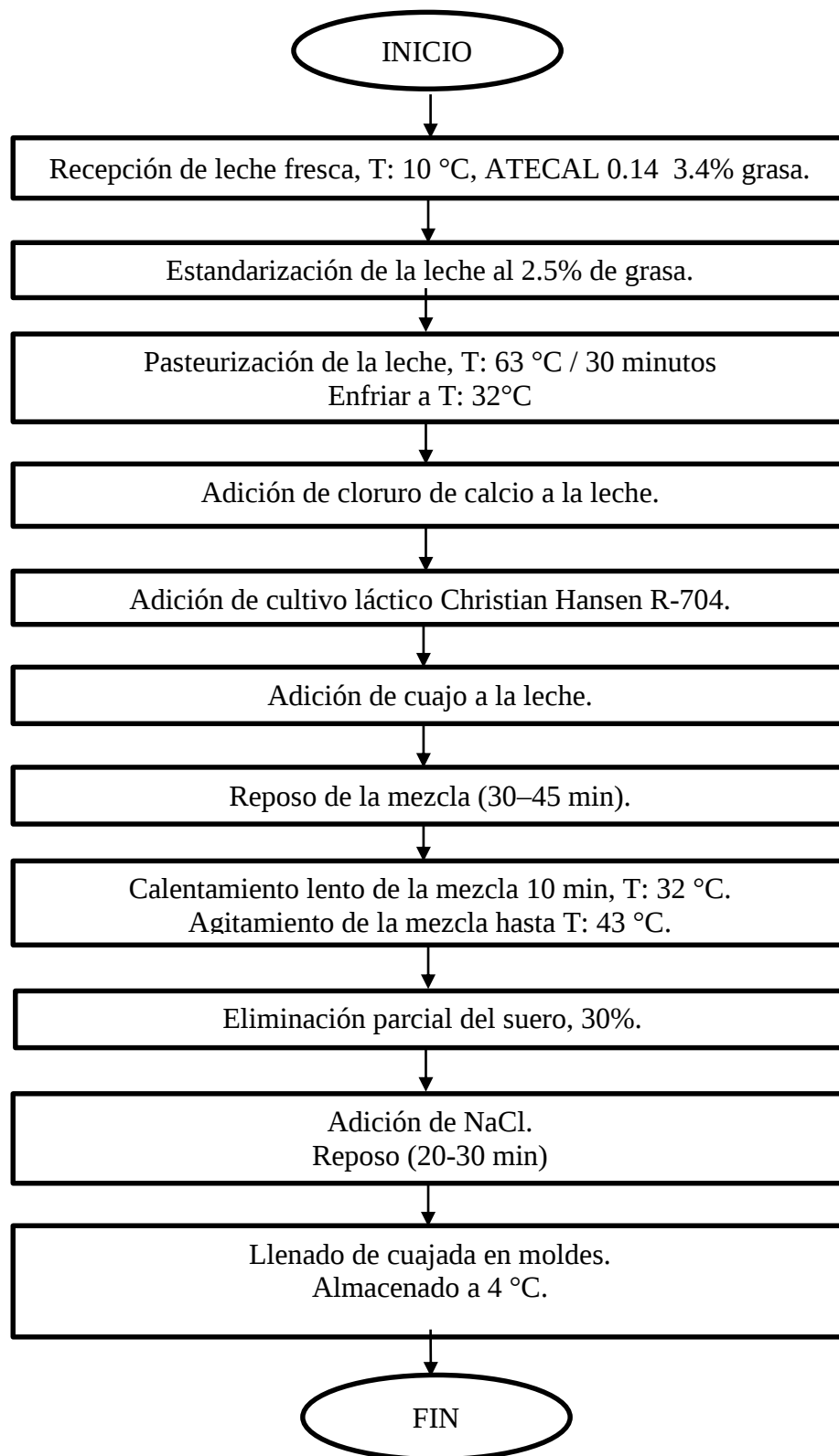


Figura 1. Flujo de proceso para la elaboración de queso fresco pasteurizado.

Cuadro 2. Formulación de queso fresco pasteurizado con 1.5% de sal.

Ingredientes	Cantidad	Unidad	%
Leche estandarizada al 2.5 % de grasa	9.25	Kg	98.50
Sal Refinada	0.13	Kg	1.50
Cloruro de Calcio	1.81	mL	0.02
Cultivo láctico R-704	4.50	mg	0.00
Cuajo	0.90	mL	0.00
Total	9.38	kg	100.00

Cuadro 3. Formulación del queso fresco pasteurizado con 2.5% de sal.

Ingredientes	Cantidad	Unidad	%
Leche estandarizada al 2.5 % de grasa	9.25	Kg	97.46
Sal Refinada	0.23	Kg	2.50
Cloruro de Calcio	1.81	mL	0.02
Cultivo láctico R-704	4.50	mg	0.00
Cuajo	0.90	mL	0.01
Total	9.48	kg	100.00

Análisis de humedad. Se midió la 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 (Latimer, 2012).

Análisis de actividad de agua. Se midió la actividad de agua con el uso del Aqualab®, siguiendo el método oficial AOAC 978.18 para determinación de actividad de agua (Latimer, 2012).

Análisis de pH. Se midió el pH final del queso utilizando un potenciómetro marca Thermo Scientific modelo Orion 5 Star. Se siguió el método oficial AOAC 981.12 para determinación de pH (Latimer, 2012).

Análisis de Textura. Se midió textura del queso fresco, midiendo la fuerza de corte en el Texturómetro Brookfield CT3 4500. Se usó un bloque con dimensiones de 2 x 2 x 1 cm con velocidad de 2 mm/s, guillotina de corte TA 7 (Ordoñez, 2012)

Descripción de cepas. Para la preparación del inóculo se utilizaron dos tipos de Cepas de *Listeria monocytogenes* (ATCC® 13932™ y ATCC® 19112™). Para la activación se utilizó caldo soya tripticasa con extracto de levadura en tubos de ensayo, como medio de enriquecimiento para las colonias de las cepas, los tubos se incubaron a 35 ± 2 °C por 24 horas. Luego se aislaron los dos tipos de cepas en diferentes platos Petri, con un asa estéril se tomó una gota biconvexa y se estrió sobre Agar Soya Tripticasa con Extracto de Levadura, se incubó a 35 ± 2 °C por 24 horas. Ulterior se tomó una colonia aislada de cada plato con las cepas y se colocaron en caldo de soya tripticasa con extracto de levadura para enriquecimiento de las colonias puras.

Para la inoculación del queso fresco se tomó 0.5 mL de caldo de soya tripticasa con extracto de levadura con la cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC® 13932™ y 0.5 mL con la cepa ATCC® 19112™, para diluirlos en un tubo con 9 mL de buffer de fosfato. Se colocaron 20 µL de buffer de fosfato con la mezcla de cepas de *Listeria monocytogenes* en 10 g de muestra. Se realizó este procedimiento con el fin de obtener un queso fresco con una carga bacteriana inicial de 4 logaritmos. Cuando se obtuvo el queso fresco inoculado, se rotularon con la temperatura a recibir y el tiempo de almacenamiento. Se realizaron muestras de 10 ± 0.5 g para cada uno de los diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento, con el fin de reducir la variabilidad de peso por muestra.

Análisis microbiológico. Se tomó una muestra almacenada por cada tratamiento en el día especificado para análisis. Se colocaron 90 mL de buffer de fosfato por cada muestra de 10 g y se homogenizaron durante un minuto en bolsas plásticas en el Stomacher, dando como resultado la dilución 10^{-1} . A partir de esta dilución se realizaron dos diluciones más 10^{-2} y 10^{-3} y se utilizó la técnica de siembra por superficie en Agar Oxford con suplemento. Los platos fueron incubados a 37 °C por 24 horas para el posterior conteo de unidades formadoras de colonias.

Análisis estadístico para análisis microbiológicos. Se realizó una separación de medias LSMEANS para los valores obtenidos de la tasa máxima de crecimiento de *Listeria monocytogenes*, el nivel de significancia fue $P < 0.05$, se utilizó el programa Sistema de Análisis Estadístico (SAS 9.3). La separación de medias LSMeans se llevó a cabo con el objetivo de determinar diferencias significativas en la tasa máxima de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en cada tratamiento.

Análisis estadístico para análisis físico-químicos. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con medias ajustadas utilizando el modelo lineal general (GLM), y separación de medias LSMeans, en el Sistema de Análisis Estadístico (SAS) versión 9.3 con un nivel de significancia de $P < 0.05$ (Base SAS® 9.3).

Estimación de la tasa máxima de crecimiento. Se estimó la tasa máxima de crecimiento de *Listeria monocytogenes* para cada tratamiento utilizando la aplicación en línea DMFit (www.ComBase.cc). Se generó un modelo para cada tratamiento. El modelo se construyó introduciendo los tiempos y los logaritmos de UFC de *Listeria monocytogenes* para cada tratamiento, graficando los logaritmos en función del tiempo. A partir de esta curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes*, se obtuvo la tasa máxima de crecimiento; el modelo que más se ajustó a cada tratamiento y arrojó el coeficiente de determinación denominado R^2 para cada modelo.

Estimación de la tasa máxima de crecimiento con ComBase. Se estimó por medio del modelo de crecimiento predictivo para *Listeria monocytogenes* de Combase, a partir de la obtención de la tasa máxima de crecimiento y la fase Lag en la aplicación en línea DMFit. Con los datos obtenidos se determinó el estado fisiológico inicial de las células bacterianas y se ingresaron junto con los promedios de los parámetros evaluados del alimento para obtención del dato requerido. El programa se encuentra disponible de forma gratuita en la página oficial de ComBase, programa avalado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés).

El estado fisiológico de las células se obtiene a partir de la ecuación 1:

$$\text{EFC} = 10^{(-Lag \times \text{tasa máxima de crecimiento})} \quad [1]$$

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de actividad de agua (a_w) del queso fresco pasteurizado. En el día cero no se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos ($P < 0.05$), debido a que la diferencia en concentración de cloruro de sodio aplicado no fue suficiente para contribuir en la depresión de la actividad de agua entre tratamientos (cuadro 4). En los días siete y quince se observaron diferencias significativas entre tratamientos, existiendo un aumento en actividad de agua en los tratamientos con 1.5% de cloruro de sodio a 4 °C, 1.5% de cloruro de sodio a 7 °C y 2.5% de cloruro de sodio a 7 °C. El tratamiento con 2.5% a 4 °C mantuvo igual contenido de actividad de agua en el queso fresco al día 7, esto porque a mayor concentración de cloruro de sodio hubo mayor estabilidad entre las moléculas de agua en el sólido, esto concuerda con la literatura reportada (Heng *et al.* 1990). Por lo tanto al existir mayor ligación de agua hay estabilidad en el contenido de actividad de agua.

Para el tratamiento con 2.5% de cloruro de sodio a 7 °C existió un incremento en actividad de agua a pesar de contener la misma concentración de cloruro de sodio que el tratamiento con 2.5% a 4 °C. El posible cambio en actividad de agua se atribuye a la exposición del queso fresco a temperatura ambiente sin empaque durante el proceso de análisis fisicoquímicos, donde posiblemente hubo mayor incorporación de vapor de agua en el producto, resultando en un equilibrio de humedad con el ambiente afectando la actividad de agua. Se observaron diferencias significativas en el tiempo, atribuyéndose los posibles cambios en actividad de agua que durante el almacenamiento del queso fresco la humedad del producto tiende a equilibrarse con la humedad relativa del aire del cuarto de almacenamiento, provocando un aumento de actividad de agua del producto.

Cuadro 4. Contenido de actividad de agua del queso fresco pasteurizado.

Tratamientos	Media $\pm$ D.E		
	DIA 0	DIA 7	DIA 15
1.5% NaCl, 4 °C	0.96 $\pm$ 0.002 ^{a, A}	0.97 $\pm$ 0.005 ^{a, AB}	0.97 $\pm$ 0.006 ^{a, B}
1.5% NaCl, 7 °C	0.96 $\pm$ 0.002 ^{a, A}	0.97 $\pm$ 0.007 ^{a, A}	0.97 $\pm$ 0.006 ^{a, B}
2.5% NaCl, 4 °C	0.96 $\pm$ 0.007 ^{a, A}	0.96 $\pm$ 0.004 ^{b, B}	0.97 $\pm$ 0.005 ^{a, B}
2.5% NaCl, 7 °C	0.96 $\pm$ 0.007 ^{a, A}	0.97 $\pm$ 0.006 ^{a, A}	0.97 $\pm$ 0.006 ^{a, B}
CV (%)	0.51	0.17	0.17

CV: Coeficiente de variación.

D.E: Desviación estándar.

abc Las medias con diferentes letras minúsculas en la misma columna indican que hubo diferencias significativas ($P < 0.05$).

ABC Las medias con diferentes letras mayúsculas en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Análisis de humedad del queso fresco pasteurizado. En el día cero se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos (cuadro 5), existiendo un mayor contenido de humedad en los tratamientos con una concentración de 2.5% de cloruro de sodio. Esto debido a que el cloruro de sodio favoreció la ganancia de sólidos con menor pérdida de agua (Heng *et al.* 1990). En el día 7 y 14 no se observaron diferencias significativas entre tratamientos, debido a las condiciones de almacenamiento del queso fresco pasteurizado, donde la humedad del producto posiblemente se equilibró con la humedad del ambiente por exposición del producto con el ambiente durante los análisis fisicoquímicos. Como resultado del equilibrio no se observaron diferencias en humedad en los tratamientos.

Se observaron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) en el tiempo para el tratamiento con 1.5% de cloruro de sodio y 7 °C al día 15 (cuadro 5). El posible cambio en humedad se atribuyó a error experimental al momento de realizar los análisis fisicoquímicos, las muestras se dejaron a temperatura ambiente por varias horas hasta realizar los análisis de humedad en el queso fresco. La temperatura de exposición del queso fresco pasteurizado produjo un equilibrio de humedad en donde existió una mayor ganancia de humedad por la superficie del queso (Simal 2001)

Cuadro 5. Contenido de humedad del queso fresco pasteurizado.

Tratamientos	Media $\pm$ D.E (%)		
	DIA 0	DIA 7	DIA 15
1.5% NaCl, 4 °C	49.90 $\pm$ 1.40 ^{b, A}	50.20 $\pm$ 1.10 ^{a, A}	52.16 $\pm$ 1.17 ^{a, A}
1.5% NaCl, 7 °C	49.90 $\pm$ 1.40 ^{b, A}	51.11 $\pm$ 2.13 ^{a, AB}	52.82 $\pm$ 1.35 ^{a, B}
2.5% NaCl, 4 °C	50.49 $\pm$ 1.38 ^{a, A}	51.43 $\pm$ 1.74 ^{a, A}	51.88 $\pm$ 0.57 ^{a, A}
2.5% NaCl, 7 °C	50.49 $\pm$ 1.38 ^{a, A}	50.37 $\pm$ 1.22 ^{a, A}	52.16 $\pm$ 0.46 ^{a, A}
CV (%)	2.76	3.02	1.73

CV: Coeficiente de variación.

D.E: Desviación estándar.

abc Las medias con diferentes letras minúsculas en la misma columna indican que hubo diferencias significativas ($P < 0.05$).

ABC Las medias con diferentes letras mayúsculas en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Análisis de pH del queso fresco pasteurizado. Se observaron diferencias estadísticas en pH entre tratamientos en el día cero de la preparación del queso fresco, atribuyéndose esta diferencia en tratamientos debido al contenido de cloruro de sodio aplicado a cada queso (cuadro 6). El contenido de cloruro de sodio influyó en la acidez del producto, entre más cloruro de sodio aplicado menor va ser la acidez en quesos (Fox *et al.* 2000). Se observó que en los tratamientos con un mayor contenido de cloruro de sodio el pH se acerca más a la escala neutral. En el día siete y catorce no se observaron diferencias significativas entre tratamientos.

No se observaron diferencias significativas en el tiempo, excepto en el tratamiento con 2.5% de cloruro de sodio a 7° C (cuadro 6). Esto a pesar de que en todos los tratamientos

existió descenso en pH por presencia de Bacterias Ácido-Lácticas, este tratamiento favoreció para un mejor desarrollo de estas bacterias, debido a que se caracterizan por ser halófilas y la temperatura de 7 °C fue más favorable durante el almacenamiento del queso fresco pasteurizado.

Cuadro 6. Nivel de pH del queso fresco pasteurizado.

Tratamientos	Media $\pm$ D.E		
	DIA 0	DIA 7	DIA 15
1.5% NaCl, 4 °C	6.23 $\pm$ 0.15 ^{b, A}	5.92 $\pm$ 0.46 ^{a, A}	5.74 $\pm$ 0.60 ^{a, A}
1.5% NaCl, 7 °C	6.23 $\pm$ 0.15 ^{b, A}	5.83 $\pm$ 0.49 ^{a, A}	5.76 $\pm$ 0.53 ^{a, A}
2.5% NaCl, 4 °C	6.32 $\pm$ 0.16 ^{a, A}	6.27 $\pm$ 0.09 ^{a, A}	6.06 $\pm$ 0.24 ^{a, A}
2.5% NaCl, 7 °C	6.32 $\pm$ 0.16 ^{a, A}	6.09 $\pm$ 0.11 ^{a, AB}	6.01 $\pm$ 0.14 ^{a, B}
CV (%)	2.46	3.76	3.87

CV: Coeficiente de variación.

D.E: Desviación estándar.

abc Las medias con diferentes letras minúsculas en la misma columna indican que hubo diferencias significativas ($P < 0.05$).

ABC Las medias con diferentes letras mayúsculas en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Análisis de textura. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos y en el tiempo (cuadro 7). Esto debido a que las concentraciones de cloruro de sodio y las temperaturas de almacenamiento no fueron significativas para observar diferencias en textura. La textura se ve afectado por su composición fisicoquímica, entre los principales; está el contenido de proteína y humedad (Jaros 2001). Se observó que el alto contenido de humedad (cuadro 5) influyó en la textura del queso fresco obteniendo un queso suave. Así mismo el pH casi neutro (cuadro 6) favoreció la estabilidad de la textura del queso. (Fox *et al.* 1996).

Se puede observar que existe un alto coeficiente de variación entre los tratamientos, estos valores pudieron estar influenciados por la tecnología de procesamiento del queso fresco pasteurizado. Además el queso presenta una estructura compleja con diferencias aun dentro de una misma variedad de queso, vinculados a factores de composición y cambios durante la maduración (Juan *et al.* 2007).

Cuadro 7. Nivel de Textura del queso fresco pasteurizado.

Tratamientos	Media $\pm$ D.E (N)		
	DIA 0	DIA 7	DIA 15
1.5% NaCl, 4 °C	3.13 $\pm$ 1.19 ^{a, A}	2.77 $\pm$ 1.18 ^{a, A}	2.62 $\pm$ 1.00 ^{a, A}
1.5% NaCl, 7 °C	3.13 $\pm$ 1.19 ^{a, A}	2.68 $\pm$ 1.33 ^{a, A}	2.67 $\pm$ 1.40 ^{a, A}
2.5% NaCl, 4 °C	3.04 $\pm$ 1.34 ^{a, A}	3.24 $\pm$ 1.30 ^{a, A}	2.75 $\pm$ 0.55 ^{a, A}
2.5% NaCl, 7 °C	3.04 $\pm$ 1.32 ^{a, A}	2.50 $\pm$ 0.42 ^{a, A}	3.01 $\pm$ 1.10 ^{a, A}
CV (%)	41.01	37.02	36.5

CV: Coeficiente de variación.

D.E: Desviación estándar.

abc Las medias con diferentes letras minúsculas en la misma columna indican que hubo diferencias significativas (P< 0.05).

ABC Las medias con diferentes letras mayúsculas en la misma fila indican diferencias significativas (P <0.05).

Determinación de crecimiento de *Listeria monocytogenes*. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos en el día cero, tres y nueve, debido a que el patógeno se encontró en una fase de adaptación al medio denominado fase “Lag o de Latencia” (cuadro 8). En esta fase aparentemente no hay crecimiento del microorganismo aunque existe actividad metabólica (García 2005). En el día nueve se observaron diferencias significativas entre tratamientos, esto debido a que el patógeno se encontró en la fase exponencial de la curva de crecimiento y las células comenzaron a dividirse.

En esta fase las bacterias son susceptibles a cambios de condiciones adversas al medio (Tortora *et al.* 2007). Atribuyéndose las diferencias en crecimiento del patógeno a las temperaturas de almacenamiento del queso fresco (4 ó 7 °C) y a las concentraciones de cloruro de sodio (1.5 ó 2.5%) aplicados a los tratamientos. En el día 9 existió un incremento más acelerado en logaritmos de unidades formadoras de colonias por gramo con 1.5% de cloruro de sodio a 7 °C. En el día 15 se presentaron diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05) (cuadro 8) en la aplicación de temperaturas, pero no hubo diferencias significativas por concentración de cloruro de sodio.

Se observó un mayor crecimiento en logaritmos de unidades formadoras de colonias por gramo de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado almacenado a 7 °C, esto va de acuerdo con lo descrito en literatura (Martínez *et al.* 2011) que *Listeria monocytogenes* tiene un adecuado desarrollo a temperaturas de refrigeración pero entre más cercano a temperatura ambiente es mayor, con un crecimiento óptimo a 37 °C (Martínez *et al.* 2011) (figura 2). En este estudio la concentración de cloruro de sodio (1.5 y 2.5%), en general no fue significativo para crecimiento de *Listeria monocytogenes*, debido a que este patógeno puede crecer hasta una concentración de cloruro de sodio del 10% (Marzocca *et al.* 2004).

Se observaron diferencias significativas (P<0.05) en el tiempo debido a la temperatura, obteniendo un mayor crecimiento de *Listeria monocytogenes* a mayor temperatura de almacenamiento. No se encontraron diferencias significativas (P<0.05) por concentración de cloruro de sodio.

Cuadro 8. Análisis de varianza para crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

Tratamientos	Media $\pm$ D.E (UFC/g)				
	DÍA 0	DÍA 3	DÍA 6	DÍA 9	DÍA 15
1.5% NaCl, 4 °C	4.32 $\pm$ 0.27 ^{a, A}	4.40 $\pm$ 0.30 ^{a, AB}	4.41 $\pm$ 0.48 ^{a, AB}	4.79 $\pm$ 0.51 ^{c, B}	5.69 $\pm$ 0.27 ^{b, C}
1.5% NaCl, 7 °C	4.32 $\pm$ 0.27 ^{a, A}	4.71 $\pm$ 0.82 ^{a, A}	5.51 $\pm$ 0.94 ^{a, AB}	6.06 $\pm$ 0.44 ^{a, BC}	6.92 $\pm$ 0.65 ^{a, C}
2.5% NaCl, 4 °C	4.44 $\pm$ 0.19 ^{a, A}	4.43 $\pm$ 0.24 ^{a, A}	4.54 $\pm$ 0.32 ^{a, A}	4.70 $\pm$ 0.41 ^{c, A}	5.52 $\pm$ 0.37 ^{b, B}
2.5% NaCl, 7 °C	4.44 $\pm$ 0.19 ^{a, A}	4.33 $\pm$ 0.82 ^{a, A}	5.34 $\pm$ 0.70 ^{a, AB}	5.68 $\pm$ 0.52 ^{b, AB}	6.64 $\pm$ 0.50 ^{a, B}
CV (%)	2.21	11.86	11.67	2.80	5.84

CV: Coeficiente de variación.

D.E: Desviación estándar.

UFC= Unidades Formadoras de Colonias.

ABC Las medias con diferentes letras mayúsculas en la misma fila indican diferencias significativas (P < 0.05).

abc Las medias con diferentes letras minúsculas en la misma columna indican que hubo diferencias significativas (P < 0.05).

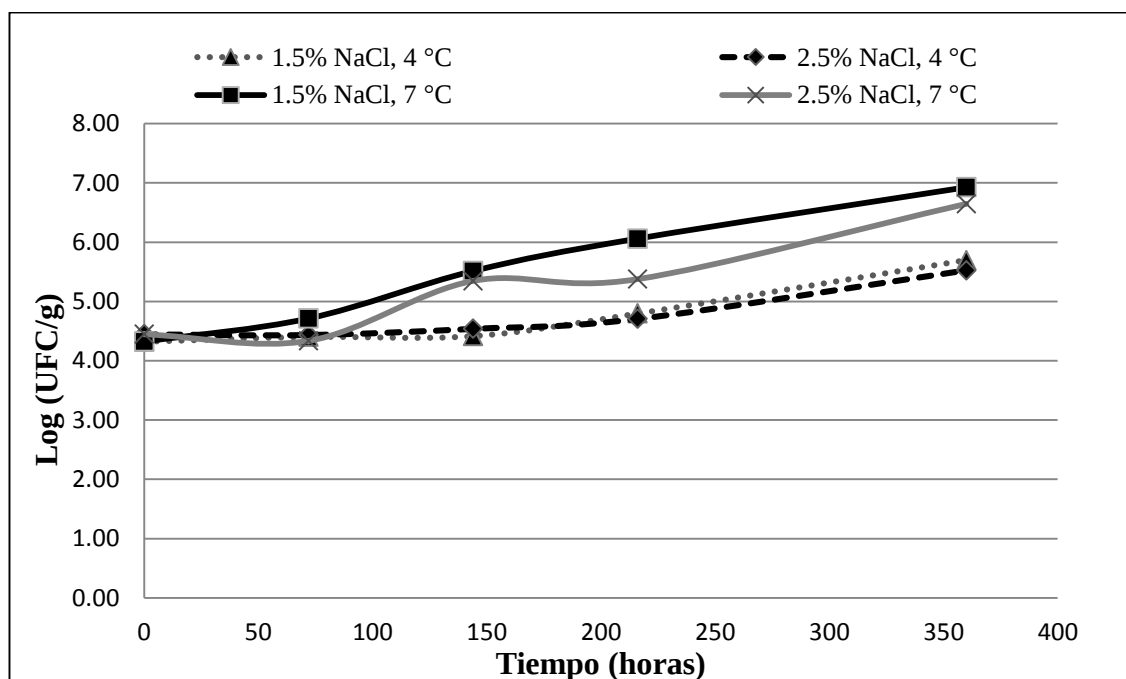


Figura 2. Curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

Estimación de la tasa máxima de crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Se observó que existe un ajuste en las curvas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en todos los tratamientos por medio del modelo de Baranyi y Roberts (cuadro 9), dado por un modelo matemático de crecimiento microbiológico en alimento, el cual modeló la variación logarítmica del número de células bacterianas en función del tiempo, observado mediante una curva sigmoidea un comportamiento más exacto de crecimiento del patógeno (Baranyi y Roberts 1994).

El modelo ajustado de Baranyi y Roberts para crecimiento de *Listeria monocytogenes* en este estudio va de acuerdo con lo reportado en literatura (Lobacz y Kowalik 2014), utilizando varios modelos predictivos para crecimiento de *Listeria monocytogenes* en productos lácteos a partir de leche UHT con varios contenidos de grasa durante almacenamiento (en un rango de 3 a 15 °C), donde los datos microbiológicos se ajustaron al modelo de Baranyi y Roberts (Lobacz y Kowalik 2014).

Se observó que el tratamiento con 2.5% de cloruro de sodio a 4 °C obtuvo la menor tasa de crecimiento de *Listeria monocytogenes*, (cuadro 8), debido a que las condiciones del medio en las que se encontraba el patógeno limitaron su velocidad de crecimiento. Contrario a esto se observó que el tratamiento con 1.5% de cloruro de sodio a 7 °C obtuvo la tasa máxima de crecimiento, esto gracias a que las células de *Listeria monocytogenes* tuvieron una mejor adaptación a las condiciones del medio donde se desarrollaron (cuadro 9).

Cuadro 9. Estimación de la tasa máxima de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado.

Tratamientos	Modelo	Tasa máxima de crecimiento $\log_{10}$ (UFC/g×h) ± D.E	R ²
1.5% NaCl, 4 °C	Baranyi y Roberts (modelo completo)	0.007 ± 0.002	0.99
1.5% NaCl, 7 °C	Baranyi y Roberts (modelo completo)	0.010 ± 0.001	0.99
2.5% NaCl, 4 °C	Baranyi y Roberts (sin asíntota)	0.006 ± 0.001	0.99
2.5% NaCl, 7 °C	Baranyi y Roberts (sin asíntota)	0.008 ± 0.002	0.88

D.E: Desviación estándar.

UFC= Unidades Formadoras de Colonias.

Estimación de la tasa máxima de crecimiento de *Listeria monocytogenes* por medio del modelo estático de crecimiento predictivo ComBase. Se observó que el tratamiento con 1.5% de cloruro de sodio y 7 °C para crecimiento de *Listeria monocytogenes* mantuvo el mejor estado fisiológico de las células (cuadro 10), debido a que la *Listeria monocytogenes* se encontró en condiciones de menor estrés como fueron la temperatura (7 °C) y la concentración de cloruro de sodio (1.5%), pudiendo adaptarse mejor al medio (Robinson *et al.* 1998). Otro parámetro que determinó un mejor estado fisiológico fue una alta concentración (cuatro logaritmos) con la que se inoculó el medio, dando lugar a una fase de latencia corta (Baranyi 1998).

Se ha demostrado que los modelos de predicción con exclusión de las interacciones entre los factores ambientales son en muchos casos precisos para predecir la tasa de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en alimentos. El modelo predictivo puede describir crecimiento bacteriano en un entorno donde la temperatura, pH y actividad de agua cambian con el tiempo (Baranyi y Roberts 1994). En simulaciones realizadas con el

uso de ComBase predictor en productos lácteos demostraron una aplicabilidad satisfactoria para crecimiento de *Listeria monocytogenes* (Lobacz y Kowalik 2014).

En la determinación de la tasa máxima de crecimiento de *Listeria monocytogenes* se hizo un promedio de las condiciones (actividades de agua y pH) encontradas en el queso fresco pasteurizado durante los 15 días de almacenamiento (cuadro 10). Se observó que mediante el modelo estático de crecimiento predictivo de ComBase se obtuvo la tasa máxima de crecimiento, como resultado el tratamiento con 2.5% de cloruro de sodio a 7 °C obtuvo la tasa de crecimiento más alta en comparación con los demás tratamientos. Esto debido a que las condiciones favorables en las que se desarrolló el patógeno como fueron un pH casi neutral y actividad de agua óptima, lo cual ayudó a una mejor adaptación de las células en la fase latencia (esto va acorde con lo descrito por Robinson en su estudio para crecimiento de *Listeria monocytogenes* bajo exposición de ciertas condiciones de ambiente) (Robinson *et al.*, 1998).

Cuadro 10. Estimación de la tasa máxima de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado utilizando el modelo estático de crecimiento predictivo ComBase.

Tratamientos	Concentración Inicial Log ₁₀ (UFC/g)	Estado Fisiológico de las células	pH	Actividad de agua	Tasa máxima de crecimiento log ₁₀ (UFC/g×h)
1.5% NaCl, 4 °C	4.32	0.08	5.96	0.97	0.009
1.5% NaCl, 7 °C	4.32	0.54	5.94	0.97	0.016
2.5% NaCl, 4 °C	4.45	0.14	6.21	0.96	0.008
2.5% NaCl, 7 °C	4.45	0.39	6.14	0.97	0.018

UFC= Unidades Formadoras de Colonias.

Estimación de la concentración de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado en el día 15. Se observa una mayor concentración en logaritmos de unidades formadoras de colonias al día 15 en el tratamiento con 2.5% de cloruro de sodio a 7 °C (cuadro 11). Esto se explica que a pesar de no tener el mejor estado fisiológico inicial de células en comparación con los otros tratamientos para un posterior crecimiento, la influencia que tiene el pH casi neutral y actividad de agua óptima ayuda a una mejor adaptación al medio. Esto afecta positivamente a la tasa máxima de crecimiento y por lo tanto hay un rápido crecimiento en la fase exponencial de *Listeria monocytogenes*.

La regulación de la FDA para detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo es de <1 UFC / 25 g de muestra (FDA 2011). Esto significa que si se toma este parámetro para conteo de *Listeria monocytogenes* en 1 g de muestra debe existir <0.04 UFC/g de muestra, este valor expresado en logaritmos da un valor de -1.39, indicando que un producto inocuo debería ser consumido sin ningún problema bajo esta condición. El Reglamento Técnico Centroamericano, tiene un límite máximo permitido de

Ausencia en 25 g para productos lácteos (RTCA 2009). Mientras que AESAN establece un límite máximo de 100 UFC/g para alimentos listos para el consumo, es decir no debe superar un máximo de dos logaritmos durante la vida de anaquel del producto, esto no aplica para embarazadas, lactantes o personas con enfermedades inmunocomprometidas (Martínez *et al.* 2011).

En Microbiología se expone el peor de los escenarios para contaminación de microorganismos en alimentos, por lo que se asume 1 UFC/g de muestra, esto es igual a 0 Log₁₀ UFC/g. Bajo las condiciones establecidas para estimación de la concentración de *Listeria monocytogenes* en queso fresco con el uso del modelo estático predictivo de ComBase se obtuvo que el tratamiento con 1.5% de cloruro de sodio a 4 °C excede el límite de crecimiento en el día 13, el tratamiento con 1.5% de cloruro de sodio a 7 °C excede el límite de crecimiento al día seis, el tratamiento con 2.5% de cloruro de sodio a 4 °C excede el límite de crecimiento en el día 16. El tratamiento con 2.5% de cloruro de sodio a 7 °C excede el límite de crecimiento en el día cinco (cuadro 11).

Cuadro 11. Estimación de la concentración final de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado utilizando el modelo estático predictivo de ComBase.

Tratamientos	Estado Fisiológico de las células	pH	Aw	Concentración log ₁₀ (UFC/g) al día 15	Tiempo que excede límites permisibles (días)
1.5% NaCl, 4 °C	0.08	5.96	0.97	2.24	13
1.5% NaCl, 7 °C	0.54	5.94	0.97	5.54	6
2.5% NaCl, 4 °C	0.14	6.21	0.96	1.93	16
2.5% NaCl, 7 °C	0.39	6.14	0.97	6.00	5

UFC= Unidades Formadoras de Colonias.

4. CONCLUSIONES

- Existió un efecto de retardo por temperatura y no por concentración de cloruro de sodio en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado.
- Los quesos elaborados con 2.5% de cloruro de sodio retardaron la fase de crecimiento exponencial en *Listeria monocytogenes*.
- La concentración de cloruro de sodio y temperatura (2.5% y 4 °C) aseguraron que los límites permisibles para crecimiento de *Listeria monocytogenes* no fueron sobrepasados en el queso fresco pasteurizado al día 15 de almacenamiento.

5. RECOMENDACIONES

- Mantener el queso fresco pasteurizado a una temperatura menor o igual a 4 °C en toda la cadena de frío, asegurando que no exista una multiplicación acelerada de las células de *Listeria monocytogenes*.
- Utilizar un listericida en caso de utilizar bajas concentraciones de cloruro de sodio (1.5 ó 2.5%) para asegurar inhibición de *Listeria monocytogenes* en caso de contaminación del producto.
- Evaluar la vida de anaquel para el queso fresco pasteurizado tomando en cuenta las propiedades físico-químicas y microbiológicas de este estudio.
- Validar este estudio mediante un monitoreo microbiológico en el almacenamiento de queso fresco pasteurizado en los diferentes puntos de ventas del país.

6. LITERATURA CITADA

Albrecht, J., 2005. *Listeria monocytogenes*. Food Safety. University of Nebraska-Lincoln. NE 68588 402-472-7211.

Base SAS® 9.3 TS1M2. SAS Institute Inc., Cary, NC.

Baranyi, J., Roberts, T. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Journal of food Microbiology* 23 (1994) 277-294 p.

Baranyi, J. 1998. Comparison of Stochastic and Deterministic Concepts of Bacterial Lag. *Journal of Theoretical Biology*, volume 192, 403-408 p.

Bernini, V., Bottari, B., Dalzini, E., Sgarbi, E., Lazzi, C., Neviani, E., Gatti, M. 2013. The presence genetic diversity and behaviour of *Listeria monocytogenes* in blue-veined cheese rinds during the shelf life. *Journal of Food Science*, volume 34, ol. ¿? 323-330 p.

Cole, M., Jones, M., Holyoak, C. 1989. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology* 1989 63-72 p.

ComBase 2015. ComBase Predictor. (En línea). Consultado el 18 de Agosto de 2015. Disponible en: www.combase.cc/es/.

Cunningham, I., Enrique, A., 2000. La estructura básica de un queso blanco Latinoamericano. Organización de los Estados Americanos OEA. Consultado el 15 de junio de 2015. Disponible en: <http://portal.oas.org/LinkClick.aspx?fileticket=O51xfikk6CU%3D&tabid=585>

FDA. 2008. Guidance for Industry: Control of *Listeria monocytogenes* in refrigerated or frozen ready-to-eat foods; Draft guidance. Consultado el 20 de Agosto de 2015. Disponible en: <http://www.fda.gov/food/guidanceregulation/guidancedocumentsregulatoryinformation/ucm073110.htm>.

FDA. 2011. Bam: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Consultado el 20 de Agosto de 2015. Disponible en: <http://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm071400.htm>

Fox, P., Guinee, T., Cogan, T., McSweeney, P. 2000. Fundamentals of Cheese Science. Food Science & Nutrition. Aspen Publishers, 1-9 p.

Fox, P., Guinee, T., Timothy, M., T., McSweeney, P. 2000. Fundamentals of Cheese Science. Aspen Publishers, 392-422 p.

García, V., Introducción a la Microbiología. 2005. Segunda edición, Editorial Universidad Estatal A Distancia (EUNED).

Gomes, A., Cruz, A., Cadena, R., Celeghini, R., Faria, H., Pollonio, M., Granato, D. 2011. Manufacture of low-sodium Minas fresh cheese: Effect of the partial replacement of sodium chloride with potassium chloride. Journal of Dairy Science, volume 94, 2701–2706 p.

Harper, N., Getty, K. 2012. Effect of Salt Reduction on Growth of *Listeria monocytogenes* in Meat and Poultry Systems. Journal of Food Science, volume 77. 669–674 p.

Heng, K., Gujilbert, S., Cub, J. 1990. Déshydratation osmotique de la papaye: Influence des variables du procede sur la qualité des produits finis. Food Sciences, 10: 831-848 p.

Jaros, D., Petrag, J., Rohm, H., Ulberth, F. 2001. Milk fat composition affects mechanical and rheological properties of processed cheese. Applied Rheology, volume. 11, No. 1, 19-25 p.

Juan, B., Trujillo, A., Guami, V., Buffa, M., Ferragut, V. 2007. Rheological, textural and sensory characteristics of high-pressure treated semi-hard ewe's milk cheeses. International Dairy Journal, volume 17. 248-254 p.

Jemmi, T., y Stephan, R., 2006. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. US National Library of Medicine National Institutes of Health 2006, 571-580 p.

Latimer, W. 2012. Official Methods of Analysis. AOAC International. Volume 2, nineteen edition.

Leggett, L., Tomasula, P., Van Hekken, D., Porto-Fett, A., Shoyer, B., Renye, J., Luchansky, J., Farkye, N. 2012. Effect of storage at 4 and 10 °C on the growth of *Listeria Monocytogenes* in and on queso fresco. Journal of Food Safety 32. 236-245 p.

Lobacz, A., y Kowalik, J., 2014. A predictive model for *Listeria monocytogenes* in UHT dairy products with various fat content during cold storage. Journal of Food Safety ISSN 1745-4565.

Martínez, A., Cepeda, A., Herrera, A., Alonso. C., 2011. Informe Del Comité Científico De La Agencia Española De Seguridad Alimentaria Y Nutrición (Aesan) en relación a los estudios de vida útil para *Listeria Monocytogenes* en determinados productos alimenticios. Consultado El 07 De Mayo De 2015. Disponible En:

http://aesam.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/comite_cientifico/LISTERIA_M.VIDA_UTIL.pdf

Marzocca, M., Marucci, P., Sica, M., Alvarez, E. 2004. Detección de *Listeria Monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras de ambientes de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de Bahía Blanca, Argentina. Revista Argentina de Microbiología 36: 179-181 p.

Ordoñez, A. 2012. Medición de textura de queso crema Zamorano con los texturómetros Brookfield CT3 e Instron 4444. Tesis Ing. Agroindustria Alimentaria. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 27 p.

Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA). 2009. Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de Alimentos. Consultado el 18 de Agosto de 2015. Disponible en: <http://www.ccit.hn/wp-content/uploads/2014/08/Anexo-Resolucion-No.243-2009-Criterios-Microbiologicos.pdf>

Robinson, T., Ocio, M., Kaloti, A., Mackey, B. 1998. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 44 (1998) 83-92 p.

Simal, S., Sánchez, E., Bon, J., Femenia, A., Roselló, C. 2001 . Water and salt diffusion during cheese ripening: effect of the external and internal resistances to mass transfer. Journal of Food Engineering 48 (2001) 269-275 p.

Scott, R., Robinson, R., Wilbey, R. 1998. Cheese Varieties. Cheesemaking Practice. third Edition. New York, Estados Unidos. Kluwer Academic/Plenum Publishers. 449 p.

Tortora, G., Funke, B., Case, C. 2007. Introducción a la Microbiología. ninth Edition . Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana.

Uhlich, G., Luchansky, J., Tamplin, M., Molina, F., Anandan, S., Porto-Fett, A. 2006. Effect of storage temperature on the growth of *Listeria Monocytogenes* on queso blanco slices. Journal of Food Safety 26 (2006) 202–214 p.

Van Hekken, D., Tunick, M., Leggett, L., Tomasula, P. 2012. Impact of curd milling on the chemical, functional, and rheological properties of starter-free Queso Fresco. Journal of Dairy Science. 95: 5527-5535 p.

Villalobos, L., y Martínez, R., 2007. Aislamiento e Identificación por métodos convencionales y PCR de *Listeria monocytogenes* en Quesos Blancos Frescos comercializados en Cumana, Venezuela. Revista Científica SciELO, volume. 17 n.5 Maracaibo. 2007

7. ANEXOS

Anexo 1. Estimación de la tasa máxima de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado por repetición.

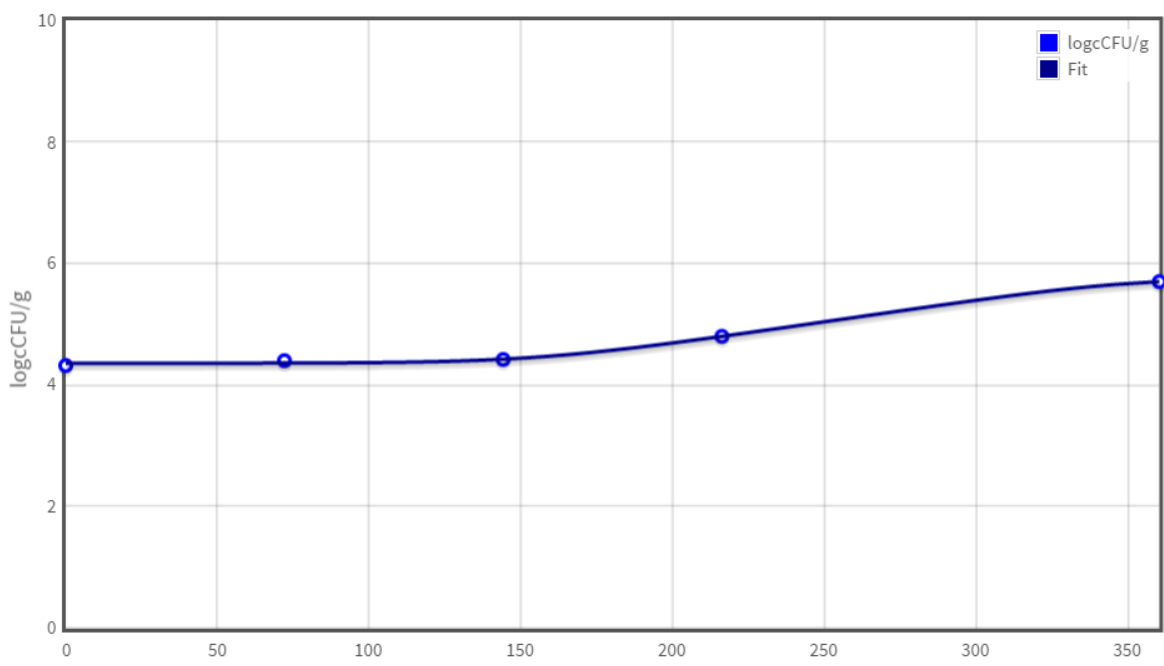
Tratamientos	N° de Repetición	Modelo	Tasa máxima de crecimiento $\text{Log}_{10}(\text{UFC/g} \times \text{h})$	R ²
1.5% NaCl, 4 °C	1	Baranyi y Roberts (sin asíntota)	0.012 ± 0.011	0.93
	2	Baranyi y Roberts (sin asíntota)	0.005 ± 0.001	0.90
	3	Baranyi y Roberts (sin asíntota)	0.005 ± 0.000	0.98
1.5% NaCl, 7 °C	1	Modelo bifásico (no Lag)	0.004 ± 0.003	0.52
	2	Baranyi y Roberts (no Lag)	0.014 ± 0.006	0.66
	3	Baranyi y Roberts (modelo completo)	0.010 ± 0.003	0.96
2.5% NaCl, 4 °C	1	Modelo Linear	0.001 ± 0.014	0.13
	2	Baranyi y Roberts (sin asíntota)	0.004 ± 0.001	0.86
	3	Baranyi y Roberts (sin asíntota)	0.005 ± 0.001	0.91
2.5% NaCl, 7 °C	1	Modelo Linear	0.003 ± 0.001	0.55
	2	Baranyi y Roberts (no Lag)	0.114 ± 0.005	0.62
	3	Baranyi y Roberts (modelo completo)	0.016 ± 0.012	0.78

Anexo 2. Resumen ANDEVA de los análisis fisicoquímicos y microbiológicos realizados al queso fresco pasteurizado.

Análisis	Fracción	Valor F	Probabilidad	R ²	Coefficiente de variación
a _w	NaCl	4.69	0.04	0.86	0.33
	Temperatura	6.64	0.02	0.86	0.33
	Día	30.44	<0.0001	0.86	0.33
	NaCl*Temp	0.86	0.36	0.86	0.33
	NaCl*día	0.22	0.80	0.86	0.33
	Temp*día	1.69	0.20	0.86	0.33
	NaCl*Temp*día	0.22	0.80	0.86	0.33
Humedad	NaCl	0.07	0.79	0.70	2.02
	Temperatura	0.08	0.77	0.70	2.02
	Día	12.90	0.0002	0.70	2.02
	NaCl*Temp	1.53	0.22	0.70	2.02
	NaCl*día	0.80	0.46	0.70	2.02
	Temp*día	0.31	0.73	0.70	2.02
	NaCl*Temp*día	0.95	0.40	0.70	2.02
pH	NaCl	10.46	0.004	0.76	3.63
	Temperatura	1.08	0.31	0.76	3.63
	Día	7.90	0.003	0.76	3.63
	NaCl*Temp	0.27	0.27	0.76	3.63
	NaCl*día	1.35	1.35	0.76	3.63
	Temp*día	0.23	0.23	0.76	3.63
	NaCl*Temp*día	0.01	0.01	0.76	3.63
Textura	NaCl	2.43	0.14	0.92	12.71
	Temperatura	0.10	0.75	0.92	12.71
	Día	1.60	0.22	0.92	12.71
	NaCl*Temp	0.02	0.88	0.92	12.71
	NaCl*día	1.51	0.24	0.92	12.71
	Temp*día	0.86	0.43	0.92	12.71
	NaCl*Temp*día	0.12	0.88	0.92	12.71
Crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i>	NaCl	0.66	0.42	0.80	9.96
	Temperatura	26.48	<0.0001	0.80	9.96
	Día	25.56	<0.0001	0.80	9.96
	NaCl*Temp	0.70	0.40	0.80	9.96
	NaCl*día	0.28	0.88	0.80	9.96
	Temp*día	3.85	0.01	0.80	9.96
	NaCl*Temp*día	0.08	0.98	0.80	9.96

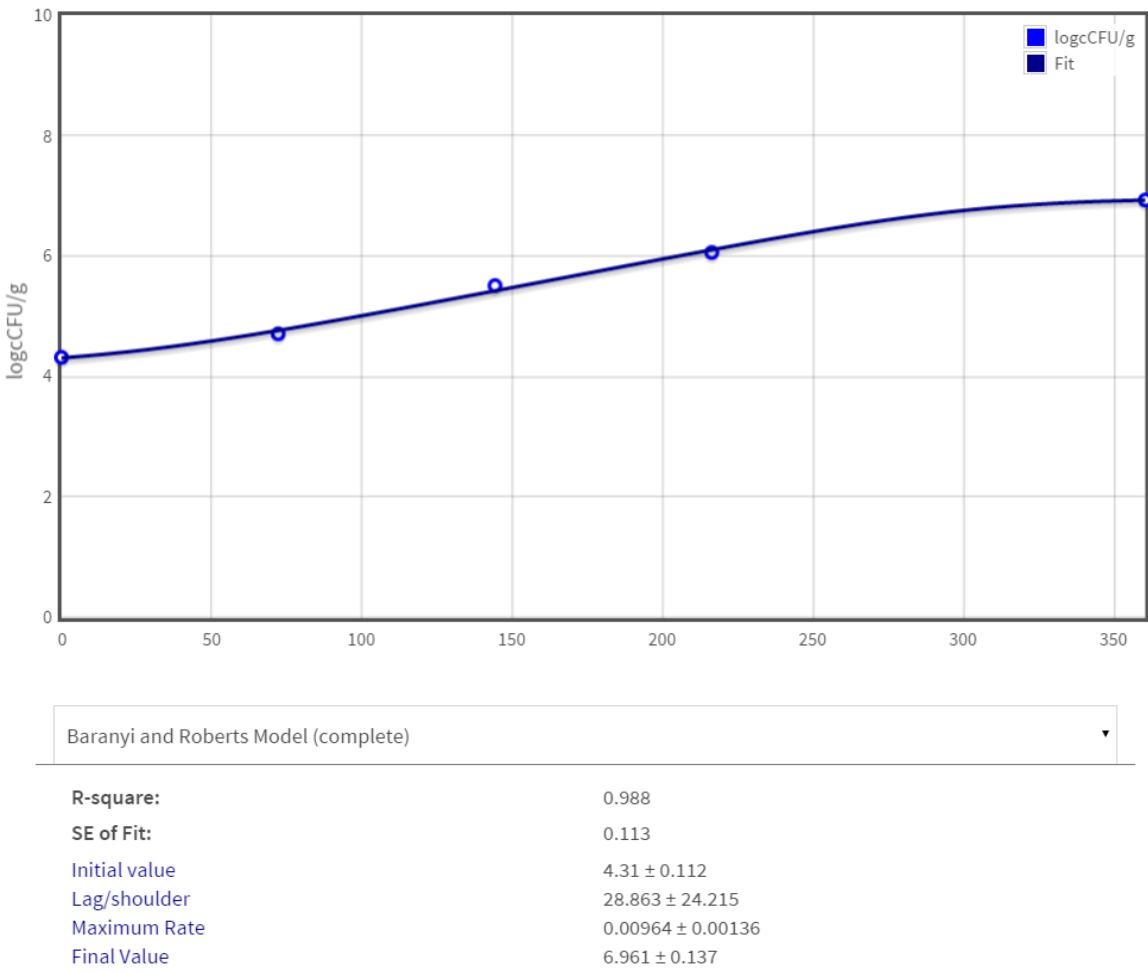
Temp= temperatura de almacenamiento del queso fresco pasteurizado

Anexo 3. Curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes* correspondiente al tratamiento 1.

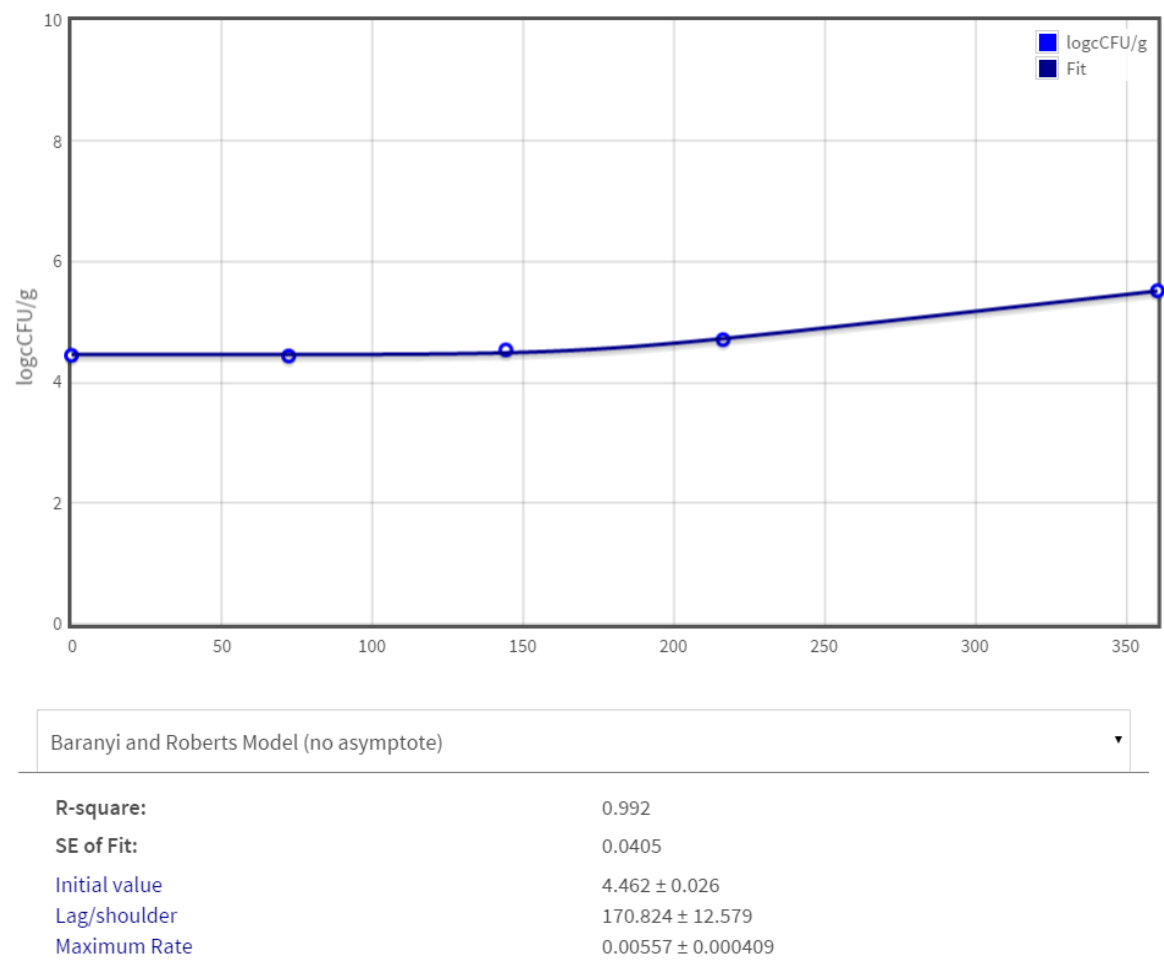


Baranyi and Roberts Model (complete)	
R-square:	0.991
SE of Fit:	0.0549
Initial value	4.357 ± 0.0404
Lag/shoulder	156.786 ± 23.176
Maximum Rate	0.00732 ± 0.00258
Final Value	5.762 ± 0.241

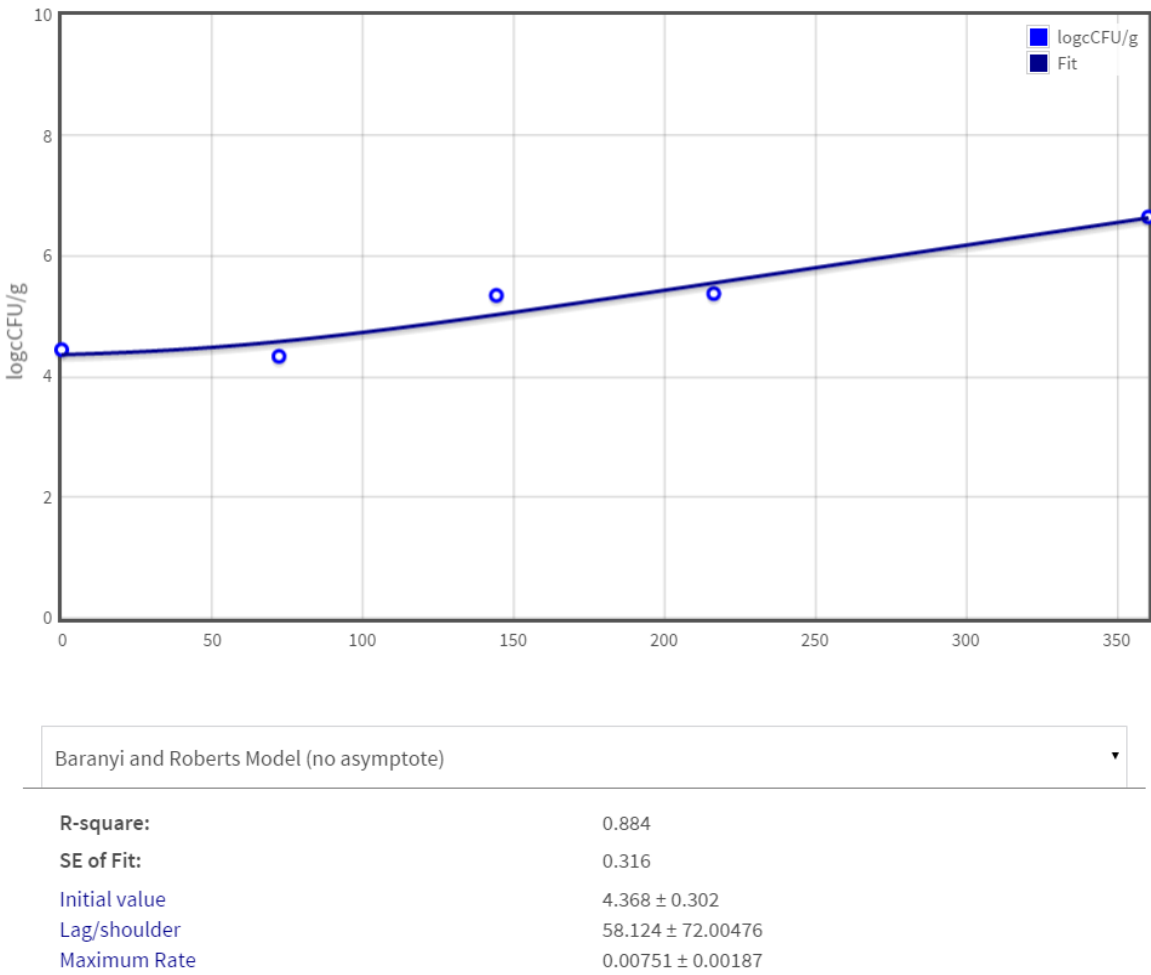
Anexo 4. Curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes* correspondiente al tratamiento 2.



Anexo 5. Curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes* correspondiente al tratamiento 3.



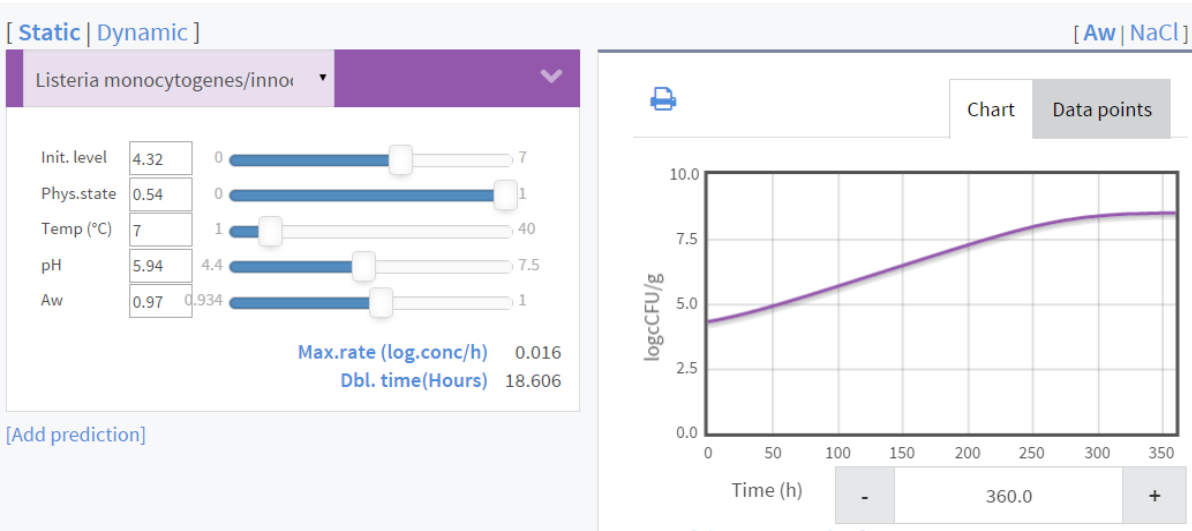
Anexo 6. Curva de crecimiento de *Listeria monocytogenes* correspondiente al tratamiento 4.



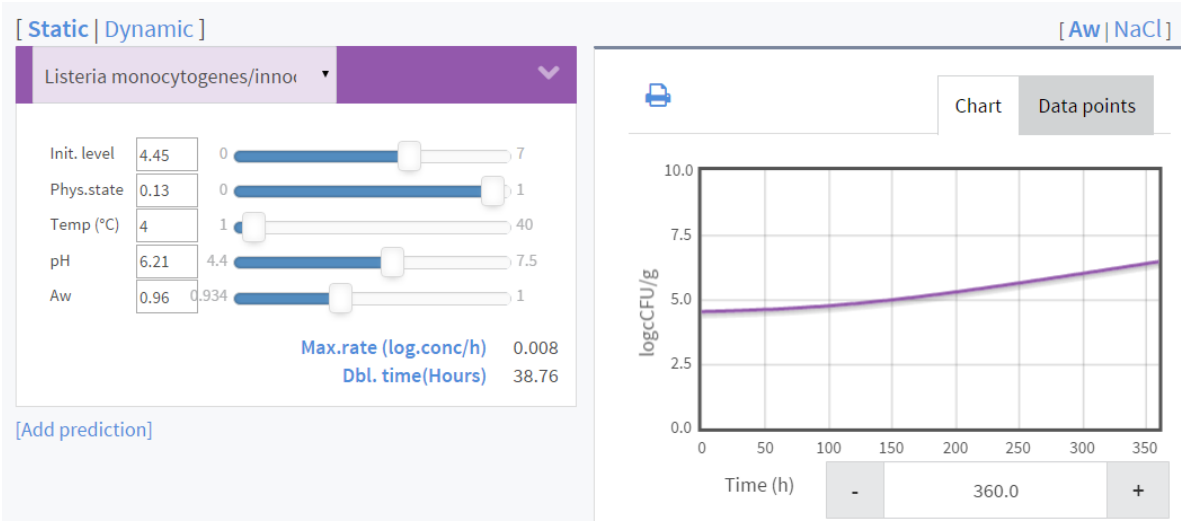
Anexo 7. Estimación de la tasa máxima de crecimiento de *Listeria monocytogenes* correspondiente al tratamiento 1 con el modelo estático disponible en ComBase.



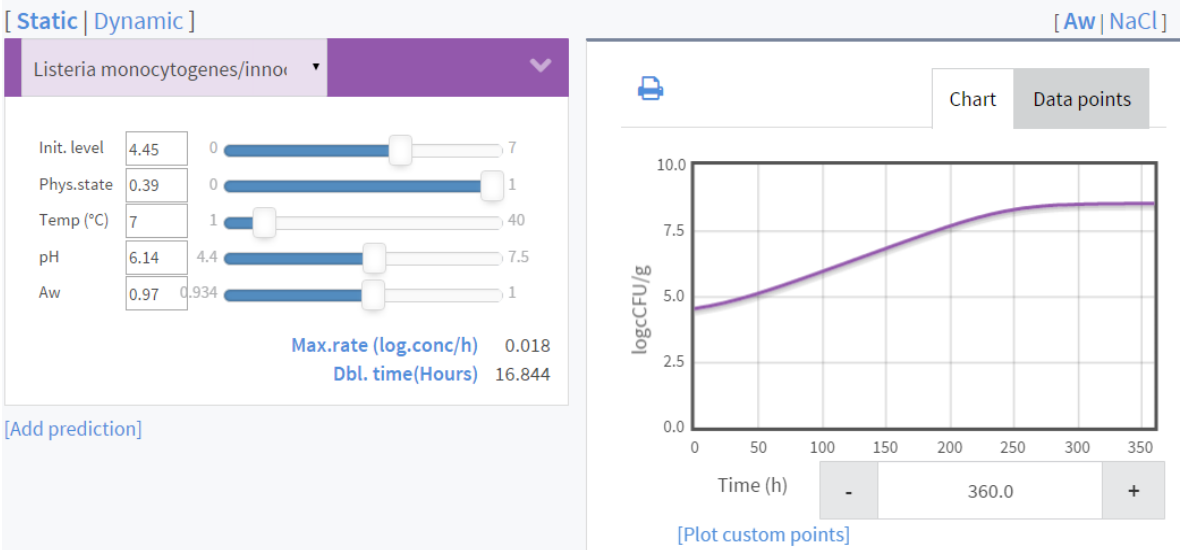
Anexo 8. Estimación de la tasa máxima de crecimiento de *Listeria monocytogenes* correspondiente al tratamiento 2 con el modelo estático disponible en ComBase.



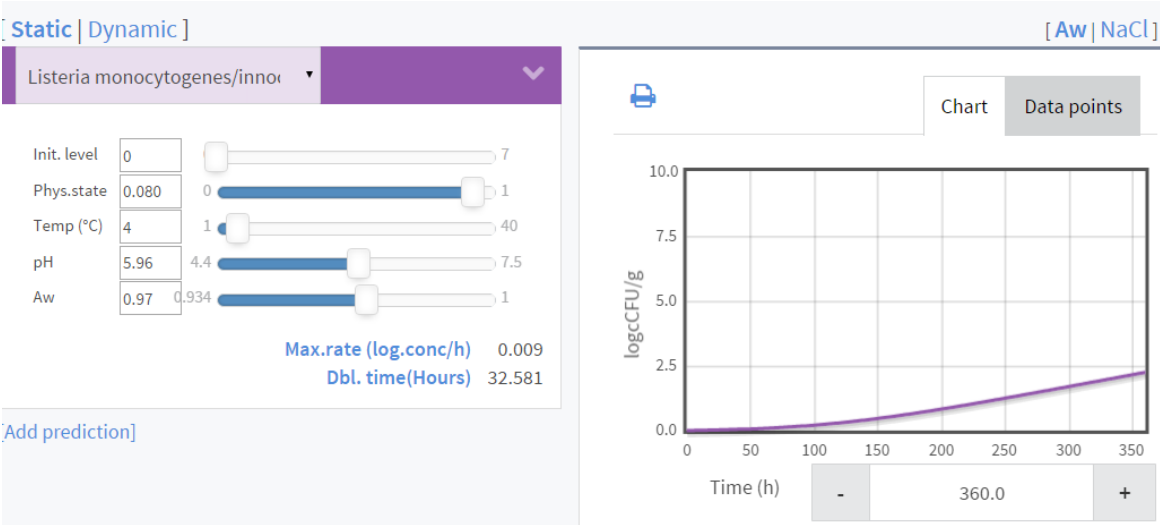
Anexo 9. Estimación de la tasa máxima de crecimiento de *Listeria monocytogenes* correspondiente al tratamiento 3 con el modelo estático disponible en ComBase.



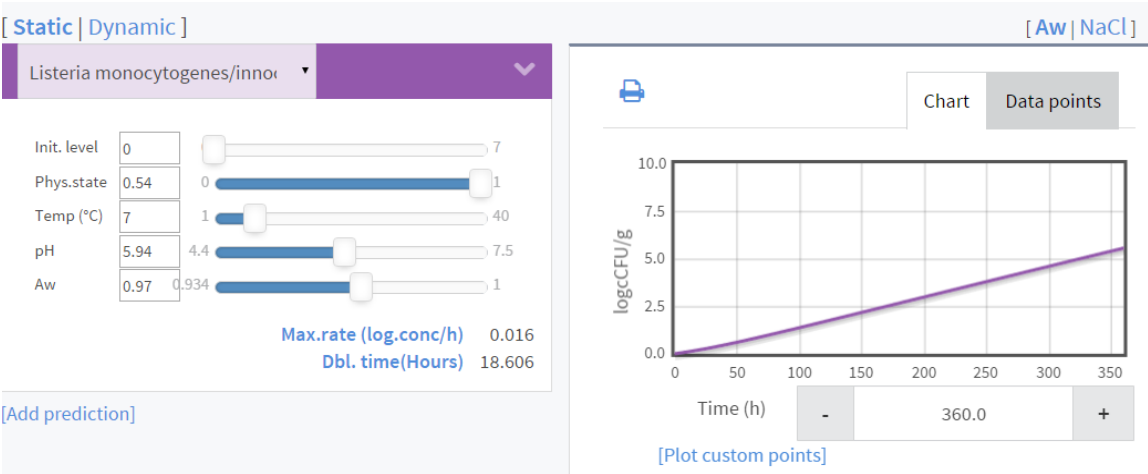
Anexo 10. Estimación de la tasa máxima de crecimiento de *Listeria monocytogenes* correspondiente al tratamiento 4 con el modelo estático disponible en ComBase.



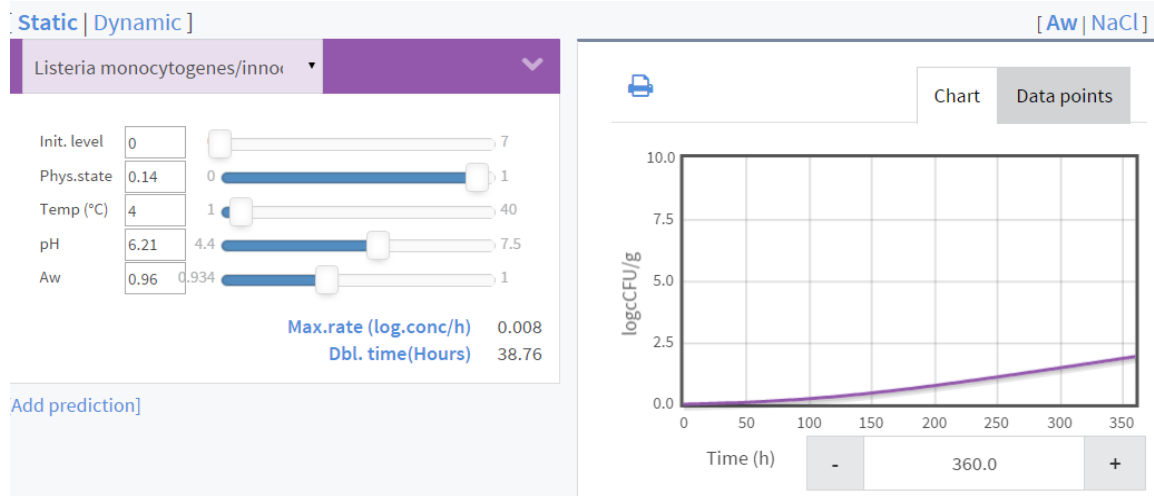
Anexo 11. Estimación de la concentración de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado correspondiente al tratamiento 1 con modelo estático disponible en ComBase.



Anexo 12. Estimación de la concentración de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado correspondiente al tratamiento 2 con el modelo estático disponible en ComBase.



Anexo 13. Estimación de la concentración de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado correspondiente al tratamiento 3 con el modelo estático disponible en ComBase.



Anexo 14. Estimación de la concentración de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado correspondiente al tratamiento 4 con el modelo estático disponible en ComBase.

