

Escuela Agrícola Panamericana Zamorano
Departamento de Agroindustria Alimentaria
Ingeniería en Agroindustria Alimentaria



Proyecto Especial de Graduación

**Evaluación del sistema activador de lactoperoxidasa (STABILAK®) y Nisina en
la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* en
queso fresco**

Estudiantes

Eugenia Marcela Silva Almendarez

William Alexander Echeverría Mejía

Asesores

Mayra Márquez González, Ph.D.

José Luis Vargas Bográn, M.Sc.

Honduras, agosto 2022

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana académica

ADELA M. ACOSTA MARCHETTI

Directora Departamento de Agroindustria Alimentaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros	5
Índice de Figura.....	6
Índice de Anexos.....	7
Resumen	8
Abstract	9
Introducción.....	10
Materiales y Métodos.....	12
Diseño Experimental.....	12
Análisis Estadístico.....	12
Preparación de los Cultivos (<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>).....	12
Preparación de Leche	13
Elaboración del Queso Fresco con Leche Activada	13
Inoculación del Queso Fresco	13
Análisis Microbiológico	15
Análisis Físico	16
Rendimiento	16
Porcentaje de Purga de Suero.....	16
Análisis de Color.....	16
Análisis Químico.....	16
Análisis de a_w	16
Análisis de pH.....	17
Análisis de Acidez Titulable Expresada como Ácido Láctico– ATECAL.....	17
Resultados y Discusión.....	18
Sobrevivencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	18
Sobrevivencia de <i>Listeria monocytogenes</i>	19

Análisis de Porcentaje de Purga	20
Análisis de Rendimiento	21
Análisis de Color.....	21
Análisis de Actividad de Agua (a_w)	21
Análisis de Acidez Titulable Expresada como Ácido Láctico (ATECAL)	21
Análisis de pH.....	22
Conclusiones.....	24
Recomendaciones.....	25
Referencias	26
Anexos	30

Índice de Cuadros

Cuadro 1	Tratamientos evaluados en el seguimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco almacenado a 7 ± 0.5 °C.	12
Cuadro 2	Formulación de queso fresco con dosis de VitaPro® Nisina.	15
Cuadro 3	Formulación de queso fresco con dosis de STABILAK®	15
Cuadro 4	Sobrevivencia de <i>Staphylococcus aureus</i> bajo la presencia de STABILAK® y nisina en queso inoculado y almacenado a 7 ± 0.5 °C durante 30 días.....	18
Cuadro 5	Sobrevivencia de <i>Listeria monocytogenes</i> bajo la presencia de STABILAK® y nisina en queso inoculado y almacenado a 7 ± 0.5 °C durante 30 días.....	19
Cuadro 6	Porcentaje de purga del queso fresco en el día de elaboración.	20
Cuadro 7	Nivel de acidez titulable (ATECAL) (%) del queso fresco almacenado a 7 ± 0.5 °C durante 30 días.	22
Cuadro 8	Nivel de pH del queso fresco almacenado a 7 ± 0.5 °C durante 30 días.	22

Índice de Figura

Figura 1 Flujo de proceso de elaboración de queso fresco activado e inoculado.	14
---	----

Índice de Anexos

Anexo A Curva de comportamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en queso fresco inoculado almacenado a 7 ± 0.5 °C durante 30 días.	30
Anexo B Curva de comportamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco inoculado almacenado a 7 ± 0.5 °C durante 30 días.	31
Anexo C Rendimiento obtenido en la elaboración del queso fresco.....	32
Anexo D Valores de Índice de Blancura (Color) del queso fresco almacenado a 7 ± 0.5 °C durante 30 días.	33
Anexo E Actividad de agua del queso fresco almacenado a 7 ± 0.5 °C durante 30 días.	34
Anexo F Nivel de significancias de los parámetros evaluados por variables involucradas en el estudio.	35
Anexo G Significancias de la prueba t student (pareada) de los parámetros evaluados por variables involucradas en el estudio.	36

Resumen

En Centroamérica, el queso fresco es uno de los productos más elaborados de la industria láctea, siendo de gran importancia en el mercado de la región. *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* son patógenos incidentes en productos lácteos y el uso de alternativas para el control biológico es una tendencia de la industria alimentaria. Se evaluó el efecto sobre dichos patógenos con cinco tratamientos que comprendieron la dosis total y dosis media de nisina recomendada por el Reglamento Técnico Centroamericano, dosis completa y dosis media del Activador del Sistema Lactoperoxidasa (STABILAK®) recomendada por el fabricante más el tratamiento control. El diseño experimental consistió en Bloques Completos al Azar, determinando diferencias estadísticas a través de un análisis de varianza con una significancia de $P < 0.05$. Se evaluó el efecto a través del tiempo (30 días) de las dosis descritas en una matriz de queso fresco almacenada a 7 ± 0.5 ° C inoculadas con *Staphylococcus aureus* (25923, ATCC) o *L. monocytogenes* (ATCC® 19112™). Además, se analizó su efecto sobre los parámetros fisicoquímicos de rendimiento, porcentaje de purga, pH, acidez titulable, actividad de agua y color. Ambas dosis de nisina y STABILAK® demostraron inhibición contra *S. aureus*. Para *L. monocytogenes*, se obtuvo un decrecimiento generalizado. La dosis completa de nisina y ambas dosis de STABILAK® limitaron en mayor medida su desarrollo. Los aditivos no tuvieron incidencia en rendimiento, color ni actividad de agua. La dosis completa de nisina redujo la purga y conservó los niveles de ácido láctico en el medio. Se recomienda evaluar el efecto de los aditivos contra dichos patógenos a diferentes temperaturas de almacenamiento.

Palabras clave: acidez, bacteriocina, contaminación, inhibición, patógenos.

Abstract

In Central America, fresh cheese is one of the most elaborated products of the dairy industry, being of great importance in the market of the region. *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* are pathogenic incidents in dairy products and the use of alternatives for biological control is a trend of the food industry. The effect on said pathogens was evaluated with five treatments comprised by the total and half dose of nisin established by the Central American Technical Regulations (RTCA), the full and half dose of the lactoperoxidase activator (STABILAK®), recommended by the manufacturer plus the control treatment. The experimental design consisted of random complete blocks, determining statistical differences through an analysis of variance with a significance of $P < 0.05$. The effect over time (30 days) of doses described in a fresh cheese matrix stored at 7 ± 0.5 °C inoculated with *Staphylococcus aureus* (25923, ATCC) or *L. monocytogenes* (ATCC® 19112™) was evaluated. In addition, its effect on physicochemical parameters of yield, purge percentage, pH, titratable acidity, water activity and color were analyzed. Both doses of nisin and STABILAK® demonstrated inhibition against *S. aureus*. For *L. monocytogenes*, a generalized decrease was obtained. The full dose of nisin and both doses of STABILAK® further limited its development. The additives had no impact on performance, color, or water activity. The full dose of nisin reduced purging and retained lactic acid levels in the medium. The assessment of the effect of additives against such pathogens at different storage temperatures is recommended.

Keywords: acidity, bacteriocin, contamination, inhibition, pathogens.

Introducción

El queso es un alimento de gran consumo alrededor del mundo, el cual posee distintas características nutritivas, sensoriales y funcionales según su tipo. En Centroamérica, el queso fresco es uno de los productos más elaborados de la industria láctea, definido por la Norma NSO 67.01.04:06 como “queso no madurado ni escaldado, moldeado, de textura levemente firme y granular, preparado a partir de leche entera, semidescremada o descremada.” Este tipo de queso es cuajado “a partir de enzimas o ácidos orgánicos, generalmente sin cultivos lácteos” (Comité Técnico de Normalización - Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 2004). Dicho alimento se caracteriza por su alto contenido de humedad (46 - 57%), incapacidad de fundirse en altas temperaturas, color blanco, sabor moderadamente salado (1 - 3% de cloruro de sodio), y un pH cercano a neutro (5.9 - 6.4). Esto representa un medio propicio para el desarrollo de microorganismos, destacando dos patógenos de interés alimentario que comprometen la inocuidad del alimento: *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* (Pimentel Filho et al. 2014).

Staphylococcus aureus, es la bacteria causante de intoxicaciones estafilocócicas en alimentos contaminados, debido a la producción de toxinas o el desarrollo posterior de toxinefección (Garzón et al. 2019). Esta es una bacteria nociva a partir de concentraciones cercanas a 10^5 UFC/g de alimento, pues es capaz de producir varias toxinas, siendo el 95% de los casos las cinco enterotoxinas clásicas (A, B, C, D y E), las cuales son ampliamente resistentes al calor y a la acción enzimática de la tripsina y pepsina (Atanassova et al. 2001). *Listeria monocytogenes*, es un patógeno causante de la listeriosis, enfermedad grave con una tasa del 20 – 30% de mortalidad que afecta principalmente a poblaciones vulnerables. Este patógeno es asociado con leche no pasteurizada y se puede encontrar en productos lácteos luego de una contaminación cruzada (Michelon et al. 2016).

Es por ello que el establecimiento de las buenas prácticas de manufactura, añadiendo buenas prácticas de higiene en almacenamiento, transporte y distribución, son necesarias para la obtención inocua del producto (Esteban Méndez 2020). Ante la cantidad de factores que pueden afectar la calidad e inocuidad del producto final, se ha establecido la importancia del adecuado manejo de la

materia prima (Ramírez López y Vélez Ruiz 2012). Además de la implementación de estas medidas, surge la tendencia en la industria alimentaria sobre la implementación de moléculas de origen biológico como barrera de prevención ante la recontaminación de alimentos durante su vida anaquel.

Entre estos compuestos se encuentran el Sistema Lactoperoxidasa (SLP) y la nisina. El SLP se encuentra naturalmente presente en la leche, el cual se compone por la enzima lactoperoxidasa, peróxido de hidrógeno e iones tiocianato. Dicha enzima es catalogada como termo resistente (hasta 78° C) utilizándose como indicador en ensayos para comprobar si la leche se ha calentado a temperaturas más altas de las empleadas en la pasteurización normal (Cristales 2009). Su actividad bacteriostática actúa para mitigar microorganismos patógenos, pero sin mostrar inhibición contra bacterias lacto fermentadoras. STABILAK® es un activador enzimático del SLP, el cual permite mitigar el crecimiento de microorganismos presentes en la leche mediante mecanismos de inhibición bacteriana (Ponce 2010).

La nisina es una sustancia polipeptídica de origen biológico y producto del metabolismo de diferentes cepas de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus lactis*. VitaPro® Nisina es un aditivo comercial con nisina como agente activo. Este reacciona ante bacterias gram positivas, es estable en un pH ácido, y no presenta resistencia cruzada ante antibióticos, por lo tanto, es considerado seguro para el consumo humano (Sánchez Martín et al. 2019). Industrialmente la nisina es empleada en diferentes productos lácteos gracias a su estabilidad, la cual permite el tratamiento térmico de los mismos.

El presente estudio se centró en la evaluación del efecto de VitaPro® Nisina y el activador del SLP STABILAK® en queso fresco típico del mercado de la región, debido al gran porcentaje de productos lácteos elaborados a partir de leche cruda en el mercado centroamericano. Para esta investigación se establecieron los siguientes objetivos:

Evaluar el efecto del sistema activador de lactoperoxidasa (STABILAK®) y VitaPro® Nisina, en la sobrevivencia de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* en queso fresco.

Determinar el efecto del activador del sistema lactoperoxidasa (STABILAK®) y VitaPro® Nisina, en las propiedades fisicoquímicas del queso.

Materiales y Métodos

Diseño Experimental

El diseño experimental consistió en Bloques Completos al Azar (BCA) con cinco tratamientos (Cuadro 1). Estos comprendieron la dosis total y dosis media de nisina recomendada por el Reglamento Técnico Centroamericano de Aditivos Alimentarios (Comités Técnicos de Normalización C.A 2012), dosis completa y dosis media del activador SLP STABILAK® recomendada por el fabricante, más el tratamiento control. Se evaluó el efecto de los tratamientos a través del tiempo a los 0 y 30 días (vida anaquel teórica del queso fresco), a una temperatura de 7 ± 0.5 °C, con tres repeticiones por tratamiento obteniendo 30 unidades experimentales.

Cuadro 1

Tratamientos evaluados en el seguimiento de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* en queso fresco almacenado a 7 ± 0.5 °C.

Tratamientos	Producto	Agente activo	Dosis
TRT 1	STABILAK®	Tiocianato de sodio + Percarbonato de sodio	(7.2 mg+ 27.2 mg) /kg
TRT 2	STABILAK®	Tiocianato de sodio + Percarbonato de sodio	(3.6 mg + 13.6 mg) /kg
TRT 3	VitaPro® Nisina	Nisina	12.5 mg/kg
TRT 4	VitaPro® Nisina	Nisina	6.25 mg/kg
Control	-	N. A	N. A

Nota. N.A: No aplica

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) a través del programa “Statistic Analyzer System” (SAS) versión 9.4. Se evaluó la significancia ($P < 0.05$) entre tratamientos, días y la interacción tratamiento – día. Posteriormente se ejecutó una separación de medias LSMEANS de las variables involucradas. Para los parámetros distintos en el tiempo, se realizó una prueba *t student* con el fin de comparar las medias entre ambos días.

Preparación de los Cultivos (*Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*)

Se prepararon los cultivos de *Listeria monocytogenes* ATCC® 19112™ y *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosembach (25923, ATCC) en el laboratorio de Microbiología de Alimentos Zamorano. Su activación se realizó en caldo soya triptica en tubos de ensayo como medio de enriquecimiento,

incubados a 35 ± 2 °C por 24 horas. Posteriormente las cepas se aislaron por separado en un plato petri con agar soya tripticasa, incubándose a 35 ± 2 °C por otras 24 horas. Los inóculos finales se obtuvieron a partir de la dilución de colonias aisladas en 10 mL de caldo soya tripticasa incubado a 35 ± 2 °C por 24 horas (Cuéllar Milián 2015).

Preparación de Leche

La leche se tomó procedente de la unidad de ordeño de ganado lechero de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Fue recibida en la Planta de Lácteos Zamorano con un valor ATECAL de 0.14 – 0.16%. Posteriormente la leche se estandarizó a un 2.5% de grasa y se pasteurizó a 63 °C por 30 minutos.

Elaboración del Queso Fresco con Leche Activada

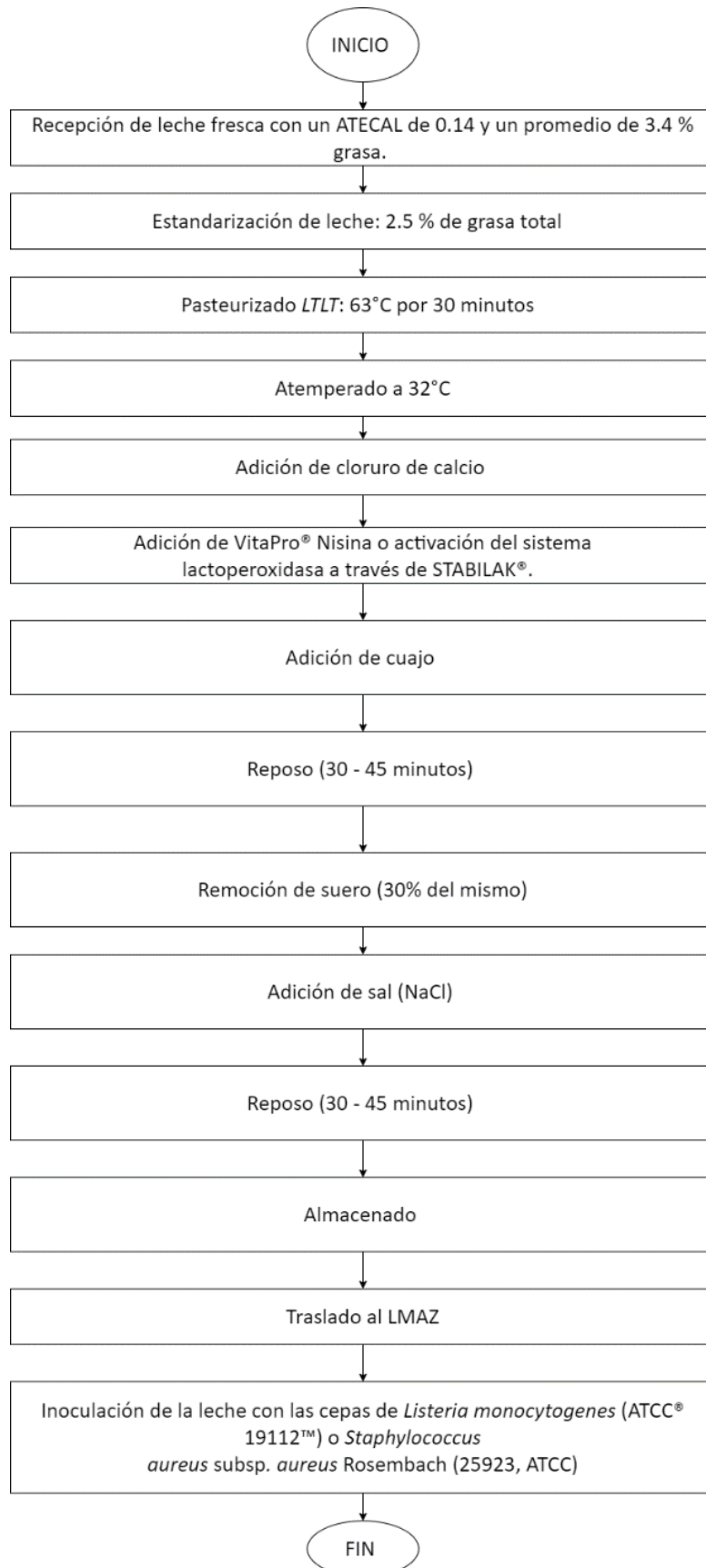
Se atemperó la leche aproximadamente a 32 °C para la adición de cloruro de calcio. Luego se aplicó la dosis de VitaPro® Nisina o STABILAK®, acorde al tratamiento correspondiente (Cuadros 2 y 3). Posteriormente, se adicionó cuajo dejando reposar de 45 a 60 minutos a 25 °C, promoviendo la precipitación de la caseína. Seguidamente se efectuó el corte y desuerado (30% del líquido total), adicionando sal, finalizando con un reposo de 45 minutos (Figura 1).

Inoculación del Queso Fresco

La inoculación se realizó en el laboratorio de Microbiología de Alimentos Zamorano. El queso fresco activado se inoculó con las cepas anteriormente descritas: *Listeria monocytogenes* (ATCC® 19112™) o *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosembach (25923, ATCC). Para la inoculación del queso se tomaron 0.5 mL de caldo soya tripticasa de la cepa correspondiente. Posteriormente diluidos en 9 mL de buffer fosfato, añadiendo 40 µL de suspensión por cada 10 g de muestra de queso (Ochoa 2009). Esto se realizó para estandarizar la carga de patógenos inicial en el queso fresco resultante aproximadamente en 10^4 UFC/g. Se identificó mediante rotulación cada serie de muestras en sus tratamientos y patógeno inoculado (Acosta Chávez 2015). Seguidamente se almacenó por 30 días a 7 ± 0.5 °C en un empaquete sencillo en películas termoencogibles LDPE. Los recuentos microbiológicos se realizaron en los días 0 y 30 posteriores al ensayo.

Figura 1

Flujo de proceso de elaboración de queso fresco activado e inoculado.



Cuadro 2

Formulación de queso fresco con dosis de VitaPro® Nisina.

Ingrediente	Unidad	Dosis completa de nisina Cantidad	Dosis media de nisina Cantidad
Leche fluida al 2.5% grasa	Kg	1.00	1.00
Sal	g	20	20
Cloruro de Calcio	mL	0.13	0.13
Cuajo	mL	0.10	0.10
VitaPro® Nisina	mg	12.5	6.25

Cuadro 3

Formulación de queso fresco con dosis de STABILAK®.

Ingrediente	Unidad	Dosis completa de STABILAK® Cantidad	Dosis media de STABILAK® Cantidad
Leche fluida al 2.5% grasa	Kg	1.00	1.00
Sal	g	20	20
Cloruro de Calcio	mL	0.13	0.13
Cuajo	mL	0.10	0.10
STABILAK® 1	mg	7.2	3.6
STABILAK® 2	mg	27.2	13.6

Análisis Microbiológico

Se tomaron muestras de 10 g por cada tratamiento, previamente almacenadas, añadiendo 90 mL de solución buffer de fosfato, homogenizando por 1 minuto en bolsas plásticas termoencogibles de LDPE a través del *Stomacher*, obteniendo la dilución 10^{-1} . Se tomó 1 mL de dicha dilución, agregándose a 9 mL de solución buffer, obteniendo así la dilución 10^{-2} . De manera similar se obtuvieron las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} . En la determinación de los patógenos, las muestras de las diluciones (1 mL) de *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* se agregaron en placas Petrifilm 3M™ EL y en placas Petrifilm™ *Staph Express*, respectivamente. Las placas se incubaron por 48 h a 35 ± 2 °C. Los recuentos obtenidos se multiplicaron por su factor de dilución para su posterior expresión en log UFC/g.

Análisis Físico

Rendimiento

El índice de rendimiento fue determinado al día de elaboración del queso fresco a través del cociente entre la cantidad de kilogramos de leche y kilogramos de queso obtenido, representado aplicando la Ecuación 1 (Huaraca Aparco 2013).

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Kilogramos promedio de queso obtenido}}{\text{Kilogramos de leche utilizada}} \times 100 \quad [1]$$

Porcentaje de Purga de Suero

El porcentaje de purga se determinó al día de elaboración mediante el pesado neto del suero respecto al peso neto del queso, empleando la Ecuación 2 para el cálculo del porcentaje de purga (García Gámez 2019).

$$\% \text{ de purga} = \frac{\text{Peso neto del suero}}{\text{Peso neto del queso}} \times 100 \quad [2]$$

Análisis de Color

Se realizó la determinación de color del producto para cada unidad experimental mediante la escala CIE L*a*b, utilizando el colorímetro Colorflex Hunder del Laboratorio de Análisis de Alimentos (LAAZ). Se determinó el índice de Blancura (IB), donde el valor 100 indica el blanco ideal, parámetro calculado a través de la Ecuación 3 (Maldonado et al. 2013).

$$IB = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad [3]$$

Análisis Químico

Análisis de a_w

Para cada unidad experimental se determinó la actividad de agua empleando el método oficial AOAC 978.18 (Association of Official Analytical Chemists 2000) a través del equipo Aqualab® del Laboratorio de Análisis de Alimentos (LAAZ).

Análisis de pH

Para cada unidad experimental se evaluó el pH siguiendo el lineamiento oficial de la norma AOAC 981.12 (Association of Official Analytical Chemists 1982) para su determinación, empleando un potenciómetro marca *Thermo Scientific*.

Análisis de Acidez Titulable Expresada como Ácido Láctico– ATECAL

Para cada unidad experimental se cuantificó el ácido láctico en el queso fresco por medio de titulación. Se agregó en un matraz Erlenmeyer 9 mL de suero de leche y tres gotas de fenolftaleína al 1%. Se tituló con NaOH (0.1 N), hasta obtener una leve coloración rosa en la muestra. Para la cuantificación de ácido láctico se empleó la Ecuación 4 (Chacón Villalobos 2006)

$$\% \text{ Ácido láctico} = \frac{0.9 * ml \text{ NaOH } 0.1N}{\text{gramos de muestra}} \quad [4]$$

Resultados y Discusión

Sobrevivencia de *Staphylococcus aureus*

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en los resultados correspondientes al día cero ($P \geq 0.05$). El inóculo partió con una concentración inicial de 4.92 ± 0.06 log UFC/g. Para el día 30 ($P < 0.05$) se encontró que el tratamiento de control aumentó en 0.94 log UFC/g, mientras los tratamientos restantes no presentaron un aumento significativo (Cuadro 4).

Cuadro 4

Sobrevivencia de Staphylococcus aureus bajo la presencia de STABILAK® y nisina en queso inoculado y almacenado a 7 ± 0.5 °C durante 30 días.

Tratamiento ^{NS}	Media \pm D. E (Log UFC/g)	
	Día 0	Día 30
STABILAK® dosis completa	5.00 ± 0.47^x	4.95 ± 0.41^x
STABILAK® dosis media	4.94 ± 0.46^x	5.49 ± 0.52^x
Nisina dosis completa	4.93 ± 0.19^x	5.02 ± 0.48^x
Nisina dosis media	4.84 ± 0.22^x	5.04 ± 0.50^x
Control	4.91 ± 0.25^x	5.85 ± 0.57^y
CV (%)	1.17	7.37

Nota. Las medias con diferentes letras (^{xy}) en la misma fila indican que hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) en el tiempo. ^{NS}: No hubo diferencias significativas entre tratamientos al día cero y treinta ($P \geq 0.05$). Dosis completa recomendada de STABILAK®: 7.2 mg (STABILAK®1) + 27.2 mg (STABILAK®2) /kg. Dosis completa de VitaPro® Nisina: 12.5 mg/kg. CV: Coeficiente de Variación. D.E: Desviación Estándar.

Considerando el corto período de tiempo, para el día cero, los productos no han podido alcanzar su mayor desempeño como bactericidas, generando similitud de recuentos de *S. aureus* entre tratamientos (Anexo A). En cuanto a los efectos inhibitorios para el día 30, se encontró que la nisina resulta eficaz en aumentar la fase de latencia de *S. aureus* como en la reducción del crecimiento de bacterias. Esto indica que el principal efecto de la nisina es en la fase *lag* (Pinto et al. 2011). Investigaciones también han encontrado un efecto bacteriostático de nisina para *S. aureus* a partir de concentraciones de 1.2 mg/kg (Grisi y Gorchach Lira 2005) . De igual manera, el SLP posee un efecto bacteriostático, el cual dependerá de la carga microbiana inicial, el tipo de contaminación y la temperatura de almacenamiento del alimento (Armenteros et al. 2007).

Cabe resaltar que *S. aureus* también puede desarrollar mecanismos de protección ante condiciones adversas para su desarrollo (como la presencia de antibióticos), mediante la formación

de agregados celulares (Haaber et al. 2012). Esto se relaciona con un menor efecto de los aditivos empleados en la reducción de *S. aureus* respecto a otros patógenos (*L. monocytogenes*).

Sobrevivencia de *Listeria monocytogenes*

El inóculo partió con una concentración inicial de 3.89 ± 0.09 log UFC/g. Para el análisis de sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en el día cero, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($P \geq 0.05$). En cuanto al comportamiento poblacional de *Listeria monocytogenes* a los 30 días, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre ambos días evaluados (Anexo F). Se obtuvo un decrecimiento generalizado de *L. monocytogenes* en todos los tratamientos. En la interacción tratamiento – día ($P < 0.05$), la dosis completa de nisina resultó ser más efectiva en la disminución del recuento microbiológico, disminuyendo en 2.04 log UFC/g su carga bacteriana inicial. Posteriormente, se agrupan en un mismo conjunto ambas dosis de STABILAK®, las cuales redujeron la carga de *L. monocytogenes* en un promedio de 1.34 log UFC/g (Cuadro 5).

Cuadro 5

Sobrevivencia de Listeria monocytogenes bajo la presencia de STABILAK® y nisina en queso inoculado y almacenado a 7 ± 0.5 °C durante 30 días.

Tratamiento	Media \pm D. E (Log UFC/g)	
	Día 0 ^{NS}	Día 30
STABILAK® dosis completa	3.81 ± 0.32^x	2.44 ± 0.19^{By}
STABILAK® dosis media	3.99 ± 0.39^x	2.68 ± 0.23^{By}
Nisina dosis completa	3.80 ± 0.25^x	1.76 ± 0.06^{Cy}
Nisina dosis media	3.96 ± 0.38^x	2.99 ± 0.29^{Ay}
Control	3.89 ± 0.16^x	2.77 ± 0.26^{Ay}
CV (%)	2.20	18.69

Nota. Las medias con diferentes letras (ABC) en la misma columna indican que hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamiento.

Las medias con diferentes letras (xy) en la misma fila indican que hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) en el tiempo. Dosis completa recomendada de STABILAK®: 7.2 mg (STABILAK®1) + 27.2 mg (STABILAK®2) /kg. Dosis completa de VitaPro® Nisina: 12.5 mg/kg. CV:

Coficiente de Variación. D.E: Desviación Estándar. NS: No hubo diferencias significativas entre tratamientos al día cero.

Listeria monocytogenes puede crecer y desarrollarse en un rango amplio de condiciones. A pesar de ello, la combinación de factores tanto intrínsecos como extrínsecos del alimento, puede condicionar el desarrollo del microorganismo (Bover y Garriga 2014). Este decrecimiento obtenido a nivel general (Anexo B) es producto de la presencia de ácido láctico en el queso. La presencia de hasta

0.1% de ácido láctico inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes*; el grado de inhibición varía, aumentando a medida que disminuye la temperatura de incubación. *L. monocytogenes* es inactivada a cualquier temperatura cuando las concentraciones de ácido láctico en el medio igualan el 0.3% (Ahmad y Marth 1989). Esto concuerda con el efecto del SLP, el cual aumenta su efectividad mediante la exposición de *L. monocytogenes* a temperaturas de refrigeración (Armenteros et al. 2007). De manera similar, el efecto de listeriostático de nisina surge a partir de dosis de 12.5 mg/kg a 20 °C, disminuyendo los conteos microbiológicos y la muerte de ciertas células (Ferreira y Lund 1996).

La implementación de estas alternativas de control no garantiza por sí misma la inocuidad del producto (presencia de *L. monocytogenes* y recuentos mayores a 3 log UFC/g para *S. aureus*). Por lo tanto, es necesario asegurar el empleo de procesos de pasteurización y Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) en las matrices lácteas tratadas con dichos aditivos, ya que reducen considerablemente los procesos de contaminación (Costa Dias et al. 2012).

Análisis de Porcentaje de Purga

Para este índice se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos (Cuadro 6). El tratamiento de dosis completa de nisina presentó 2.45% menos de purga al momento de su evaluación respecto a los demás, los cuales no presentaron diferencias significativas entre sí.

Cuadro 6

Porcentaje de purga del queso fresco en el día de elaboración.

Tratamiento	Media (%) \pm D. E
STABILAK® dosis completa	14.81 \pm 1.16 ^A
STABILAK® dosis media	14.17 \pm 1.18 ^A
Nisina dosis completa	11.74 \pm 0.72 ^B
Nisina dosis media	14.33 \pm 0.22 ^A
Control	13.46 \pm 1.07 ^{AB}
CV (%)	6.89

Nota. Las medias con diferentes letras (^{AB}) indican que hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos. Dosis completa recomendada de STABILAK®: 7.2 mg (STABILAK®1) + 27.2 mg (STABILAK®2) /kg. Dosis completa de VitaPro® Nisina: 12.5 mg/kg. CV: Coeficiente de Variación. D.E: Desviación Estándar. % = Porcentaje peso (g) sobre peso (g).

Generalmente, la nisina no tiene efectos en el control de la pérdida por purga en otras matrices alimentarias (Gedarawatte et al. 2022). Sin embargo, se ha encontrado un efecto de la nisina en limitar la pérdida de agua para queso ricota (Martins et al. 2010). Esto se debe a la carga neta de

la nisina (+3), que le permite interactuar con cuatro a seis moléculas de agua, limitando el movimiento de esta en el alimento, reduciendo así la pérdida de agua en el producto (Suárez Gea 1997).

Análisis de Rendimiento

El rendimiento promedio obtenido del queso fresco para el día de elaboración fue de 20.74 ± 0.99 % (Anexo C). No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos ($P \geq 0.05$). A nivel molecular la presencia de nisina, tanto como la activación del SLP, no condiciona el punto isoeléctrico, procesos de precipitación ni agregación micelar de la caseína, la cual se correlaciona directamente con el rendimiento final del queso fresco (Davies et al. 1997).

Análisis de Color

Las muestras partieron con un Índice de Blancura (IB) promedio de 83.14 ± 2.26 . No se observa una diferencia estadísticamente significativa ($P \geq 0.05$) entre los tratamientos y el control para el día cero (Anexo D). Para el día 30, no se encontraron diferencias significativas por tratamiento respecto al día cero ($P \geq 0.05$). Esto concuerda con la literatura, la cual indica que los aditivos no poseen influencia en el color del queso a través del tiempo (Álvarez Badel et al. 2022).

Análisis de Actividad de Agua (a_w)

Con un promedio de 0.92 ± 0.03 , no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P \geq 0.05$) entre los tratamientos para el día cero (Anexo E). De igual manera, este parámetro se conservó estadísticamente para el día 30 ($P \geq 0.05$). La presencia y naturaleza tanto de nisina como del SLP activado no condiciona las cargas eléctricas de las proteínas del queso, lo cual no modifica la Capacidad de Retención Agua (CRA) ni el agua disponible para reacciones químicas del queso durante su vida anaquel (Flynn et al. 2021).

Análisis de Acidez Titulable Expresada como Ácido Láctico (ATECAL)

No se encontraron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) para los tratamientos correspondientes al día cero (Cuadro 7). Para el día 30 se encontró un aumento promedio del 0.03% de ácido láctico ($P < 0.05$), excepto por el tratamiento de la dosis completa de nisina, el cual se mantuvo a través del tiempo (Anexo G).

Cuadro 7

Nivel de acidez titulable (ATECAL) (%) del queso fresco almacenado a 7 ± 0.5 °C durante 30 días.

Tratamiento ^{NS}	Media \pm D. E (%)	
	Día 0	Día 30
STABILAK® dosis completa	0.147 \pm 0.006 ^Y	0.183 \pm 0.016 ^X
STABILAK® dosis media	0.157 \pm 0.005 ^Y	0.183 \pm 0.015 ^X
Nisina dosis completa	0.163 \pm 0.001 ^Y	0.170 \pm 0.015 ^Y
Nisina media dosis	0.150 \pm 0.006 ^Y	0.173 \pm 0.010 ^X
Control	0.147 \pm 0.001 ^Y	0.190 \pm 0.005 ^X
CV (%)	4.59	4.54

Nota. Las medias con diferentes letras (^{XY}) en la misma fila indican que hubo diferencias significativas ($P < 0.05$). ^{NS}: No hubo diferencias significativas entre tratamientos al día cero y al día treinta ($P \geq 0.05$). Dosis completa recomendada de STABILAK®: 7.2 mg (STABILAK®1) + 27.2 mg (STABILAK®2) /kg. Dosis completa de VitaPro® Nisina: 12.5 mg/kg. CV: Coeficiente de Variación. D.E: Desviación Estándar.

En la evaluación de ATECAL (%), los valores rondan desde 0.14 a 0.18% en productos lácteos frescos (Chacón Villalobos 2006). Esto demostró que la cantidad y los aditivos empleados no generaron un efecto sobre la producción de ácido láctico en el día de su elaboración. La presencia de nisina y SLP (en menor medida) limita el crecimiento de bacterias ácido lácticas (BAL), a través de mecanismos para la formación de poros en las membranas celulares gram positivas, limitando la síntesis de ácido y su aumento a través del tiempo de almacenamiento (Heredia Castro et al. 2017).

Análisis de pH

En el análisis de pH para el día cero no se encontraron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre tratamientos (Cuadro 8). Para el día 30, el tratamiento control ($P < 0.05$) disminuyó su pH en 0.18 unidades (Anexo G).

Cuadro 8

Nivel de pH del queso fresco almacenado a 7 ± 0.5 °C durante 30 días.

Tratamiento ^{NS}	Media \pm D. E	
	Día 0	Día 30
STABILAK® dosis completa	6.47 \pm 0.16 ^X	6.39 \pm 0.04 ^X
STABILAK® dosis media	6.43 \pm 0.10 ^X	6.40 \pm 0.03 ^X
Nisina dosis completa	6.44 \pm 0.17 ^X	6.44 \pm 0.02 ^X
Nisina dosis media	6.48 \pm 0.08 ^X	6.41 \pm 0.02 ^X
Control	6.49 \pm 0.04 ^X	6.31 \pm 0.07 ^Y
CV (%)	0.40	1.04

Nota. Las medias con diferentes letras (^{XY}) en la misma fila indican que hubo diferencias significativas ($P < 0.05$). ^{NS}: No hubo diferencias significativas entre tratamientos al día cero y día treinta ($P \geq 0.05$). Dosis completa recomendada de STABILAK®: 7.2 mg (STABILAK®1) + 27.2 mg (STABILAK®2) /kg. Dosis completa de VitaPro® Nisina: 12.5 mg/kg. CV: Coeficiente de Variación. D.E: Desviación Estándar.

El pH no se vio influenciado por la naturaleza ni la cantidad de aditivos empleados en el día cero. En cuanto a los resultados del día 30, la nisina es capaz de mantener sus propiedades antimicrobianas a través del tiempo en matrices de productos lácteos (Moncada Armilla 2009). La presencia de nisina y SLP inhibe la fermentación de lactosa en ácido láctico de las especies de BAL involucradas en el medio, por ende, limita el descenso del pH (Walstra et al. 2001). Para los demás tratamientos no se encontraron diferencias significativas a través del tiempo. Se conservó la acidez del medio, sugiriendo el control en el desarrollo de los microorganismos (BAL) y la capacidad amortiguadora de las proteínas (principalmente caseína) en la matriz de queso fresco (Boatella Riera et al. 2004).

Conclusiones

El SLP y nisina en todas sus concentraciones evaluadas, fue efectivo en el control del desarrollo de *Staphylococcus aureus* en la matriz de queso fresco almacenado a 7 ± 0.5 °C, gracias a su efecto bacteriostático a través de mecanismos de formación de poros en la membrana celular.

La población de *Listeria monocytogenes* fue la que decreció significativamente en todos sus tratamientos, indicando una mayor susceptibilidad a las condiciones del alimento y al efecto de los aditivos.

La dosis completa de nisina (12.5 mg/kg) fue el tratamiento más efectivo en reducir el recuento de *Listeria monocytogenes*, presentando mayor acción que el Sistema Lactoperoxidasa en las condiciones de la matriz de queso fresco.

La dosis completa de nisina (12.5 mg/kg) disminuyó la purga de suero y conservó el nivel de ácido láctico en la muestra de queso fresco. Sin embargo, los demás tratamientos no tuvieron una incidencia sobre los parámetros fisicoquímicos restantes. Esto indica que la cantidad y tipo de aditivos evaluados están designados para influir principalmente sobre la calidad microbiológica del alimento.

Recomendaciones

Evaluar la incidencia del SLP y nisina contra *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* en queso fresco a temperatura ambiente, con el fin de correlacionar la concentración (aditivos) y las condiciones de comercialización sobre la dinámica de dichos patógenos.

Evaluar el efecto de otros mecanismos de control de patógenos, como campos eléctricos pulsantes, altas presiones hidrostáticas, presencia de sales o de otras biomoléculas, sobre la actividad bacteriostática del SLP y nisina en la matriz de queso fresco.

Determinar el efecto de los aditivos en diferentes etapas de la vida anaquel del queso, con el fin de evaluar cómo varía la capacidad bacteriostática en la matriz del alimento a través del tiempo.

Evaluar el efecto del SLP y nisina sobre otros patógenos de interés alimentario incidentes en productos lácteos, como el caso de *E. coli* y *Salmonella* spp.

Referencias

- Acosta Chávez ÁJ. 2015. Efecto de dos concentraciones de cloruro de sodio y dos temperaturas en el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco pasteurizado [Tesis]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Departamento de Agroindustria Alimentaria; [consultado el 3 de oct. de 2021]. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4527/1/AGI-2015-002.pdf>.
- Ahamad N, Marth E. 1989. Behavior of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21, and 35°C in Tryptose Broth Acidified with Acetic, Citric, or Lactic Acid. *J Food Prot*; [consultado el 13 de jun. de 2022]. 52(10):688–695. eng. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31003347/>. doi:10.4315/0362-028X-52.10.688.
- Álvarez Badel B, Doria Espitia MA, Hodeg Peña V, Simanca Sotelo MM, Pastrana Puche Y, Paula CD de. 2022. Efecto de la nisina en la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y en las propiedades sensoriales del queso costeño. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*; [consultado el 13 de jun. de 2022]. 13(1):272–286. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2007-11242022000100272&script=sci_arttext&tlng=es. doi:10.22319/rmcp.v13i1.5741.
- Armenteros M, Dalvit P, Ponce P, Leyva V, Alfonso P. 2007. Análisis de riesgo de la exacerbación de patógenos alimentarios en leche cruda activada con el Sistema Lactoperoxidasa.: Risk analysis of the exacerbation of foodborne pathogens in raw milk activated with the Lactoperoxidase System. *Revista de Salud Animal*; [consultado el 13 de jun. de 2022]. 29(3). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2007000300008.
- Association of Official Analytical Chemists. 1982. AOAC 981.12: pH of acidified foods. Rockville, Maryland, USA: AOAC International. 1982; [actualizado 1982; consultado el 13 de jun. de 2022]. <https://es.scribd.com/document/456810566/AOAC981-12>.
- Association of Official Analytical Chemists. 2000. AOAC Official Method 978.18: Water Activity of Canned Vegetables. Rockville, Maryland, USA: AOAC International. 2000; [actualizado 2000; consultado el 13 de jun. de 2022]. <https://toaz.info/doc-view>.
- Atanassova V, Meindl A, Ring C. 2001. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *International Journal of Food Microbiology*; [consultado el 13 de jun. de 2022]. 68(1-2):105–113. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11545209/>. doi:10.1016/S0168-1605(01)00479-2.
- Boatella Riera J, Codony Salcedo R, López Alegret P. 2004. Química y bioquímica de los alimentos II. Barcelona: Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona. 1 online resource. ISBN: 8447528367.
- Bover S, Garriga M. 2014. Condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. España: Agència de Salut Pública de Catalunya; [consultado el 13 de jun. de 2022]. https://acsa.gencat.cat/web/.content/_Publicacions/Informes-tecnics/Informes_ACSA/informe_listeria_irta_2014_castella.pdf.
- Chacón Villalobos A. 2006. Comparación de la titulación de la acidez de leche caprina y bovina con hidróxido de sodio y cal común saturada. *Agronomía Mesoamericana*; [consultado el 13 de jun. de 2022]. 17(1):55–61. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43717109>.
- Comité Técnico de Normalización - Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. 2004. Norma Salvadoreña NSO 67.01.04:06: Productos lácteos. Quesos no madurados. Especificaciones. El

- Salvador: Defensoría del consumidor. 2004; [actualizado 2004; consultado el 15 de oct. de 2021]. <https://www.defensoria.gob.sv/images/stories/varios/NORMAS/LACTEOS/NSO67.01.04.06%20QUESOS%20NO%20MADUROS.pdf>.
- Comités Técnicos de Normalización C.A. 2012. Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.54:10): Alimentos y Bebidas Procesadas. Aditivos Alimentarios. C.A: Ministerios de Salud. 2012; [actualizado 2012; consultado el 3 de oct. de 2021]. https://www.mineco.gob.gt/sites/default/files/resolucion_283_rtca_aditivos_alimentarios.pdf.
- Costa Dias MA, Sant'Ana AS, Cruz AG, Faria JdAF, Fernandes de Oliveira CA, Bona E. 2012. On the implementation of good manufacturing practices in a small processing unity of mozzarella cheese in Brazil. *Food Control*; [consultado el 13 de jun. de 2022]. 24(1-2):199–205. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713511003999>. doi:10.1016/j.foodcont.2011.09.028.
- Cristales S. 2009. Recopilación de métodos de análisis oficiales y no oficiales más empleados para determinar fosfatasa alcalina y lactoperoxidasa en leche y quesos. [Tesis]. San Salvador: Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia; [consultado el 11 de nov. de 2021]. <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/2578/1/16101146.pdf>.
- Cuéllar Milián DA. 2015. Verificación del método para la enumeración y confirmación de *Staphylococcus aureus* en Petrifilm™, en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano [Tesis]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Departamento de Agroindustria Alimentaria; [consultado el 3 de oct. de 2021]. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstreams/200328aa-a093-4625-a402-af79c92784e0/download>.
- Davies EA, Bevis HE, Delves-Broughton J. 1997. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol*; [consultado el 13 de jun. de 2022]. 24(5):343–346. eng. doi:10.1046/j.1472-765x.1997.00145.x.
- Esteban Méndez M. 2020. El Microbioma en el Queso. 1ª ed. México: Instituto Politécnico Nacional de Durango. Informe no.1. http://www.cocyted.gob.mx/REVISTASAPIENS/ejemplares/a1/n1/04_El_microbioma_en_el_queso.pdf.
- Ferreira MA, Lund BM. 1996. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese. *Lett Appl Microbiol*; [consultado el 13 de jun. de 2022]. 22(6):433–438. eng. doi:10.1111/j.1472-765x.1996.tb01197.x.
- Flynn B, De Riancho D, Lawton M, Alcaine S. 2021. Evaluation of Lactose Oxidase as an Enzyme Based Antimicrobial for Control of *L. monocytogenes* in Fresh Cheese. *Foods*; [consultado el 13 de jun. de 2022]. 10(7). eng. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8307525/>. doi:10.3390/foods10071471.
- García Gámez J. 2019. Efecto de dos temperaturas de pasteurización y dos presiones de homogenización en las características físicoquímicas y sensoriales del Queso Crema Zamorano [Tesis]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Departamento de Agroindustria Alimentaria; [consultado el 5 de oct. de 2021]. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6523/1/AGI-2019-T025.pdf>.
- Garzón P, Ramirez Martinez, Muñoz Molina. 2019. *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular: *Staphylococcus aureus*: generalities, mechanisms of pathogenicity and cell colonization. *NOVA*; [consultado el 22 de may. de 2022]. 17(32):25–38. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-25.pdf>.

- Gedarawatte ST, Ravensdale JT, Johns ML, Li M, Al-Salami H, Dykes GA, Coorey R. 2022. Evaluation of the water holding and anti-spoilage effect of a bacterial cellulose nanocrystal coating for the storage of vacuum packaged beef. *Food Packaging and Shelf Life*; [consultado el 13 de jun. de 2022]. 31:100818. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214289422000102>. doi:10.1016/j.fpsl.2022.100818.
- Grisi T, Gorlach Lira K. 2005. Action of nisin and high pH on growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella sp.* in pure culture and in the meat of land crab (*Ucides cordatus*). *Brazilian Journal of Microbiology*; [consultado el 13 de jun. de 2022]. 36(2):151–156. <https://www.scielo.br/j/bjm/a/ZkXpvZKLZGXcf59tTnjcXtz/>. doi:10.1590/S1517-83822005000200010.
- Haaber J, Cohn MT, Frees D, Andersen TJ, Ingmer H. 2012. Planktonic aggregates of *Staphylococcus aureus* protect against common antibiotics. *PLoS One*; [consultado el 14 de jun. de 2022]. 7(7):1-12. eng. doi:10.1371/journal.pone.0041075.
- Heredia Castro P, Hernández Mendoza A, González Córdoba A, Vallejo Córdoba B. 2017. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*; [consultado el 13 de jun. de 2022]. 42(6):340–346. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33951621002.pdf>.
- Huaraca Aparco R. 2013. Evaluación del rendimiento, características organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas del queso fresco elaborado con leche con y sin adición del activador del Sistema Lactoperoxidasa (LP) [Tesis]. Perú: Universidad Nacional José María Arguedas, Escuela Profesional De Ingeniería Agroindustrial; [consultado el 3 de oct. de 2021]. https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNAJ_084920487ec2c5b6779c67eaa414d79d.
- Maldonado R, Melendez B, Arispe I, Boeneke C, Torrico D, Prinyawiwatkul W. 2013. Effect of pH on technological parameters and physicochemical and texture characteristics of the pasta filata cheese *Telita*. *J Dairy Sci*; [consultado el 13 de jun. de 2022]. 96(12):7414–7426. eng. doi:10.3168/jds.2013-6887.
- Martins J, Cerqueira M, Souza B, Carmo Avides Md, Vicente A. 2010. Shelf life extension of ricotta cheese using coatings of galactomannans from nonconventional sources incorporating nisin against *Listeria monocytogenes*. *J Agric Food Chem*. 58(3):1884–1891. eng. doi:10.1021/jf902774z.
- Michelon D, Leclercq A, Garric G, Guillier L, Beaufort A, Bergis H. 2016. Growth Potential Assessment of *Listeria* in Milk Fat Products by Challenge Testing. *Journal of Food Safety*; [consultado el 13 de jun. de 2022]. 36(2):260–270. doi:10.1111/jfs.12239.
- Moncada Armilla A. 2009. Evaluación de la nisina como agente antimicrobiano en el proceso de envasado de leche UHT [Tesis]. Colombia: Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería; [consultado el 13 de jun. de 2022]. <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/25839/amoncadaa%20.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Ochoa A. 2009. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de ϵ - polisona - I y Natamicina, su incorporación en un empaque activo y aplicación en queso fresco. [Tesis]. México: Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química; [consultado el 10 de nov. de 2021]. https://smbb.mx/congresos%20smbb/acapulco09/TRABAJOS/AREA_III/OIII-17.pdf.
- Pimentel Filho N, Mantovani H, Carvalho A de, Dias R, Vanetti M. 2014. Efficacy of bovicin HC5 and nisin combination against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in fresh cheese. *Int J Food Sci Technol*; [consultado el 13 de jun. de 2022]. 49(2):416–422. <https://ifst.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijfs.12316>. doi:10.1111/ijfs.12316.

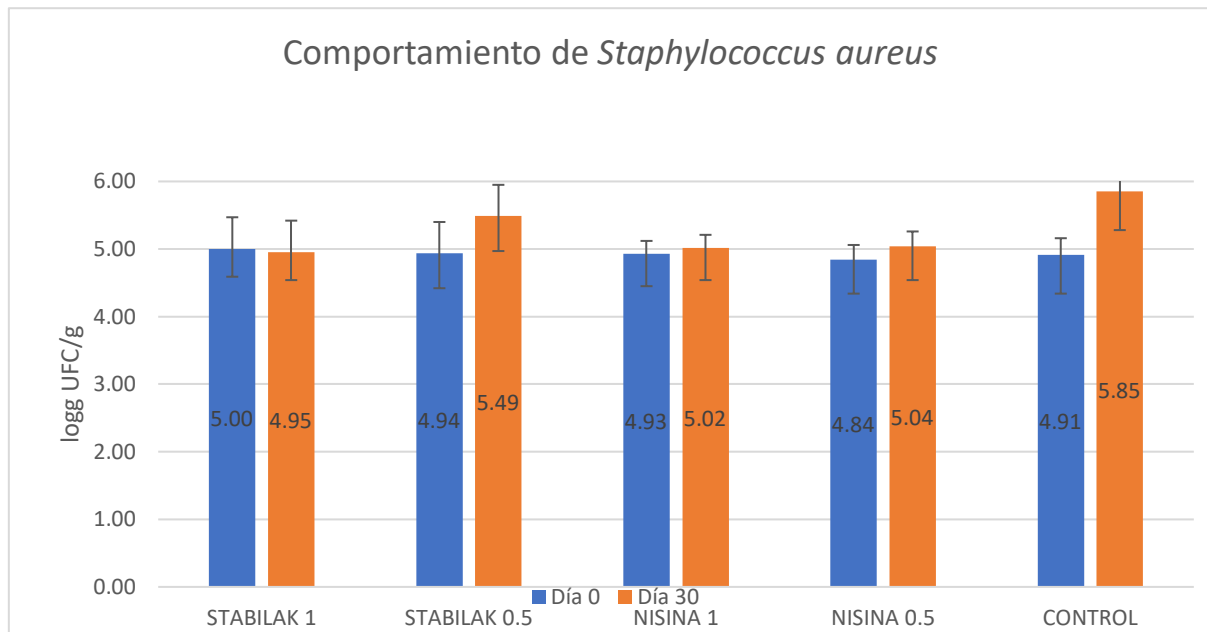
- Pinto M, Carvalho A de, Pires ACdS, Campos Souza A, Da Fonseca Silva P, Sobral D, Paula JCI de, Lima Santos A de. 2011. The effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and the physicochemical properties of Traditional Minas Serro cheese. *International Dairy Journal*; [consultado el 13 de jun. de 2022]. 21(2):90–96. doi:10.1016/j.idairyj.2010.08.001.
- Ponce P. 2010. Lactoperoxidase System under tropical conditions: use, advantages and limitations in conservation of raw milk and potential applications. *Revista de Salud Animal*; [consultado el 22 de may. de 2022]. 32(3):146–154. <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v32n3/rsa02310.pdf>.
- Ramírez López C, Vélez Ruiz J. 2012. Quesos frescos: propiedades, métodos de determinación y factores que afectan su calidad. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*; [consultado el 23 de may. de 2022]. 6(2):131–148. https://www.researchgate.net/profile/Carolina-Ramirez-Lopez/publication/303959697_Quesos_frescos_propiedades_metodos_de_determinacion_y_factores_que_afectan_su_calidad/links/57601b6208ae227f4a3ee94e/Quesos-frescos-propiedades-metodos-de-determinacion-y-factores-que-afectan-su-calidad.pdf.
- Sánchez Martín M, Salgado Calvo M, Hernández Á, Pachón J, Rodríguez E, Pastor Martín M, Cabrero Lobato P. 2019. Nisina (N 234), aditivo utilizado como conservante en alimentos. *Gaceta Médica de Bilbao*; [consultado el 24 de may. de 2022]. 116(4):166–173. <http://www.gacetamedicabilbao.eus/index.php/gacetamedicabilbao/article/view/718/726>.
- Suárez Gea AM. 1997. Producción de anticuerpos frente a la nisina A: estrategias de inmunización y desarrollo de inmunoensayos [Tesis Doctoral]. España: Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Nutrición y Bromatología; [consultado el 13 de jun. de 2022]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/3053/1/T22066.pdf>.
- Walstra P, Geurts T, Normen A, Jellema, Van Boekel, editores. 2001. *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. España: Editorial Acribia S.A. ISBN: 978-84-200-0961-2; [consultado el 13 de may. de 2022].

Anexos

Anexo A

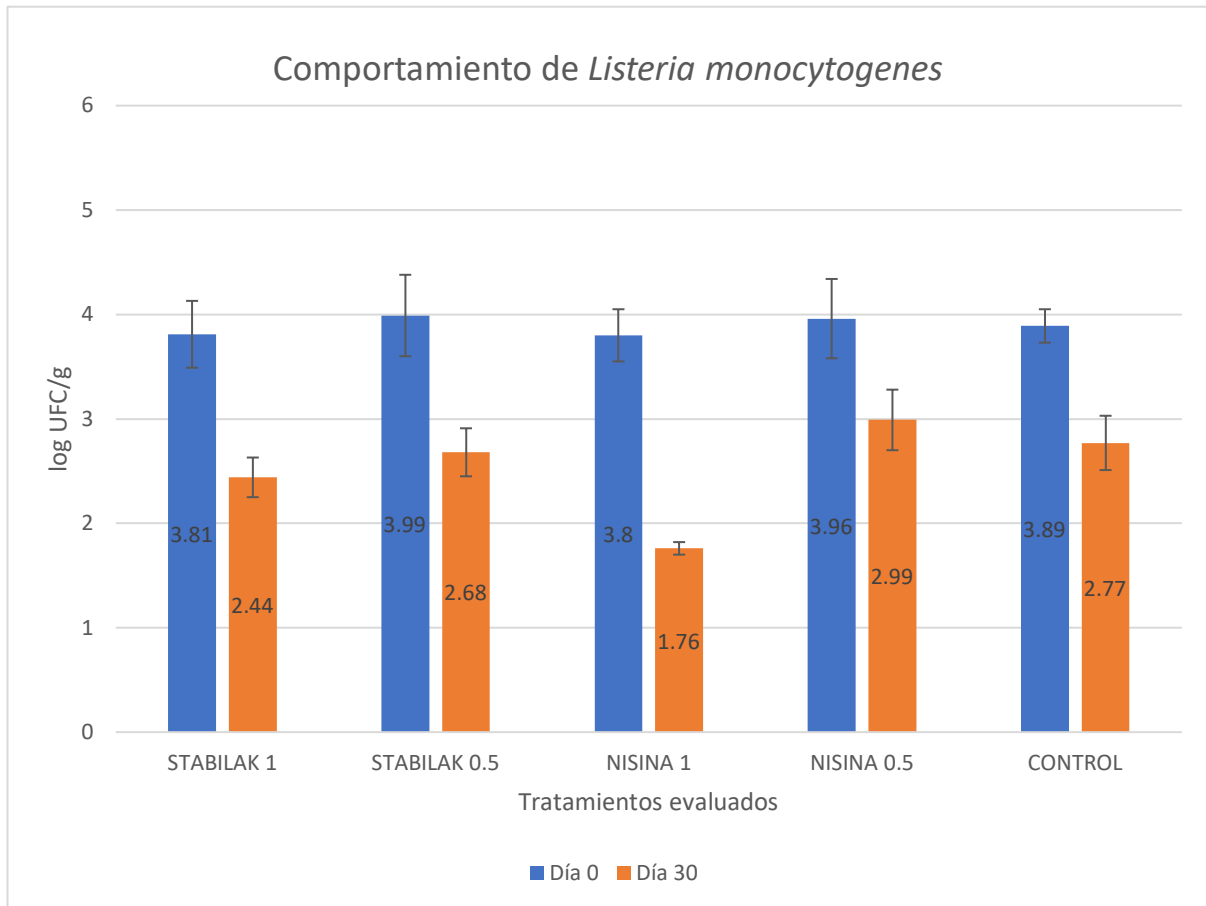
Curva de comportamiento de Staphylococcus aureus en queso fresco inoculado almacenado a 7 ± 0.5

$^{\circ}\text{C}$ durante 30 días.



Anexo B

Curva de comportamiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco inoculado almacenado a 7 ± 0.5 °C durante 30 días.



Anexo C

Rendimiento obtenido en la elaboración del queso fresco.

Tratamiento ^{NS}	Media ± D.E (%)
STABILAK dosis completa	21.27 ± 0.55
STABILAK dosis media	20.64 ± 1.87
Nisina dosis completa	19.77 ± 1.79
Nisina dosis media	19.89 ± 0.39
Control	22.14 ± 0.31
CV (%)	5.82

Nota. NS: No hubo diferencias significativas entre tratamientos ($P \geq 0.05$). Dosis completa recomendada de STABILAK®: 7.2 mg (STABILAK®1)

+ 27.2 mg (STABILAK®2) /kg. Dosis completa de VitaPro® Nisina: 12.5 mg/kg. CV: Coeficiente de Variación. D.E: Desviación Estándar.

Anexo D

Valores de Índice de Blancura (Color) del queso fresco almacenado a 7 ± 0.5 °C durante 30 días.

Tratamiento ^{NS}	Media \pm D. E	
	Día 0	Día 30
STABILAK® dosis completa	82.23 \pm 3.46	81.68 \pm 0.86
STABILAK® dosis media	83.15 \pm 1.67	80.41 \pm 0.28
Nisina dosis completa	83.40 \pm 2.61	81.33 \pm 0.69
Nisina dosis media	83.39 \pm 2.80	80.54 \pm 0.62
Control	83.54 \pm 2.17	80.65 \pm 0.47
CV (%)	2.72	0.68

Nota. NS: No hubo diferencias significativas entre tratamientos ($P \geq 0.05$). Dosis completa recomendada de STABILAK®: 7.2 mg (STABILAK®1)

+ 27.2 mg (STABILAK®2) /kg. Dosis completa de VitaPro® Nisina: 12.5 mg/kg. CV: Coeficiente de Variación. D.E: Desviación Estándar.

Anexo E

Actividad de agua del queso fresco almacenado a 7 ± 0.5 °C durante 30 días.

Tratamiento ^{NS}	Media \pm D. E	
	Día 0	Día 30
STABILAK® dosis completa	0.922 \pm 0.01	0.947 \pm 0.04
STABILAK® dosis media	0.912 \pm 0.02	0.944 \pm 0.03
Nisina dosis completa	0.914 \pm 0.01	0.952 \pm 0.04
Nisina dosis media	0.922 \pm 0.01	0.955 \pm 0.04
Control	0.948 \pm 0.02	0.975 \pm 0.04
CV (%)	1.56	1.28

Nota. NS: No hubo diferencias significativas entre tratamientos ($P \geq 0.05$). Dosis completa recomendada de STABILAK®: 7.2 mg (STABILAK®1)

+ 27.2 mg (STABILAK®2) /kg. Dosis completa de VitaPro® Nisina: 12.5 mg/kg. CV: Coeficiente de Variación. D.E: Desviación Estándar.

Anexo F

Nivel de significancias de los parámetros evaluados por variables involucradas en el estudio.

	TRT	DÍA	TRT*DÍA	F	Pr ≥ F	R2
Log UFC/g de <i>S. aureus</i>	0.06	0.01	0.05	4.41	0.01	0.89
Log UFC/g de <i>Listeria</i>	0.91	<0.0001	0.01	36.65	<.0001	0.99
Color (IB)	0.99	0.01	0.78	1.28	0.35	0.71
a _w	0.22	0.01	0.99	1.86	0.16	0.78
pH	0.69	0.02	0.34	1.36	0.31	0.72
ATECAL	0.65	<0.0001	0.07	4.21	0.01	0.89
Rendimiento	0.17	.	.	2.02	0.17	0.45
% Purga	0.02	.	.	4.82	0.02	0.66

Anexo G

Significancias de la prueba t student (pareada) de los parámetros evaluados por variables involucradas en el estudio.

<i>T Test Pooled (Pr ≥ t)</i>	IB	aw	pH	ATECAL
STABILAK dosis completa	0.80	0.31	0.13	0.01
STABILAK dosis media	0.05	0.22	0.60	0.04
Nisina dosis completa	0.25	0.17	0.95	0.49
Nisina dosis media	0.16	0.23	0.27	0.02
Control	0.09	0.35	0.02	0.01