



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

NOVENO SEMINARIO DE GRADUACIÓN

**TEMA: APLICACIÓN DE NISINA PARA INCREMENTAR EL TIEMPO
DE VIDA ÚTIL EN QUESO FRESCO EN EL CENTRO DE
ADIESTRAMIENTO LECHERO (CAL) EN EL 2010”**

**Trabajo de Investigación previo a la obtención del Título de Ingeniero en
Alimentos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, A través de la
Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos**

Autor: OSCAR HERNÁN LÓPEZ BENALCÁZAR

AMBATO - ECUADOR

2010

APROBACIÓN DEL TUTOR DE TESIS

Ingeniero Cesar A. German T.

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Investigación sobre el tema: “**APLICACIÓN DE NISINA PARA INCREMENTAR EL TIEMPO DE VIDA ÚTIL EN QUESO FRESCO EN EL CENTRO DE ADIESTRAMIENTO LECHERO (CAL) EN EL 2010**” del Egresado: Oscar Hernán López Benalcázar, considero que dicho trabajo investigativo reúne los requisitos y méritos suficientes para se sometido a la evaluación del Jurado Examinador designado por el H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Ambato, Junio del 2010.

EL TUTOR

.....

Ing. Cesar A. German T

AUTORÍA DE TRABAJO DE GRADO

Los criterios emitidos en el trabajo de investigación “**APLICACIÓN DE NISINA PARA INCREMENTAR EL TIEMPO DE VIDA ÚTIL EN QUESO FRESCO EN EL CENTRO DE ADIESTRAMIENTO LECHERO (CAL) EN EL 2010**”, como también los contenidos, ideas, análisis, conclusiones y recomendaciones son de exclusiva responsabilidad de mi persona, como autor del trabajo de grado.

Ambato, Junio del 2010

EL AUTOR

.....
Oscar H. López B.
CI: 1803930898

.....
Ing. Cesar A. German T.
Tutor

Dedicatoria

A la memoria de mi Padre quien desde siempre ha sido mi inspiración y fortaleza ante las adversidades.

A mi Mamy Bony que con valentía ha sacado adelante nuestro hogar y con sus sabias enseñanzas nos ha inculcado a ser perseverantes, luchar y vivir en armonía.

A mis hermanas Pau y Lishy que también han sido un pilar fundamental en mi formación personal y profesional y me han apoyado en todo momento, con nuestro compromiso de progresar juntos en este gran camino de la vida

A mi sobrina Amy quien llegó a nuestras vidas a llenarnos de felicidad e inspiración para seguir adelante.

A mis amigos de ayer, hoy y siempre, que me han acompañado en las buenas y malas alentándome para alcanzar el éxito

En cada pedacito de mi vida les llevo en mi corazón.

Oscar

Agradecimiento

A Dios creador del universo y dueño de mi vida, que me permitió nacer en una hermosa tierra y hogar, en cada momento me brinda oportunidades, y me ha permitido ser quien soy.

A mi Familia por estar presente y apoyarme emocional, sentimental y económicamente en mi formación y en este momento lograr uno de mis grandes objetivos: culminar mi carrera profesional.

A la Universidad Técnica de Ambato por ser la institución que me abrió las puertas para continuar mis estudios superiores.

A los directivos, profesores, empleados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos que me han apoyado en cada instante.

A mi Tutor y amigo, Ingeniero César German, quien con paciencia y entusiasmo ha propiciado esta investigación brindando su apoyo incondicional.

Al Instituto Tecnológico Agropecuario Luis A. Martínez por medio del Centro de Adiestramiento Lechero me permitieron llevar a cabo la fase experimental de la presente, especialmente a mi profesor y amigo Ing. Julio Gutiérrez.

A la Unidad Operativa de Investigación en Tecnología de Alimentos por medio de la Ingeniera Mónica Silva que han sido mi apoyo especialmente en la realización de los análisis de la presente tesis.

A mis queridos compañeros de la Facultad y a todas las personas que directa o indirectamente participaron leyendo, opinando, corrigiendo, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y de felicidad.

A todos ustedes que confiaron en mi muchas Gracias.

Oscar

INDICE GENERAL

CAPITULO I

PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

	Pág
Tema.....	01
Planteamiento del problema.....	01
Contextualización.....	01
Análisis crítico.....	03
Árbol de Problema.....	03
Relación causa-Efecto.....	04
Prognosis.....	04
Formulación del problema.....	04
Interrogantes.....	04
Delimitación del objeto de investigación.....	05
Justificación.....	05
Objetivos.....	06

CAPITULO II

MARCO TEORICO

Antecedentes de la Investigación.....	07
Fundamentación Filosófica.....	11
Descripción del proceso.....	11
Fundamentación Legal.....	17
Marco Conceptual de las Variables.....	21
Desconocimiento de la aplicación de nisina.....	21
Reducido tiempo de vida útil.....	26
Gráficos de inclusión interrelacionados.....	31
Hipotesis.....	32

CAPITULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

Enfoque.....	33
Modalidad Básica de la Investigación.....	33
Nivel o tipo de Investigación.....	34
Población y Muestra.....	35
Operacionalización de Variables.....	35
Recolección de Información.....	38
Procesamiento y Análisis.....	39
Materiales y Equipos.....	42
Metodología de cálculo de tiempos de vida útil.....	43

CAPITULO IV
ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

Análisis e Interpretación de Resultados.....	44
ph y peso de las muestras.....	48
Recuento Total de microorganismos (ufc/gr).....	49
Recuento de Coliformes Totales.....	54
Análisis Sensorial.....	59
Determinación de tiempo de vida útil.....	66
Estudio Económico.....	71

CAPITULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones.....	74
Recomendaciones.....	75

CAPITULO VI
PROPUESTA

Datos Informativos.....	76
Antecedentes de la Propuesta.....	76
Justificación.....	77
Objetivos.....	77
Análisis de Factibilidad.....	78
Fundamentación.....	79
Metodología.....	79
Administración.....	79
Previsión de la Evaluación.....	79
Bibliografía.....	81
Anexos.....	85

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1.- Requisitos del queso fresco.....	18
Tabla N° 2.- Requisitos microbiológicos del queso fresco.....	19
Tabla N° 3 Requisitos microbiológicos del queso fresco (lotes o partidas).....	19
Tabla N° 4.- Requisitos Microbiológicos.....	20
Tabla N° 5.-Dosificación de la nisina.....	21
Tabla N ° 6.- Operacionalización del Desconocimiento de la Aplicación de nisina...	36

Tabla N° 7.- Operacionalización del Reducido tiempo de vida útil.....	37
Tabla N° 8.- Explicitación de procedimientos para recolección de información.....	39
Tabla N° 9.- Utilización de un conservante para elaboración de queso en el CAL.....	44
Tabla N° 10.- Tipos de conservantes en el mercado.....	44
Tabla N° 11.- Uso de Nisina en la elaboración de queso fresco.....	45
Tabla N° 12.- Cantidad de nisina por Kg de Queso.....	46
Tabla N° 13.- Tratamientos a aplicarse.....	47
Tabla N° 14.- pH, Peso y Rendimiento de muestras de queso con la aplicación de nisina.....	48
Tabla N° 15.- Recuento de Aerobios Totales (ufc/gr) en Queso Fresco Elaborado con Leche Cruda y Pasteurizada con la adición de nisina en diferentes concentraciones.....	49
Tabla N° 16.- Porcentaje de Disminución en el recuento de aerobios totales al incluir nisina en diferentes concentraciones.....	50
Tabla N° 17.- Análisis de Varianza para Recuento de Aerobios Totales en los diferentes tratamientos aplicados.....	51
Tabla N° 18.- Prueba de Comparación Múltiple Tukey para queso fresco.....	52
Tabla N° 19.- Prueba de Comparación Múltiple Tukey para nisina utilizada.....	52
Tabla N° 20.- Prueba de Comparación Múltiple Tukey para la interacción axb.....	53
Tabla N° 21.- Recuento de Coliformes Totales en Queso Fresco Elaborado con Leche Cruda y Pasteurizada y con la Adición de Nisina en diferentes concentraciones.....	54
Tabla N° 22.- Porcentaje de Disminución en el recuento de aerobios totales al incluir nisina en diferentes concentraciones.....	55
Tabla N° 23.- Análisis de Varianza para Recuento Coliformes Totales en los diferentes tratamientos aplicados.....	56
Tabla N° 24.- Prueba de Comparación Múltiple Tukey para queso fresco.....	57
Tabla N° 25.- Prueba de Comparación Múltiple Tukey para nisina utilizada.....	57
Tabla N° 26.- Prueba de Comparación Múltiple Tukey para interacción axb.....	58
Tabla N° 27.- Tratamiento para disminuir aerobios y coliformes totales en queso fresco.....	59
Tabla N° 28.- Tratamiento aritmético de los datos de la evaluación sensorial del queso fresco con la aplicación de Nisina.....	62
Tabla N° 29.- Análisis de Varianza (Evaluación Sensorial del Color).....	62
Tabla N° 30.- Análisis de Varianza (Evaluación Sensorial del Olor).....	63
Tabla N° 31.- Análisis de Varianza (Evaluación Sensorial de la sabor).....	64
Tabla N° 32.- Análisis de Varianza (Evaluación Sensorial de la textura).....	65
Tabla N° 33.- Análisis de Varianza (Evaluación Sensorial de Aceptabilidad).....	65
Tabla N° 34.- Recuento de Coliformes Totales en Queso Fresco testigo (sin tratamiento) para la determinación de vida útil durante 14 días.....	66

Tabla N° 35.- Recuento de Coliformes Totales en Queso Fresco con tratamiento (0.5gr nisina/kg queso) para la determinación de vida útil durante 14 días.....	68
--	----

INDICE DE GRAFICOS

Gráfico N° 1.- Árbol de Problema	03
Grafico N° 2: Estructura primaria de la nisina.....	25
Gráfico N° 3.- Superodinación Conceptual.....	31
Gráfico N° 4.- Subordinación Conceptual.....	32
Gráfico N° 5.- Tendencia de ufc/gr (coliformes totales) en queso fresco sin tratamiento durante 14 días.....	66
Gráfico N° 6.- Ln(ufc/gr) Coliformes Totales vs tiempo en Queso Fresco sin tratamiento.....	67
Gráfico N° 7.- Tendencia de ufc/gr en queso fresco con tratamiento durante 14días.....	69
Gráfico N°8.- Ln(ufc/gr) Aerobios Totales vs tiempo en Queso Fresco con tratamiento.....	69

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

**“APLICACIÓN DE NISINA PARA INCREMENTAR EL TIEMPO DE VIDA
ÚTIL EN QUESO FRESCO EN EL CENTRO DE ADIESTRAMIENTO
LECHERO (CAL) EN EL 2010”**

Autor: Oscar H. López B.

Tutor: Ing. Cesar A. German T.

RESUMEN:

En el presente trabajo se demostró la efectividad de la Nisina, prolongando el tiempo de vida útil en queso fresco en el Centro de Adiestramiento Lechero (CAL), este conservante actúa como agente antimicrobiano. Se utilizaron cuatro diferentes concentraciones de nisina, esta se añadió posterior al lavado de la cuajada. El conservante se aplicó en quesos elaborados con leche cruda y leche pasteurizada con su respectiva replica. Se analizó Aerobios y Coliformes totales los cuales disminuyeron un 99.2% y 98.5% respectivamente al añadir 0.5gr de Nisina por Kg de queso elaborado con leche pasteurizada, las muestras presentaron una insignificante diferencia en sus características físico – químicas y sensoriales. El uso de nisina en queso fresco elaborado con leche pasteurizada permitió prolongar aproximadamente 4 días adicionales de vida útil normal.

INTRODUCCIÓN

La contaminación en queso fresco es un problema que se ha venido dando en el Centro de Adiestramiento Lechero. En principio se debe al deficiente manejo de prácticas de manufactura, pero al aplicarlo si bien disminuye no desaparece.

El Centro de Adiestramiento Lechero se encuentra ubicado en la ciudad de Ambato en el Instituto Tecnológico Agropecuario Luis A. Martínez en la calle Rumiñahui y Pichincha, es una planta piloto utilizada para la enseñanza y aprendizaje de los alumnos del Instituto, además expende los productos allí procesados como: Leche pasteurizada, queso fresco, mozzarella, andino, yogurt natural y sabor, mantequilla, y crema.

La planta labora con un volumen aproximado de 500 litros diarios, tienen inconvenientes en lo que respecta a la comercialización, debido a la existencia de los mismos productos que ellos elaboran pero con mejor valor agregado (empaque, vida útil), el queso que oferta el Centro de Adiestramiento Lechero tiene aproximadamente 8 días de vida útil, tiempo reducido para competir en el mercado ya que los demás alcanzan de 15 a 30 días.

Existen diversos conservantes para queso en el mercado, lamentablemente los que se oferta son sintéticos y por evitar enfermedades provocadas por microorganismos se han ocasionando otro tipo de enfermedades, por lo cual un beneficio para el consumidor y para el industrial es utilizar un bioconservante.

El presente proyecto tiene la finalidad de estudiar la aplicación de nisina para incrementar el tiempo de vida útil en queso fresco en el Centro de Adiestramiento Lechero en el 2010, este bioconservante (Nisina) se inactiva por las enzimas del tracto digestivo humano, inhibe las bacterias Gram positivas incluyendo las patógenas, disminuye la carga microbiana del producto y así aumenta el tiempo de vida útil en el queso, brindando mayor confiabilidad a los clientes e incrementando ventas en el centro de Adiestramiento Lechero (CAL).

CAPITULO I

CONTAMINACIÓN MICROBIANA EN QUESO FRESCO

1.1 Tema

“APLICACIÓN DE NISINA PARA INCREMENTAR EL TIEMPO DE VIDA ÚTIL EN QUESO FRESCO EN EL CENTRO DE ADIESTRAMIENTO LECHERO (CAL) EN EL 2010”

1.2. Planteamiento del Problema

1.2.1 Contextualización

Contexto Macro

La provincia de Tungurahua se encuentra ubicada en los hemisferios Sur y Occidental, está comprendida entre los paralelos 00°55'00"S y 01°35'00" y los meridianos 78°06'51" y 78°55'49", es una de las principales provincias productoras de leche y también de sus derivados especialmente queso fresco, el mismo que en varias ciudades de la provincia es elaborado artesanalmente.

En la provincia de Tungurahua el queso fresco es uno de los productos lácteos más consumidos, lamentablemente en su mayoría son expendidos irresponsablemente, sin brindar las adecuadas condiciones de almacenamiento, como es cadena de frío, lo cual es un gran foco de contaminación. A nivel nacional la preocupación de industriales es como incrementar el tiempo de vida útil en su producto, ya que por mas que brinden todas las condiciones adecuadas antes de llegar al consumidor este se contamina variando sus características es así que pierde gran cantidad de suero influenciando en la textura del producto, aumentando su acidez perdiendo calidad y aceptabilidad.

Según **Diario Los Andes** (Diciembre-2008), El Consejo Provincial de Tungurahua, implementó mancomunadamente con 744 pequeños ganaderos, acopios en cuatro centros y comercializan 96 mil litros de leche y 56 mil quesos mensuales, alcanzando ventas por 83 mil 900 dólares a través de la Cadena Provincial de Lácteos.

En el I Censo Agropecuario realizado en el año 2000, diariamente en Tungurahua se producen 264.451 litros de los cuales el 85.33% se venden en líquido, 9.97% es consumida en la propia finca, y apenas el 3.86% es procesada. Con datos proyectados a la fecha actual, se produce diariamente un aproximado de 372.000 litros de leche de los cuales más del 80% se vende en líquido.

Contexto Meso

El cantón Ambato se encuentra ubicado en la provincia de Tungurahua, por estar en el centro del país se convierte en una ciudad comercial, existe una variedad de proveedores entre ellos grandes industrias queseras, queseras artesanales de todos los rincones del país.

Según **Gómez Juan C. (Diario el Universo Julio-2009)** las industrias queseras que mayor acogida tienen en Ambato son las que se encuentran ubicadas sectores aledaños, entre estos podemos mencionar Quisapincha, Juan Benigno Vela, Pilahuin.

Contexto Micro

El Instituto Tecnológico Agropecuario Luis A. Martínez se encuentra ubicado en la calle Rumiñahui y Pichincha, al ser una institución dedicada a la formación de estudiantes con conocimientos de agronomía y agroindustria se vió en la necesidad de implantar una planta piloto para la elaboración de productos lácteos, en los años 1980 realizan un convenio con la FAO el mismo fue fortificándose permitiendo que en el año 1986 se funde el Centro de Adiestramiento Lechero (CAL), una planta piloto con características únicas de ese entonces en el país.

Desde ahí el CAL se encuentra elaborando diferentes productos para lo cual se aprovecha la mano de obra de los señores estudiantes, la capacidad de de esta planta es de 500lt/h pudiendo trabajar en bach alrededor de 1000 lt.

Actualmente la planta piloto se utiliza para el aprendizaje de los alumnos y se encuentra organizada administrativamente por un Jefe de Planta Ingeniero Julio Gutiérrez, un asistente de planta que conjuntamente con los señores estudiantes

colaboran con la mano de obra, una persona encargada de mantenimiento, el personal auxiliar como contador, guarda almacén, vendedor, proveedor.

Los productos que se ofertan son: Leche pasteurizada, queso fresco, mozzarella, andino, yogurt natural y sabor, mantequilla y crema. Se procesan un aproximado de 400 a 500 litros diarios de Leche los días lunes miércoles y viernes, distribuidos 100 litros para queso fresco los cuales son elaborados solo dos días a la semana, es decir un aproximado de 200 litros por semana, con un rendimiento de 6.5 litros por kilo de queso, obteniendo un aproximado de 30 kilos por semana de queso.

Existe inconvenientes en lo que respecta la comercialización, ya que en el mercado se ofertan diferentes marcas de leche UHT, quesos empacados al vacío lo que les permite tener mayor tiempo de vida útil, el Ingeniero Gutiérrez menciona que se aplica las Buenas Prácticas de Manufactura y concientiza al personal y alumnos que laboran en la planta para que estas sean aplicadas, pero aun así no ha podido superar la problemática de vida útil del queso, ya que al cliente le gusta que el producto sea firme, duro y que no presente desuerado, pero al avanzar los días el queso tiende a deshidratarse y perder la firmeza característica.

1.2.2 Análisis Crítico

Árbol de Problema

Gráfico 1.- Árbol de Problema



Elaborado por: Oscar H. López B., 2010

Relación causa – efecto

La contaminación microbiológica, es un problema que degrada al queso fresco por la presencia de microorganismos, estos ocasionan cambios fisicoquímicos, sensoriales y reducción del tiempo de vida útil, la aplicación de nisina altera las condiciones de sobrevivencia de los microorganismos, lo que afecta al crecimiento y reproducción de estos. (Anexo 1)

1.2.3 Prognosis

El queso fresco por su humedad y gran cantidad de proteína tiende a contaminarse con facilidad, presentando degradación, porosidad y flacidez en la textura, al no aplicar nisina el queso fresco seguirá teniendo alta carga microbiana y reducido tiempo de vida útil ocasionado pérdidas económicas en el Centro de Adiestramiento Lechero, además al no dar solución a este problema produciría enfermedades a los consumidores por ingerir toxinas emanadas por microorganismos en el producto.

1.2.4 Formulación del Problema

¿Es el desconocimiento de la aplicación de nisina, la que produce contaminación microbiana en queso fresco conllevando a un reducido tiempo de vida útil en el Centro de Adiestramiento Lechero en el 2010?

Variable independiente = desconocimiento de la Aplicación de nisina

Variable dependiente = reducido tiempo de vida útil

1.2.5 Interrogantes

¿El uso de materia prima de mala calidad produce contaminación en queso fresco?

¿Por qué existe deficiente manejo de Buenas Prácticas de manufactura?

¿Cómo se podría capacitar al personal no calificado?

¿Cómo se puede brindar un almacenamiento adecuado en queso fresco?

¿Cuál sería la solución para disminuir las ETA`s?

¿Cómo se evitaría la pérdida de clientes por contaminación de quesos?

¿A qué conlleva el rechazo de queso fresco?

1.2.6 Delimitación del Objeto de Investigación

Campo: Tecnología de Lácteos

Área: Aditivos Alimenticios

Aspecto: Bioconservante

Espacial: Centro de Adiestramiento Lechero (Ambato-calle Pichincha y Rumiñahui esquina)

Temporal:

Tiempo Problema: Mayo 2009

Tiempo de Investigación: 18 de Julio 2009 – 29 de Mayo 2010

1.3 Justificación

Los lácteos o derivados de la leche son un conjunto de alimentos que, por sus características nutricionales, son considerados los más básicos y completos en cuanto a composición de nutrientes, ya que aporta al cuerpo con hidratos de carbono, proteínas, grasas, vitaminas y minerales.

En el caso concreto del queso, destaca su importante contenido de proteínas de alto valor nutricional, grasas que proporcionan energía, fósforo y ante todo calcio, mineral básico para el desarrollo de los seres humanos. No obstante, es potencialmente peligroso por el crecimiento rápido de bacterias, siendo prioritario una manipulación adecuada y la refrigeración del producto terminado para evitar que se convierta en una fuente de propagación de enfermedades.

La aplicación de nisina es una alternativa para acrecentar la estabilidad y seguridad microbiológica en queso fresco y evitar la presencia de microorganismos patógenos.

La elaboración de este proyecto permitió prolongar el tiempo de vida útil de queso fresco elaborado en el Centro de Adiestramiento Lechero, aplicando en su tecnología la adición de Nisina.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

- Estudiar la aplicación de Nisina para incrementar el tiempo de vida útil en queso fresco en el Centro de Adiestramiento Lechero en el 2010.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Analizar la concentración de Nisina en queso fresco para demostrar la funcionalidad de bioconservante.
- Evaluar la aceptación de consumidores de queso fresco a los mejores tratamientos mediante la respectiva evaluación sensorial.
- Estimar el tiempo de vida útil en el queso fresco con la finalidad de prolongar la conservación.
- Realizar un análisis de costo de producción de queso fresco con nisina en el Centro de Centro de Adiestramiento Lechero.
- Proponer el uso de nisina en queso fresco para prolongar la vida útil.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1 Antecedentes investigativos

Según **Castro Gustavo y Colaboradores (2009)** La nisina es una bacteriocina capaz de frenar el crecimiento de microorganismos Gram positivos, entre ellos *Staphylococcus aureus*. El empleo de cultivos iniciadores productores de bacteriocinas, representa una alternativa para elaboración de quesos con mejor calidad microbiológica.

Aproximadamente el 50% de la producción nacional de quesos se realiza mediante procesos artesanales o semi-industriales, que generalmente emplea leche cruda, muchas veces obtenida bajo un ambiente antihigiénico por el ordeño. Esa elaboración artesanal se dá, tanto en pequeñas plantas procesadoras como en las mismas unidades de explotación lechera. A nivel semi-industrial, aunque se cuente con tecnologías que mejoran la productividad, existen muchas fallas en cuanto a normas sanitarias, en parte debido a la escasa formación técnica del personal.

Según la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN), la leche utilizada para la elaboración de queso blanco debe ser pasteurizada, pero la pasteurización por si sola no representa la solución a los casos de intoxicación estafilocócica, ya que el proceso logra destruir al *Staphylococcus aureus*, pero no a la toxina causante de la enfermedad. Es por ello que la solución debe abarcar las condiciones higiénico- sanitarias durante el ordeño y manejo de la leche antes del procesamiento.

Se debe tener en cuenta además, que éste microorganismo constituye parte de la flora bacteriana de animales y humanos, siendo éstos considerados como los principales reservorios, aunque también se puede encontrar en el agua, suelo, polvo, aire o equipos empleados en la elaboración de alimentos. En consecuencia, si se tiene un manejo poco cuidadoso de los productos terminados, existe la posibilidad de que los quesos se contaminen con el patógeno y con ello el riesgo de producir ETA. La

industria tiene la alternativa de emplear preservantes biológicos, para satisfacer el interés de los consumidores por obtener alimentos inocuos y naturales, es decir, elaborados con estricto control de calidad sanitaria y sin la adición de aditivos químicos artificiales.

El *Lactococcus lactis subsp. lactis* es una bacteria ácido láctica, con propiedades biopreservadoras, ya que algunas cepas son capaces de producir nisina, una bacteriocina ampliamente usada en la industria alimentaria y generalmente reconocida como segura (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO) en 1969. Numerosos estudios han sido publicados reportando la eficacia de la nisina para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, entre ellas *Listeria monocytogenes* y *Clostridium spp.*; sin embargo, son escasos los que demuestran la efectividad sobre *Staphylococcus aureus*.

Según **Sangronis Elba, García Jesús (2007)**, El uso de la nisina, una bacteriocina natural, es una alternativa para disminuir los riesgos de la elaboración de queso con leche cruda, aumentar la vida útil del producto y en consecuencia mejora su comercialización. En este estudio se evaluó el efecto de dos concentraciones de nisina en las características físicas, químicas y en la calidad sensorial del queso “telita” elaborado con 3 partidas de leche fresca de diferente procedencia. El queso “telita” sin la adición de nisina se usó como control.

Los resultados indican que la adición de nisina en las concentraciones ensayadas no afectó la composición química y la calidad sensorial del queso “telita”. Es necesario buscar alternativas que disminuyan la presencia de microorganismos patógenos y la flora responsable del deterioro del queso fresco. Una de esas alternativas es el uso de las bacteriocinas, entre ellas la nisina, cuyo uso en alimentos es permitido en más de 50 países en el mundo y recientemente fue aprobado en Venezuela para los quesos madurados.

Una vez realizado el diagnóstico de la problemática se propusieron soluciones prácticas dirigidas a mejorar la productividad de una quesera piloto y la calidad del producto final. Entre las sugerencias propuestas están, entre otras, la automatización y adaptación de la cuba de coagulación mixta para un mejor control de la temperatura en la leche para la formación de la cuajada y disminuir el tiempo de calentamiento de la leche y la adición de nisina para prolongar la vida útil del queso.

Por esta razón, el objetivo de este estudio fue determinar los efectos de la adición de nisina en las características físicas, químicas y sensoriales del queso telita de Upata, del Estado Bolívar. La nisina inhibe las bacterias Gram positivas, incluyendo las patógenas, es atóxica, estable, se inactiva por las enzimas del tracto digestivo del humano.

Según **Cava R. y Colaboradores (2006)**, la adición de nisina en queso "telita" disminuye la supervivencia de *S. aureus* por lo cual podría ser utilizado como un agente antimicrobiano de origen natural que mejoraría la calidad microbiológica del queso blanco fresco elaborado siguiendo las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM).

El efecto observado es dependiente de la concentración de la nisina agregada y de la carga microbiana inicial del producto. El uso de la nisina no puede sustituir las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) necesarias para la elaboración de un queso fresco artesanal.

Según **Castro M y Colaboradores (2004)**, Las bacteriocinas, proteínas biológicamente activas producidas por bacterias lácticas que exhiben propiedades antimicrobianas, han despertado un gran interés como alternativa para la preservación de alimentos. La nisina es la bacteriocina mejor caracterizada y es utilizada en productos lácteos, cárnicos y vegetales, como parte de un sistema de barreras múltiples. Su inclusión en un sistema alimenticio como los aderezos debe considerar los efectos de posibles interacciones antagonistas entre los diferentes aditivos.

Según **Márquez José y García Carmen (2007)**, Se evaluó el efecto inhibitorio de dos concentraciones de nisina sobre la población de *Staphylococcus aureus*, coliformes totales, *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* en queso blanco tipo "telita" elaborado en una quesera de Upata, Estado Bolívar. El número de *S. aureus*, coliformes totales y *Escherichia coli* se determinó mediante la siembra en películas secas rehidratables Petrifilm 3M; siendo los recuentos de *S. aureus* significativamente menores ($p < 0,05$) en las muestras de queso "telita" con las dos concentraciones de nisina ensayadas con respecto a las muestras control. No se detectó *Salmonella spp* ni *Listeria monocytogenes* en ninguna de las muestras analizadas. Se encontró que las dos concentraciones de nisina adicionadas al queso "telita" ejercieron un efecto inhibitorio sobre la población de *S. aureus* presente como microflora contaminante en las mismas.

Considerando las características del queso "telita", el alto contenido de grasa, la humedad, el bajo pH, empleo del calor durante el hilado de la pasta y posibles pérdidas de la nisina en el caldero (hilado) y los sucesivos cortes de la pasta sobre el mesón de trabajo, se decidió que una de las concentraciones fuera de 16.7 mg/Kg de queso, equivalentes a 100 mg/6 Kg (peso promedio de la cuajada mas otros ingredientes) para cada lote. La otra concentración ensayada fue de 10,0 mg/ Kg de queso, equivalente a 60 mg/6 Kg, inferior al límite señalado.

Los resultados encontrados en este estudio confirman el efecto inhibitorio de la nisina sobre el crecimiento del *S.aureus* en queso blanco tipo "telita"; ambas concentraciones de nisina utilizadas mostraron un efecto bacteriostático sobre el *S. aureus* a las 2 semanas de almacenamiento a 8 ± 2 °C, concluyendo que este efecto fue dependiente de la concentración de nisina adicionada al producto y de la población inicial de *S. aureus* presente en el queso "telita". La reducción en los niveles de *S. aureus* en las muestras de queso telita con 10,0 y 16,7 mg nisina/kg.

2.2 Fundamentación filosófica

El presente proyecto de investigación se basa en el paradigma Naturalista el mismo que según **Musgrave Alan y colaboradores (1975)** menciona que el paradigma positivista o naturalista, se caracteriza por el alto interés por la verificación del conocimiento a través de predicciones. Algunos lo llaman el paradigma "prediccionista", ya que lo importante es plantearse una serie de hipótesis como predecir que algo va a suceder y luego verificarlo o comprobarlo. En las ciencias exactas y naturales es en donde tiene mayor aplicación. En ciencias sociales esto no es tan sencillo.

El positivismo acepta como único conocimiento válido al conocimiento verificable y mensurable, visible. El positivismo no acepta la pertinencia de otras perspectivas, de otros procedimientos metodológicos y otros tipos de conocimientos de interpretación de la realidad; lo que importa para el positivista es la cuantificación y medir una serie de repeticiones que llegan a constituirse en tendencias, a plantear nuevas hipótesis y a construir teorías, todo fundamentado en el conocimiento cuantitativo. Los aspectos cuantitativos están sólidamente mezclados con aspectos cualitativos. Desde que se concibió la estadística como una manera de cuantificarlo todo a través de muestras, se encontró la metodología más idónea y coherente es el paradigma positivista, para poder explicar, controlar y predecir.

2.3 Descripción del proceso de la Elaboración de Queso fresco con la Adición de Nisina

Según referencia de Tecnología de Lácteos **Gutiérrez, Julio (2008)** describe el proceso de elaboración de queso fresco de la siguiente manera:

Recepción

Es un conjunto de operaciones mediante las cuales se receipta la leche, comprobando los requisitos generales que se especifican en la norma INEN 9, los mismos que son:

acidez, densidad, materia grasa, prueba de alcohol, conocidas como pruebas de andén o plataforma.

Filtración

La filtración o depuración se efectúa por las mismas razones que para la producción de leche fluida es un método físico mediante el cual se eliminan las impurezas macro que pueden haber tenido acceso a la leche en forma involuntaria, pudiendo hacerse a través de filtros fibrosos, tamiz, mallas, paño, etc.

Pasteurización

El objeto principal de la pasteurización de la leche es destruir las bacterias patógenas y también las bacterias que reducen la conservación de la leche y el queso.

Se recomienda utilizar la pasteurización lenta tipo abierta esto es 63-65°C por 30 minutos no se aconseja un tratamiento térmico muy fuerte, pues causa una disminución de la aptitud de la leche para coagular con el cuajo, ello significa mayor tiempo de coagulación o coagulo más suave, un desuerado lento y pérdida de materia seca en el suero por un coagulo débil.

Enfriamiento

Luego de la pasteurización la leche debe ser enfriada a 38 – 40°C que es la temperatura a la que actúa el cuajo, para posterior llevar la leche a la tina de quesera.

Llegada a la tina

La leche debe introducirse en la tina con cuidado para evitar una mezcla de aire y una formación de espuma. La espuma puede causar una formación de ojos irregulares en el queso y con ellos es más difícil conocer cual es el momento correcto para cortar el coagulo. Por eso es mejor vaciar la leche contra las paredes de la tina o al fondo para que no absorba aire.

Adición de Cloruro de Calcio

El cloruro de calcio es un compuesto químico que se agrega a la leche para mejorar y estabilizar la capacidad de la leche para formar un coágulo con el cuajo.

La cantidad a agregar depende de la leche y sus condiciones. La cantidad natural que existe en la leche varía mucho, dependiendo de follaje, época del año, período de lactancia, etc. La cantidad máxima que se debe usar es 0.2gr por litro de leche para queso.

Demasiado calcio produce un coágulo demasiado firme y un queso muy elástico, dando un sabor a producto químico, poca cantidad de calcio, el coágulo sale muy suave y el queso muy quebradizo, es necesario agregarlo al menos 15 minutos antes de agregar el cuajo.

Cuajo

Es una sustancia que tiene la propiedad de coagular la caseína de la leche. El cuajo enzimático es el más utilizado, en el CAL se emplea en forma de polvo. La cantidad por cada 100 litros depende de las casas comerciales, en este caso se utiliza 2gr/100lt de leche utilizados, mismo que se debe disolver a unas 40 – 50 veces su volumen en agua. La disolución del cuajo asegura una buena distribución de este en la tina y la sal facilita su disolución. Una vez añadida a la leche agitar y remover durante 2 – 5 minutos.

Coagulación

A la coagulación o solidificación de la leche se llama cuajada y tiene una apariencia de gelatina blanca y se forma una vez adicionada la cantidad exacta de calcio, cuajo y a la temperatura adecuada.

Corte

Se puede cortar la cuajada cuando tiene la firmeza adecuada, que generalmente se obtiene de 30-40 minutos luego de haber añadido el cuajo, una cuajada normal es

elástica, suave, homogénea, y puede ser cortada por un cuchillo o lira fácilmente. Si el corte se realiza en una cuajada demasiado blanda se pierde grandes cantidades de materia seca en el suero lo que económicamente es malo, si la cuajada es demasiado firme es difícil de cortar y el tamaño de los granos es muy desigual, lo cual significa que es difícil controlar su proceso respecto a la separación del suero, acidificación, y estructura del queso final. Para el caso de fresco se debe realizar la división o corte de la cuajada en cubos por medio de una lira que tiene una distancia de 1.5 a 2 cm.

Primera Agitación

Recién después del corte los granos del queso son blandos y débiles por lo que la agitación debe ser muy suave y cuidadosa para romper los granos y perder sustancias secas en el suero.

Para la elaboración de queso fresco se deja reposar la masa por unos 5 minutos antes de empezar la agitación. Este reposo permite a los granos tener una estructura mas firme. Por otro lado es muy importante en esta etapa romper todos los aglomerados de granos que se formaron después del corte.

Durante la primera agitación ocurre la primera separación del suero que es muy rápida y los granos se vuelven mas y mas firmes, por lo tanto se puede intensificar la agitación. La primera agitación dura entre 15 y 25 minutos hasta que los granos estén mas firmes y no tengan la tendencia de aglomerarse.

Desuerado

El objetivo del desuerado es dejar lugar para el agua del calentamiento y aminorar el consumo de calor. Además el desuerado posibilita una agitación mas fuerte con lo cual es mas fácil evitar la formación de aglomerado durante el calentamiento. Generalmente se desuera entre el 30 – 35 % del total en litros.

Calentamiento y Lavado de la Cuajada

El objetivo del calentamiento es aumentar la sinéresis y acelerar de esta manera la salida del suero. El calentamiento afecta directamente la capacidad física de la

cuajada para retener humedad ya que las proteínas absorben menor cantidad de agua a altas temperaturas. Además de la separación del suero y con este de más lactosa las bacterias se desarrollan mas lentamente, ocasionando tambien una acidificación mas lenta. La temperatura que se usan son diferentes dependiendo del tipo de queso, para el queso fresco la temperatura del agua debe estar entre 40 y 45°C

El agua se debe adicionar lenta y constantemente por las paredes de la tina, esta debe ser de buena calidad y estar libre de películas extraña, la cantidad que se añade es aproximadamente equivalente a la cantidad del suero que se retiró en el desuerado anterior.

Adición de Sal al suero

Se usa sal en casi todos los tipos de queso en una cantidad mas o menos apreciable (hasta 600gramos por 100 litros de leche) la misma que entra junto con el agua de lavado. La sal influye: en el sabor, el cuerpo, los microorganismos, las enzimas.

Segunda agitación

Se realiza con mayor intensidad que la primera con un tiempo que varía de 5 - 10 minutos. Algunas investigaciones indican que una variación en el tiempo de agitación no influye mucho en los valores de humedad y pH en el queso final sino que los resultados organolépticos concluyen que los quesos con mayor tiempo de agitación tienen mejor cuerpo de los quesos semi-duros.

Separación de la cuajada y el Suero

Este desuerado equivale a un 70% del suero total, posterior a este procedimiento se incluirá la nisina

Adición de nisina

Para este estudio se hace referencia a la hoja técnica del bioconservante, con cuatro cantidades de nisina para verificar el mejor tratamiento, la dosis descrita es de 0.1 – 0.6 gr/Kg de queso, en el presente estudio no se utilizará los valores extremos sino a partir de 0.2gr, 0.3gr, 0.4gr y 0.5gr de nisina /Kg de queso.

Moldeado

El moldeado del queso tiene como finalidad dar al queso determinado formato y tamaño de acuerdo a sus características y de cierto modo de acuerdo a la tradición y exigencias del mercado. La forma de los quesos pueden ser esféricas, cilíndricas, etc.

Prensado

Para la mayor parte de los quesos el proceso moldeado se termina con un prensado y el objetivo es dar forma característica del queso correspondiente. Además es parte importante en el proceso de formación de cascara unión de los granos y eliminación del suero suelto, el prensado se lo realizará por medio de volteos de los moldes con lo que por la gravedad hará presión por si mismo.

Salado

El objetivo del salado consiste en dar al queso un sabor característico, regular el desarrollo de los microorganismos y la función de las enzimas, el salado de los quesos terminados se puede efectuar mediante una salmuera.

Para la elaboración de salmuera se disuelve 27 – 28 Kg de sal por cada 100litros de agua a fin de lograr una concentración de 21 – 23% correspondiente a 19 – 21 °Be (grados Baumé).

Envasado

Antes de que se venda los quesos hay que limpiarlos bien y envasarlos para que se presenten bien a los consumidores.

Objetivo del envasado: dar al queso una apariencia limpia y agradable, bajar la evaporación de agua, proteger el queso contra el ataque de microorganismos y perturbaciones mecánicas. El envasado se lo realiza en fundas plásticas.

Ventas

Las ventas se realizan en tiendas y directamente al consumidor final, para lo cual el queso debe guardarse en frigoríficos a temperaturas de 7 a 10°C.

Diagrama de Flujo del Proceso de Elaboración de Queso fresco (Anexo 2)

2.4 Fundamentación legal

Según Normas INEN AL 03.01-420 (1528 1987-07/Queso Fresco)

Terminología

Queso. Es el producto lácteo fresco o maduro que se obtiene por separación del suero de la leche entera, parcial o totalmente descremada, coagulada por acción del cuajo u otros coagulantes apropiados.

Queso Fresco. Es un queso que está listo para el consumo después de la fabricación y no será sometido a ningún cambio físico o químico adicional.

Requisitos del Producto

Requisitos Generales

Forma. El queso fresco común presentará bordes regulares y caras lisas, mientras que el queso fresco extra húmedo tendrá la forma determinada por su envase. Ambas deberán cumplir con las regulaciones INEN vigentes sobre Pesas y Medidas

Apariencia. El queso fresco debe presentar textura suave, no esponjosa y su color puede variar del blanco al crema. Debe estar libre de colorantes. Su color y sabor deben ser los característicos del tipo de queso.

Requisitos de fabricación

Materia Prima: El queso fresco debe fabricarse con leche cruda sometida al proceso de pasteurización, proveniente de animales sanos.

Proceso. El queso fresco deberá elaborarse en condiciones higiénicas- sanitarias adecuadas y con buenas prácticas de fabricación que permitan reducir al mínimo la contaminación microbiana perjudicial.

Aditivos e Ingredientes

En la elaboración del queso fresco común pueden emplearse los siguientes aditivos e ingredientes:

- a) Fermento láctico
- b) Cuajo u otras enzimas adecuadas
- c) Cloruro de sodio
- d) Cloruro de calcio, con un máximo de 0.2g/litro de leche empleada
- e) Sustancia aromatizante naturales no derivadas de la leche, tales como especias, en cantidades tecnológicamente adecuadas.

Complementarios

Almacenamiento.- Los quesos frescos se mantendrán en fábrica hasta su expendio a una temperatura inferior a 10°C

Especificaciones

El queso fresco de acuerdo a su clasificación, analizado según las normas técnicas correspondientes deberá cumplir con los requisitos establecidos en la Tabla 1.

Tabla N° 1.- Requisitos del queso fresco

Requisitos	Tipo de queso	Unidad	Humedad		Métodos de Ensayo
			Min	Max	
Humedad	Queso Fresco Común	%	-	65	INEN 63
	Queso Fresco Extrahumedo	%	>65	80	INEN 63
Grasa en el extracto seco	Ricos en grasa	%	>60	-	INEN 64
	Grasos	%	>45	60	INEN 64
	Semigrasos	%	>25	45	INEN 64
	Pobres en Grasa	%	>10	25	INEN 64
	Desnatados	%	-	10	INEN 64

Fuente: Norma INEN 1528/1987

El queso fresco ensayado con las Normas Ecuatorianas correspondiente, deberá cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos en la Tabla 2

Tabla N° 2.- Requisitos microbiológicos del queso fresco

Requisitos	Unidad	Máximo	Métodos de Ensayo
Escherichia Coli	Colonias/g	100	INEN 1529
Staphilococcus Aureus	Colonias/g	100	INEN 1529
Mohos y Levaduras	Colonias/g	50000	INEN 1529
Salmonella	Colonias/25g	0	INEN 1519

Fuente: Norma INEN 1528/1987

Podrán ser aceptados los lotes (o partidas) de queso fresco que cumplan con los requisitos del programa de atributos constantes en la tabla N° 3.

Tabla N° 3 Requisitos microbiológicos del queso fresco (lotes o partidas)

Requisitos	Clase	n	c	m	M	Métodos de Ensayo
Escherichia Coli	3	5	2	100/g	500/g	INEN 1529
Staphilococcus Aureus	3	5	2	100/g	1000/g	INEN 1529
Salmonella	3	5	0	0/25g		INEN 1529

Fuente: Norma INEN 1528/1987

Según **Normas INEN 66. Aditivos**. En lo que respecta a disposiciones generales :

En los quesos sin madurar se permitirá el uso de los siguientes aditivos:

- a.- Fermentos lácticos seleccionados o cultivos inoos de bacterias productoras de ácido láctico
- b.- Cuajo y/o enzimas coagulantes de la leche, que sean de comprobada inocuidad para la salud del consumidor
- c.- Cloruro de sodio
- d.- Cloruro de calcio, en dosis máxima de 0.02% (m/m) de la leche empleada

e.- Caseinato de sodio, de calcio, de potasio o de amonio en dosis máxima total de 0.5% (m/m) del producto terminado podrán usarse una o mas de las siguientes gomas vegetales y sustancias fijadoras del agua:

- goma de garrofín
- goma de guar
- goma karaya
- goma tragacanto
- carragenina o sus sales
- gelatina
- lecitina
- alginatos de propilenglicol
- agar-agar
- pectina

Al encontrarse muy relacionados los parámetros definidos por el Instituto Boliviano de Normalización y Calidad (IBNORCA) con la norma INEN y al carecer esta última de información para coliformes totales se ha tomado en cuenta IBNORCA para utilizar como referencia, a continuación:

Tabla N ° 4.- Requisitos Microbiológicos

Microorganismos	n	C	m	M	Método de Ensayo
Coliformes Totales ufc/g	5	2	1×10^3	5×10^3	NB 32005
Coliformes Fecales ufc/g	5	2	1×10^2	1×10^2	NB 32005
Staphylococcus aureus ufc/g	5	1	10	-	NB 32004
Salmonella en 25g	5	0	Ausencia	-	NB 659
Listeria monocytógenes en 25g	5	0	Ausencia	-	-

Fuente: IBNORCA 33008- 2003

Donde:

n: número de muestras del lote

c: Número de muestras defectuosas

m: límite mínimo

M: límite máximo

Según el Agrocentro Lechero distribuidor de Nisina:

Tabla N° 5.-Dosificación de la nisina

Aplicación	Dosis
Quesos	100-600 mg/Kg
Leche y derivados de la leche	50-150mg/Kg
Queso ricota	100-200mg/Kg
Vegetales en conserva	100-200mg/Kg
Aliños y salsa	100-200mg/Kg

Fuente: Ficha Técnica Agrocentro Lechero

2.4.1 Marco Conceptual Variable independiente

Desconocimiento de la aplicación de nisina

Según la ficha técnica de Centro Agro Lechero

Nisina

Descripción

La nisina es una clase de polipéptido, es un preservante de alimento natural. La nisina se utiliza extensamente en los alimentos transformados por el calor y bajo pH, particularmente en alimentos conservados, los productos lácteos, los alimentos de la proteína de planta, carne curada.

Formula molecular: $C_{143}H_{228}N_{42}O_{37}S_7$

Masa molecular UMA Unidad de Masa Atómica, Dalton: 3348 g/mol

Características

La nisina es una proteína con acción antibiótica producida por un microorganismo inofensivo presente en la leche fresca de forma natural y que interviene en la fabricación de diferentes productos lácteos. Existe como un conservante natural en algunos quesos y otros productos lácteos fermentados, producidos por su flora de maduración.

1.- La nisina posee actividad antimicrobiana contra una amplia gama de las bacterias gran positivas, particularmente las que produzcan las esporas.

2.- La nisina es un polvo de color blanco, potencia acuosa 1000IU/mg. La acidez es estable a temperatura ambiente e incluso al calentarse. Puede resistir 30 minutos en pH 2.0 a 121°C y 15 minutos en pH 3.0 a 121°C, pero en pH mayores la estabilidad de actividad puede ser afectada.

Método de producción

La nisina es producida por el crecimiento controlado del *lactococcus lactis*, una bacteria que es natural de la leche.

Almacenaje

Almacenarse en un lugar, seco, en envase sellado a temperaturas entre 4-15 °C.

Usos

Solo es eficaz contra algunos tipos de bacterias como conservante de ciertos tipos de quesos procesados, especialmente los fundidos. Se utiliza como conservante de la leche y otros derivados lácteos ante los problemas para mantener estos productos siempre en refrigeración.

Según la ficha técnica de Proquiga S.A.

Modo de empleo y dosificación.- La nisina es un efectivo conservante natural de alimentos. Puede ser usado en productos a través de un amplio margen de niveles de pH (3.5 – 8.0). Como inhibidor de bacterias formadoras de esporas (especialmente *Clostridium sporogenes*) en determinados productos lácteos y otros productos alimenticios.

Características Físico – Químicas

pH de 10% de solución acuosa	3.10 – 3.60
Humedad	< 3%
Metales pesado (Pb)	< 2mg kg ⁻¹
Arsénico (As)	> 1mg kg ⁻¹
Potencia Hidratante	>1000IU g ⁻¹

Especificaciones Microbiológicas.- Recuento Total < 10ufc g⁻¹

Conservación –Caducidad.- Mantener el envase cerrado. Conservar en un lugar fresco (4°C – 15°C), seco y oscuro en estas condiciones el producto se mantiene inalterable hasta dos años a partir de la fecha de envasado.

Según **Christian Harb V. y Colaboradores (2008)**, se evaluó la producción de nisina mediante ensayos fermentativos, con el microorganismo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, empleando suero de quesería y *Lactobacillus* sp como microorganismo nisina-sensible o indicador. Se realizó la caracterización de suero de quesería pasteurizado y desmineralizado, para diseñar un medio de cultivo óptimo para la producción de nisina, encontrando para el suero pasteurizado unas concentraciones de: lactosa 0.162 g/L, proteínas 0.02 g/L, cenizas 24.7 g/L y concentración de calcio y de hierro 0.09 g/L y 0.00054 g/L respectivamente.

Para el suero desmineralizado unas concentraciones de lactosa 0.192 g/L, proteínas 0.017 g/L, cenizas 62.55 g/L y concentración de calcio y de hierro 0.017 g/L y 0 g/L

respectivamente. Se diseñó un medio de cultivo óptimo para la producción de nisina empleando un diseño de experimentos de superficie de respuesta donde se evaluó la influencia de la adición de caseína y el pH inicial del medio sobre la producción de nisina, biomasa y sobre el consumo de azúcares reductores.

La nisina es un poli péptido que actúa como antibiótico, es un conservante natural que evita e inhibe la proliferación de microorganismos como bacterias, mohos y levaduras, empleándose como una alternativa para sustituir parcial o totalmente a los aditivos sintéticos, no presenta limitaciones en su consumo ni se considera perjudicial para la salud ya que es una proteína y es tratada por el cuerpo como tal y digerida en el intestino delgado. La ingesta máxima diaria de nisina es de 33000 unidades/ Kg de peso corporal, además aumenta las propiedades organolépticas del alimento como el sabor y la textura, específicamente en los casos en que existen inconvenientes para mantener algunos productos en refrigeración, como la leche y otros derivados lácteos.

Según **Martínez F. Beatriz (1996)**, Las primeras observaciones de antibiosis microbiana realizadas por Pasteur y Joubert (1877) permitieron vislumbrar la posibilidades terapéuticas de los fenómenos de antagonismo. Posteriormente, Rogers (1928) identificó una sustancia de naturaleza peptídica (nisina), producida por *S. lactis*, que inhibía a microorganismos Gram positivos, incluyendo patógenos y alterantes de alimentos. Debido a que la cepa productora era utilizada como cultivo iniciador en la producción de derivados lácteos se plantearon nuevas aplicaciones, no sólo con fines terapéuticos, del antagonismo microbiano.

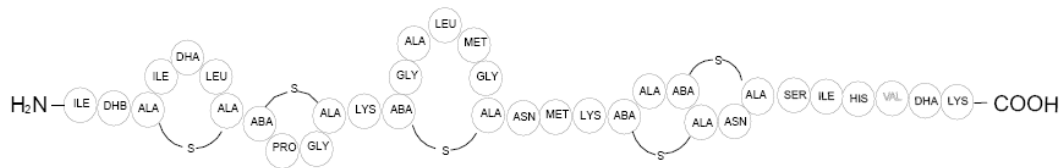
De hecho, la fermentación (proceso de transformación biológica de alimentos) es una de las técnicas más antiguas utilizadas para aumentar el período de consumo de alimentos perecederos. De las muchas especies microbianas que se encuentran inicialmente en el alimento crudo o materia prima, solamente unas pocas están dotadas de las capacidades fisiológicas necesarias para multiplicarse masivamente en las condiciones concretas que ofrecen el alimento y el medio ambiente que se genera.

Así pues, las bacterias lácticas llegan a proliferar en la mayoría de estos hábitats, constituyendo un claro ejemplo de antagonismo microbiano.

Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica y activas, generalmente, frente a microorganismos relacionados taxonómicamente con la especie productora. Se describieron por primera vez en *Escherichia coli* (1925) y, posteriormente, en bacterias Gram positivas (1976).

La nisina, producida por *L. lactis*, fue el primer lantibiótico conocido (1971) y pertenece al tipo A. Dentro de este grupo se han descrito otros como la nisina Z, variante natural de la nisina A con una sustitución.

Grafico 2: Estructura primaria de la nisina Z, lantibiótico producido por *L. lactis* (Mulders et al., 1991). DHB: dehidrobutirina; DHA: dehidroalanina; ALA-S-ALA: lantionina; ABA-S-ALA: β-metil lantionina.



Fuente: Bacteriocinas de *Lactococcus lactis* aislados de quesos: nisina y lactocina

En principio, su naturaleza peptídica permite la degradación por los enzimas digestivos, resultando así presuntivamente inocuas para el consumidor y su microflora intestinal de ocupación y, en algunos casos, su espectro de acción incluye a los potenciales patógenos y alterantes asociados a los alimentos.

La posibilidad de utilizar cepas productoras de nisina para conservar los alimentos fue sugerida por Hirsch (1951). Estos autores consiguieron evitar la hinchazón tardía de los quesos (debida a la producción de gas por *Clostridium* spp.) e inhibir el crecimiento de *S. aureus*. La nisina también se utiliza para disminuir la intensidad del tratamiento térmico de los alimentos enlatados para controlar la fermentación

maloláctica en vinos y para evitar el crecimiento de bacterias lácticas durante la fabricación de la cerveza.

Según **Castro Gustavo y Colaboradores (2009)** La nisina es una bacteriocina capaz de frenar el crecimiento de microorganismos Gram positivos, entre ellos *Staphylococcus aureus*.

Sangronis Elba y García Jesús (2007) Mencionan que el uso de la nisina, una bacteriocina natural, es una alternativa para disminuir los riesgos de la elaboración de queso con leche cruda, aumentarle la vida útil del producto y en consecuencia mejorar su comercialización.

Cava Rita y colaboradores (2009) La adición de nisina al queso "telita" disminuye la supervivencia de *S. aureus* por lo cual podría ser utilizado como un agente antimicrobiano de origen natural que mejoraría la calidad microbiológica del queso blanco fresco elaborado. El efecto observado es dependiente de la concentración de la nisina agregada y de la carga microbiana inicial del producto. El uso de la nisina no puede sustituir las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) necesarias para la elaboración de un queso fresco artesanal.

Hernaez Laura y Colaboradores (2007) La nisina es una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* y puede permeabilizar la membrana de los microorganismos mediante mecanismos específicos o no específicos. Es efectiva en la inactivación de un amplio rango de bacterias gram positivas. Varios autores han demostrado su efectividad en productos lácteos, como quesos untables, ricota, leche y suero líquido frente a la contaminación de *Clostridium spp* y *Listeria spp*

2.4.2 Marco Conceptual Variable dependiente

Reducido tiempo de vida útil

Zavala P. José (2005) En la década del 60 modifica la anterior idea al enunciar el genial principio de conservación de alimentos: "*Todos los procesos de deterioro son*

una función de la humedad relativa o de los tipos de agua que se encuentran en el alimento". Así: no es ya la cantidad de agua la que determina el deterioro, si no la calidad en que se encuentra el agua en relación con los alimentos.

En la práctica cada alimento tiene un comportamiento diferente frente a las moléculas de agua en relación a las fuerzas físicas y químicas que los ligan, para cada temperatura. La comprensión de los mecanismos de deterioro de los alimentos nos ha permitido perfeccionar la tecnología de los alimentos en especial de los alimentos conservados por refrigeración, concentración, deshidratación o mediante la adición de solutos (azúcares y cloruro de sodio).

Rondón E. y Colaboradores (2004) La vida útil de un alimento se puede definir como el período de tiempo durante el cual el producto almacenado no se percibe significativamente distinto al producto inicial o recién elaborado. Para la evaluación de los productos se utilizan técnicas de evaluación sensorial, análisis físicos; químicos y microbiológicos.

Cabeza Enrique A. (2009) La vida útil o caducidad de un alimento puede definirse como *“el periodo de tiempo, después de la elaboración y/o envasado y bajo determinadas condiciones de almacenamiento, en el que el alimento sigue siendo seguro y apropiado para su consumo”* es decir, que durante ese tiempo debe conservar tanto sus características físico-químicas, microbiológicas y sensoriales, así como sus características nutricionales y funcionales.

Todos los alimentos poseen una caducidad microbiológica, una caducidad química y/o físico-química y una caducidad sensorial; la cual depende de las condiciones de formulación, procesamiento, empaque, almacenamiento y manipulación.

Los alimentos perecederos son aquellos de tipo o condición tales que pueden deteriorarse, entendiéndose aquellos como los alimentos compuestos total o parcialmente de leche, productos lácteos, huevos, carne, aves de corral, pescado o mariscos, o de ingredientes que permitan el crecimiento progresivo de

microorganismos que puedan ocasionar envenenamiento u otras enfermedades transmitidas por alimentos; así aquellos alimentos que son considerados como perecederos generalmente poseen una vida útil de 7 días, y esta vida útil está limitada en la mayoría de los casos por el decaimiento bioquímico o microbiológico, mientras que los alimentos semiperecederos (conservas en general) la vida útil está limitada principalmente al deterioro fisicoquímico y/o sensorial antes que el microbiológico.

El hecho que los alimentos son sistemas diversos, complejos y activos en que las reacciones microbiológicas, enzimáticas y físico-químicas están interactuando de forma simultánea, hace una tarea ardua el estudio de su vida útil. La preservación de los alimentos es dependiente de la combinación de múltiples factores y un sin fin de reacciones bio-físicoquímicas.

Esencialmente, la vida útil de un alimento depende de cuatro factores principales a saber: la formulación, procesado, empaque y condiciones del almacenamiento. Sin embargo, si las condiciones posteriores de manipulación no son las correctas, entonces la vida útil de los mismos puede limitarse a un periodo menor que del cual haya sido establecido.

Todos los cuatro factores son críticos pero su importancia relativa depende de cuan perecedero es el alimento. Generalmente, un alimento perecedero (almacenado en condiciones apropiadas) tiene una vida útil media de 14 días siendo limitado en la mayoría de los casos por el decaimiento bioquímico (enzimático/senescencia) o el decaimiento microbiano. Con las nuevas tecnologías de empaque en atmósfera modificada/controlada en condiciones asépticas, algunos alimentos pueden durar hasta 90 días (3 meses). Un alimento semi-perecedero tiene una vida útil media de alrededor de 6 meses, como ciertos quesos, mientras que los alimentos no perecederos tienen una vida útil superior a 6 meses y con una duración de hasta 3 años cuando son mantenidas bajo condiciones apropiadas de almacenamiento (p.ej., la mayoría de las conservas).

Para la determinación de la vida útil de un alimento deberán considerarse las variables microbiológicas, físico-químicas y sensoriales que mayor influencia tendrán sobre la calidad del producto.

En torno a la evaluación microbiológica se ha planteado toda una discusión sobre qué grupo de microorganismos deberían considerarse para la determinación de la vida útil, por un lado encontramos el empleo de los recuentos viables totales (aerobios o anaerobios mesófilos, psicrótrofos o psicrófilos) ya que este grupo se considera en microbiología de alimentos como un indicador del nivel de contaminación de un producto, sin embargo surge el planteamiento de la diversidad de especies que podrían en un momento puntual integrar este grupo y de cómo podrían cambiar de lote a lote, de un periodo de tiempo a otro, o dentro de un mismo proceso.

Entonces, ¿es seguro emplear este grupo como indicador de vida útil?. Si se emplea este recuento podríamos establecer que el valor máximo permitido oscilaría en torno a 10^6 ufc/ g o mL, es decir, que la vida útil microbiológica caducaría en cuanto se alcance este nivel de crecimiento en el producto final.

Resulta más conveniente establecer la vida útil microbiológica de un alimento cuantificando el crecimiento de microorganismos alterantes, y dentro de este grupo establecer cuál de las especies es la que mayor incidencia va a tener sobre la calidad final del producto. Por ejemplo, volvemos al caso del yogurt, en este producto la vida útil podría evaluarse empleando el recuento de bacterias ácido-lácticas. De todas formas tampoco resultaría lógico emplear el recuento total de viables si sabemos que este producto ha sido preparado empleando un cultivo iniciador o estárter.

Estimación de la vida útil microbiológica: uso de herramientas predictivas.

Como ha sido comentado en muchas revisiones, la microbiología predictiva de alimentos se constituye hoy por hoy en una herramienta valiosa para el sector agroindustrial, ya que permite obtener resultados en menor tiempo minimizando el uso de materiales de laboratorio, mano de obra, y reduciendo por tanto costos económico. Sin embargo, la microbiología tradicional aún sirve de apoyo a la microbiología predictiva.

Los principales factores que influyen en la estabilidad microbiana en los alimentos son la temperatura, pH y actividad de agua. La temperatura en particular puede variar significativamente a través de la producción y distribución.

Según **Alvarado J y colab. (2005)** La determinación o el cálculo del tiempo de vida útil de alimentos, es decir el tiempo que el producto mantiene una buena condición para su comercialización y consumo, es un campo de gran importancia para la Ingeniería de Alimentos. Los datos son muy útiles para productores, comercializadores e industrias procesadoras; además en los últimos años las regulaciones legales que exigen se incluya en las etiquetas datos informativos para el consumidor, entre los cuales está la fecha de caducidad del producto.

La fecha de caducidad del producto; también conocida como "Fecha Abierta" es una fecha estampada en la envoltura de un producto para ayudar a la tienda a determinar por cuanto tiempo se puede ofrecer un producto a la venta. También puede ayudar al comprador a saber el margen de tiempo en que puede comprar un producto para que tenga la mejor calidad posible.

En muchos de los casos, el valor n es diferente de cero; puede ser un valor entero o fraccionado entre 0 y 2. En el caso de ser 1, corresponde a una ecuación de primer orden. Aplicando de esta manera el método propuesto por Alvarado (1996). Se aplica entonces la ecuación:

$$\ln C = \ln C_0 + kt$$

Donde:

C = parámetro escogido como límite de tiempo de vida útil

C₀ = concentración inicial

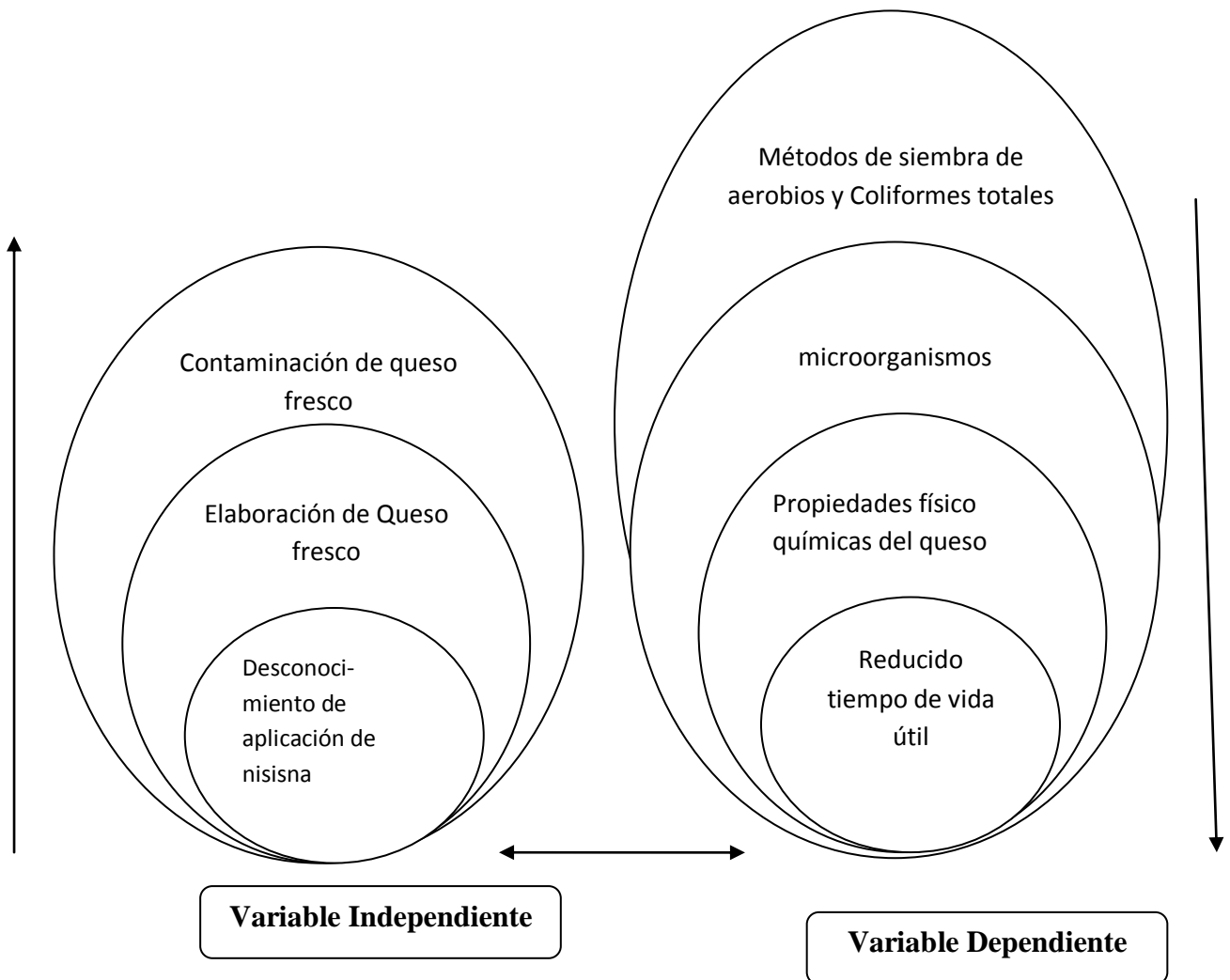
t = tiempo de reacción

k = constante de velocidad de reacción

2.43 Gráficos de inclusión interrelacionados

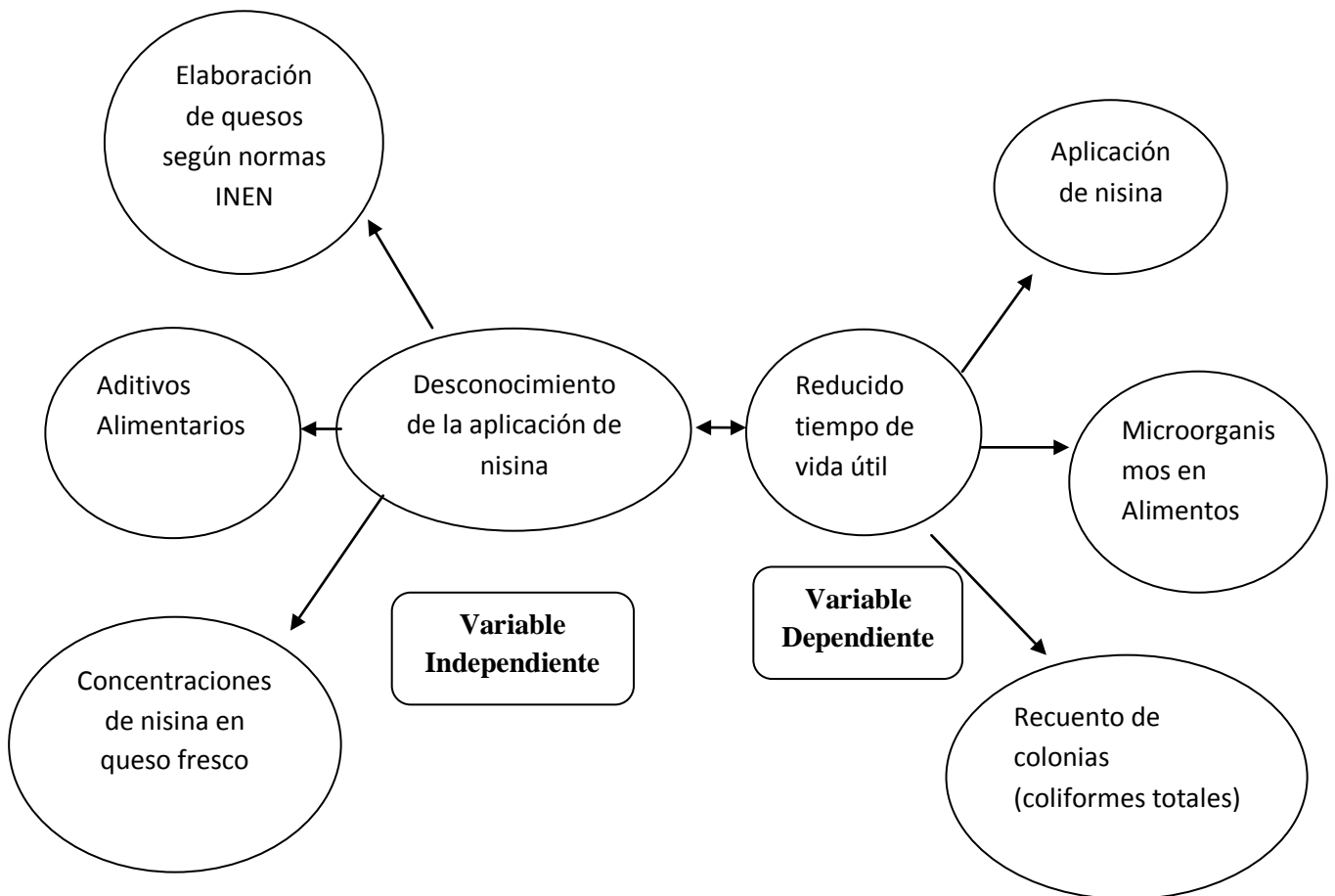
- Super Ordinación Conceptual

Gráfico N° 3.- Superodinación Conceptual



Elaborado por: Oscar H. López B., 2010

Gráfico N° 4.- Subordinación Conceptual



Elaborado por: Oscar H. López B., 2010

2.5 Hipotesis

El desconocimiento de la aplicación de nisina es lo que conlleva a un reducido tiempo de vida útil en queso fresco en el Centro de Adiestramiento Lechero (CAL)

2.6 Señalamiento de variables de la hipótesis

Variable independiente = desconocimiento de la Aplicación de nisina

Variable dependiente = reducido tiempo de vida útil

CAPITULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

Enfoque

El trabajo de investigación se sustenta en el paradigma crítico propositivo, de carácter cuanti-cualitativo.

Cuantitativo porque los resultados de la investigación de campo se procesan numéricamente con el apoyo de paquetes estadísticos que permiten identificar al mejor tratamiento. También se verifican las muestras por medio de características medibles.

Cualitativa porque para el análisis sensorial tomamos de referencia las cualidades de las muestras, además estos resultados son sometidos al análisis e interpretados con el apoyo del marco teórico.

3.1. Modalidad Básica de la Investigación

El presente proyecto de investigación tiene un enfoque cualitativo, pues, interactúa con los sujetos de la investigación y sugiere que las respuestas sean interpretadas con las autoridades y personas a cargo del Centro de Adiestramiento Lechero (CAL), el enfoque de la aplicación de nisina en queso fresco tiene una orientación al descubrimiento exploratorio, expansionista, descriptivo e inductivo, ya que se debe realizar un estudio completo.

3.1.1 De campo

Según **Nieves Cruz. Felipe (2006)** menciona que la metodología de campo se refiere a los diferentes tipos de lugares en los que se lleva a cabo la investigación, ya sea en la comunidad como en los diferentes sectores comerciales.

De acuerdo a lo anteriormente mencionado esta investigación se realizó en el Centro de Adiestramiento Lechero (CAL) en donde se elaboraron los quesos y en la Unidad Operativa de Investigación en Tecnología de Alimentos (UOITA) en la que se realizaron los respectivos análisis.

3.1.2 Bibliográfica –documental

Según **Baldomero Sommer (2009)** La investigación bibliográfica es aquella etapa de la investigación científica donde se explora qué se ha escrito en la comunidad científica sobre un determinado tema o problema.

El presente trabajo hace referencia a la investigación bibliográfica. Esta indagación permite apoyar la investigación que se desea realizar, evitar emprender investigaciones ya realizadas, tomar conocimiento de experimentos ya hechos para repetirlos cuando sea necesario, continuar investigaciones interrumpidas o incompletas, buscar información sugerente, seleccionar un marco teórico, etc.

3.1.3 Experimental

Según **El diccionario online (1998)** menciona que es un método para la recolección de datos en el cual se comparan las mediciones del comportamiento de un grupo de control, como mínimo, con las mediciones de un grupo experimental, como mínimo.

Este proyecto tiene una modalidad de investigación experimental porque requiere mediciones y parámetros que permiten obtener resultados y satisfacer los objetivos planteados para concluir favorablemente este proyecto.

3.2 Nivel o tipo de Investigación

3.2.1 Exploratorio

Según **Nieves Felipe (2006)** menciona que explorar significa incursionar en un territorio desconocido. Por lo tanto, se emprenderá una investigación exploratoria cuando no conocemos el tema por investigar, o cuando el conocimiento es tan vago e impreciso que impide sacar las más temporales conclusiones sobre aspectos que son relevantes.

Se puede tener una gran voluntad y entusiasmo para estudiar o investigar cualquier tema, pero si se desconoce el mismo se debe iniciar un estudio exploratorio para empezar a conocerlo y familiarizarse con él, para precisar mejor el problema que interesa resolver o para comenzar a dar forma a alguna hipótesis previa que sobre la cuestión tengamos.

Para explorar un tema relativamente desconocido disponemos de un amplio espectro de medios para recolectar datos en diferentes ciencias: bibliografía especializada, entrevistas y cuestionarios hacia personas, observación participante (y no participante) y seguimiento de casos. La investigación exploratoria terminará cuando, a partir de los datos recolectados, se adquiera suficiente conocimiento como para saber qué factores son relevantes al problema y cuáles no.

Hasta ese momento, esta en condiciones de encarar un análisis de los datos obtenidos de donde surgen las conclusiones y recomendaciones sobre la investigación. Este proyecto tiene un nivel exploratorio porque se explorará, la problemática existente en queso fresco y a la vez el desconocimiento de la aplicación de nisina.

3.3 Población y Muestra

3.3.1 Población

Este proyecto se realizó para beneficio del Centro de Adiestramiento Lechero, en el mismo que se elaboró quesos frescos.

3.3.2 Muestra

La muestra se encuentra relacionada con la población y se utilizó quesos elaborados en el Centro de Adiestramiento Lechero (CAL) aplicando nisina para verificar su efectividad.

3.4 Operacionalización de Variables

3.4.1 Operacionalización de la variable independiente

Desconocimiento de la Aplicación de nisina

Tabla N ° 6.- Operacionalización del Desconocimiento de la Aplicación de nisina

Conceptualización	Categorías	Indicadores	Ítems básicos	Técnicas e instrumentos de recolección de información
Deficiente información de la utilización de un bioconservante (nisina)	Desconocimiento total del uso de nisina	Porcentaje	¿Qué porcentaje del personal desconoce de la utilización de nisina?	Entrevista (Anexo 3)
	Desconocimiento de la concentración de nisina en queso fresco?	Porcentaje	¿Qué porcentaje del personal desconoce la concentración de nisina utilizada en queso fresco?	Entrevista (Anexo 3)

Elaborado por : Oscar H. López B., 2010

3.4. Operacionalización de la variable dependiente

Reducido tiempo de vida útil

Tabla N° 7.- Operacionalización del Reducido tiempo de vida útil

Conceptualización	Categorías	Indicadores	Ítems básicos	Técnicas e instrumentos de recolección de información
Deficiente Período de tiempo de conservación de alimentos (queso fresco)	Propiedades Físico químicas y sensoriales	pH Peso (gramos) A. sensorial: Olor, Color, Sabor, Textura, Aceptabilidad	¿Las propiedades físico químicas de queso fresco son pH, y peso las mismas que se encuentran en un rango establecido en Normas?	Aplicación de Norma INEN 03.01-403 Evaluación sensorial (Ver anexo 4)
	Vida útil con relación a Propiedades microbiológicas	Unidades Formadoras de colonia (ufc)	¿La vida útil de de alimentos podemos determinarla por medio de una relación de carga microbiana?	Alvarado J y colab. 2005

Elaborado por : Oscar H. López B., 2010

3.5 Recolección de Información

Metodológicamente para Luis Herrera E. y otros (2002), la construcción de la información se opera en dos fases: plan para la recolección de información y plan para el procesamiento de información.

3.5.1. Plan para la recolección de información

Este plan contempla estrategias metodológicas requeridas por los objetivos e hipótesis de investigación, de acuerdo con el enfoque escogido, considerando los siguientes elementos:

- Definición de los sujetos: personas u objetos que van a ser investigados.
Personal centro de Adiestramiento Lechero: son personas que bajo un conocimiento se encargan de la elaboración de productos lácteos y con la necesidad de mejorar tecnología para ofrecer calidad al consumidor.
Queso Fresco: es un producto comestible fácilmente perecible, con propiedades físico-químicas y microbiológicas establecidas, normadas y estandarizadas.
- Selección de las técnicas a emplear en el proceso de recolección de información, para recopilar información en el presente proyecto se utilizó una encuesta dirigida a los estudiantes de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos, y se realizó análisis físico-químicos y microbiológicos de quesos fresco según Norma INENAL03.01-403
- Instrumentos seleccionados o diseñados de acuerdo con la técnica escogida para la investigación.
- Selección de recursos de apoyo:
Asesor Tecnología de Lácteos: Ing. Julio Gutiérrez
Asesora Análisis microbiológicos: Ing. Mónica Silva
- Explicitación de procedimientos para la recolección de información, cómo se va a aplicar los instrumentos, condiciones de tiempo y espacio, etc.

Tabla N° 8.- Explicitación de procedimientos para recolección de información

TÉCNICAS	PROCEDIMIENTO
Encuesta	Se lo realizó personalmente entregando una hoja con formato de la encuesta
	En la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos
	A partir del 24 de Agosto en Adelante
Análisis de queso fresco	Se lo realizó Aplicando Norma INEN 63 y 64
	En Laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos
	A partir del 24 de Agosto en Adelante

Elaborado por : Oscar H. López B., 2010

3.6 Procesamiento y Análisis

3.6.1 Plan de procesamiento de información

- Revisión crítica de la información recogida; es decir limpieza de información defectuosa: contradictoria, incompleta, no pertinente, etc.
- Repetición de la recolección, en ciertos casos individuales, para corregir fallas de contestación.
- Tabulación o cuadros según variables de cada hipótesis: manejo de información, estudio estadístico de datos para presentación de resultados.

Una vez obtenidos los datos en tablas de control, se procedió a tabular la información útil en el paquete informático Excel, seguidamente se procesó mediante las herramientas del programa. Los resultados se expresan mediante tablas de datos y gráficas de dispersión.

Para comprobar la hipótesis de igualdad de efectos de los tratamientos experimentales se utilizó la tabla de análisis de varianza generada en los paquetes informáticos Excel y Statgraphics. En caso de significancia estadística, se determinó

el mejor tratamiento empenado la prueba de Tukey generada en el paquete informático Statgraphics.

El texto del informe se realizó en el paquete informático Microsoft Word.

3.6.2 Plan De Análisis

Todas las actividades concernientes a recolección de información fue realizado por el investigador.

Para la recolección de la información se utilizó las siguientes técnicas:

- Observación
- Las muestras son tomadas al finalizar el proceso de elaboración del queso fresco.

Las observaciones se realizaron en el lugar de los hechos durante la fase experimental en la cual se tomaron datos del proceso, las condiciones y parámetros con las que se elabora quesos en el Centro de Adiestramiento Lechero (CAL).

Para obtener la información de la influencia de la aplicación de nisina sobre la calidad microbiológica del queso fresco se empleó un Diseño Factorial axb , mismo que según **Saltos, Hector A.** (1993), Se requiere evaluar el efecto combinado o interactuante de dos variables o factores sobre una variable respuesta, se debe utilizar diseños factoriales tales que cada factor actúe con un cierto número de niveles. Entonces, si a es el número de niveles del factor a y b el número de niveles del factor b , en el experimento se requerirán axb tratamientos por replicación.

La ausencia de efectos significativos de los factores A y B , equivale a decir que el cambio de niveles de tales variables no incide significativamente sobre la variable respuesta.

La ausencia de efecto significativo de acción interactuante de los factores a y b quiere decir que el cambio de nivel en el factor a no incide en el comportamiento del factor b sobre la variable respuesta y viceversa.

El análisis de varianza correspondiente a estos diseños factoriales axb implica a la subdivisión de la suma de cuadrados de tratamiento, SCTr; en tres componentes a saber: suma de cuadrados factor A, SCA; suma de cuadrados del factor B, SCB; y suma de cuadrados de la interacción, SC(AB); es decir

$$SCTr = SCA + SCB + SC(AB)$$

La determinación de la tabla de análisis requiere considerar el conjunto de respuestas experimentales determinadas como una matriz o tabla de doble entrada, con las combinaciones de los tratamientos dispuestos en filas y las replicaciones dispuestas en columnas. De esta forma el cálculo parte determinado la suma de cuadrados total, de los tratamientos, de las replicaciones y del residuo como si se tratara de un diseño de bloques, donde los bloques vienen a ser sustituido por las replicaciones.

3.7.- Factores

A: leche a utilizar para la elaboración

ao: Leche Cruda

a1: Leche Pasteurizada

B: Cantidad de Nisina por Kg de Queso y en relación a litros leche utilizados

bo: Sin Tratamiento 0.0 g / 100 lts.

b1: 0.2 g/Kg de queso 3.1 g / 100 lts.

b2: 0.3 g/Kg de queso 4.7 g / 100 lts.

b3: 0.4 g/Kg de queso 6.2 g / 100 lts.

b4: 0.5 g/Kg de queso 7.7 g / 100 lts.

Lo que implica un total de 10 muestras. Se realizó una réplica. Obteniéndose un total de 20 muestras.

La respuesta experimental evalúa el efecto de la nisina mediante la utilización del método de análisis microbiológico (*Coliformes* y *aerobios totales*) con el fin de determinar el mejor tratamiento.

Se realizó una evaluación sensorial para comparar entre si las muestras y verificar la aceptabilidad de queso con adición de nisina.

3.8.- MATERIALES Y EQUIPOS

Los equipos necesarios para la investigación son:

- Balanza analítica Kern (Modelo: NLS50-3 – 0.001gr – 5gr)
- Balanza Torrey (Modelo: EQ -5/10 - 5x0.001Kg)
- Estufa Genny Industrial (YCO-010 - 180°C)
- Refrigerador (6 - 7°C)
- Termómetro Cooper (-10/150°C)
- Autoclave Vertical Trident (EA-632)
- Cámara de flujo laminar (T4 Flow 180H)
- Incubadora Memmert regulable de 25 °C a 60 °C
- Licuadora Oster
- Cocineta eléctrica

Los materiales necesarios para la investigación son:

- Jarras Masón
- Cuchillo
- Erlenmeyer (Pirex) 250 cm³, 500 cm³
- Pipetas volumétricas de 1 cm³ y 10 cm³
- Cajas petri de 90mm x 15mm
- Probetas de 100 cm³, 250 cm³
- Tubos de bacteriológicos (Pirex)

Los reactivos necesarios para la investigación son:

- Cloruro de Calcio (comercial)
- Cuajo en polvo
- Nisina en polvo (Agrocentro Lechero)

La materia prima necesaria para la investigación es:

- Leche Cruda y pasteurizada

3.9.- Metodología de cálculo de tiempos de vida útil

Finalmente se determinó el cálculo del tiempo de vida útil del mejor tratamiento, considerando el método propuesto por Alvarado (1996) para el caso de cinética de primer orden.

El cálculo de los tiempos de vida se lo efectuó mediante el contenido microbiano en las muestras obtenidas de los mejores tratamientos, se llevó a cabo teniendo en cuenta que se trata de una cinética de primer orden:

$$\ln C = \ln C_0 + kt$$

Donde:

C = parámetro escogido como límite de tiempo de vida útil

C₀ = concentración inicial de microorganismos

t = tiempo de reacción

k = constante de velocidad de reacción

CAPITULO IV

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

Encuesta dirigida al personal del centro de Adiestramiento Lechero:

Pregunta N°1: En la elaboración de Queso fresco en el centro de Adiestramiento Lechero se utiliza algún tipo de conservante?

Tabla N° 9.- Utilización de un conservante para elaboración de queso en el CAL

Alternativa	Frecuencia	Porcentaje
Si	0	0
No	4	100
TOTAL	4	100

Elaborado por: Oscar H. López B., 2010

Análisis e Interpretación

Al analizar la primera pregunta de la encuesta, a las cuatro personas relacionadas con la planta piloto del Centro de Adiestramiento Lechero confirman que no se utiliza algún tipo de conservante, siendo esto igual al 100% de la respuesta.

Pregunta N° 2: Conoce usted algún tipo de conservante para la elaboración de quesos? ... mencione el mas común?

Tabla N° 10.- Tipos de conservantes en el mercado

Alternativa	Frecuencia	Porcentaje
Si	3	75
No	1	25
TOTAL	4	100

Elaborado por: Oscar H. López B., 2010

Análisis e Interpretación

De acuerdo a los resultados obtenidos 3 personas del personal que equivale al 75%, conocen algún tipo de conservante, siendo el más común para todos el vulgarmente conocido antiflato.

Pregunta N° 3: Ha escuchado usted acerca del uso de nisina en la elaboración de queso fresco?

Tabla N° 11.- Uso de Nisina en la elaboración de queso fresco

Alternativa	Frecuencia	Porcentaje
Si	1	25%
No	3	75%
TOTAL	4	100%

Elaborado por: Oscar H. López B., 2010

Análisis e Interpretación

Según la tabla N° 11, se puede identificar que solo una persona que equivale al 25% conocía a cerca del uso de nisina en la elaboración de queso fresco, mientras que el 75% del personal fijo del CAL desconocen la existencia de nisina.

Pregunta N° 4: Conoce usted la cantidad de nisina que se utiliza por Kg de queso?

Tabla N° 12.- Cantidad de nisina por Kg de Queso?

Alternativa	Frecuencia	Porcentaje
Si	0	0
No	4	100%
TOTAL	4	100%

Elaborado por: Oscar H. López B., 2010

Análisis e Interpretación

En la Tabla N°12, se puede verificar que todo el personal desconoce la concentración de nisina en la elaboración de queso fresco, es decir el 100% de encuestados ignoran sobre el tema. .

Se ha podido verificar que en el Centro de Adiestramiento Lechero el 75% del personal desconoce el uso de nisina, y en lo que respecta a la concentración este 25% restante del anterior se suma siendo el 100% de encuestados desconocen la dosis a usarse de nisina en la elaboración de queso fresco, es uno de los motivos por el cual no se ha utilizado nisina.

Los tratamientos a aplicarse en este proyecto se presentan en la tabla N° 13, de los cuales se identificará el mejor tratamiento para disminuir carga microbiana y prolongar tiempo de vida útil.

Tabla N° 13.- Tratamientos a aplicarse

Tratamientos		Detalles
1	a0b0	Leche Cruda sin tratamiento
2	a0b1	Leche Cruda con 0,2 g nisina/ Kg de queso
3	a0b2	Leche Cruda con 0,3 g nisina / Kg de queso
4	a0b3	Leche Cruda con 0,4 g nisina / Kg de queso
5	a0b4	Leche Cruda con 0,5 g nisina / Kg de queso
6	a1b0	Leche Pasteurizada sin tratamiento
7	a1b1	Leche Pasteurizada con 0,2 g nisina / Kg de queso
8	a1b2	Leche Pasteurizada con 0,3 g nisina / Kg de queso
9	a1b3	Leche Pasteurizada con 0,4 g nisina / Kg de queso
10	a1b4	Leche Pasteurizada con 0,5 g nisina / Kg de queso

Elaborado por: Oscar H. López B., 2010

4.1.- pH y Peso de las muestras de queso fresco elaborado con leche cruda y pasteurizada con diferentes concentraciones de Nisina

Tabla N° 14.- pH, Peso y Rendimiento de muestras de queso con la aplicación de nisina

	Tratamientos		pH	* Peso de queso (Kg)	**Rendimiento $R = \frac{\text{peso final}}{\text{peso inicial}} * 100$
Queso Fresco con Leche Cruda	1	a0b0	5.3	2,4	71,64%
	2	a0b1	5.4	2,4	71,64%
	3	a0b2	5,4	2,35	70,15%
	4	a0b3	5,5	2,35	70,15%
	5	a0b4	5,5	2,4	71,64%
Queso Fresco con Leche Pasteurizada	6	a1b0	5,5	2,4	71,64%
	7	a1b1	5,6	2,35	70,15%
	8	a1b2	5,6	2,4	71,64%
	9	a1b3	5,6	2,35	70,15%
	10	a1b4	5,7	2,4	71,64%

*se utilizó 15lt de leche para elaborar los quesos

** Para calcular el rendimiento se hace referencia a 15lt de leche utilizados más la cantidad de cloruro de calcio y cuajo con un peso de 3.35Kg

Elaborado por: Oscar H. López B, 2010

En la Tabla N° 14; se puede observar que el pH del queso elaborado con leche cruda es bajo sin embargo al aplicar nisina este incrementa por decimas, al verificar el queso elaborado con leche pasteurizada al igual que el anterior incrementó decimas el pH.

El rendimiento de los quesos no varían al incluir nisina, ya que el peso de nisina en comparación al del queso es bajo, sin embargo en los tratamientos 3, 4, 7, 9 presenta

una variación esto puede deberse a pequeños desperdicios de cuajada al momento del moldeo.

4.2 Recuento Total de microorganismos (ufc/gr)

$$ufc = \frac{N^{\circ} \text{ colonias} * \text{Factor dilución}}{m \text{ muestra}}$$

Tabla N° 15.- Recuento de Aerobios Totales (ufc/gr) en Queso Fresco Elaborado con Leche Cruda y Pasteurizada con la adición de nisina en diferentes concentraciones

	Tratamientos		Recuento total (ufc/gr)		Promedio de Aerobios Totales
			R1	R2	
Queso Fresco con Leche Cruda	1	a0b0	3,6*10 ⁶	2,8*10 ⁶	3,2*10 ⁶
	2	a0b1	7,8*10 ⁵	8,6*10 ⁵	8,2*10 ⁵
	3	a0b2	3,1*10 ⁵	2,8*10 ⁵	2,95*10 ⁵
	4	a0b3	1,04*10 ⁵	1,1*10 ⁵	1,07*10 ⁵
	5	a0b4	3,8*10 ⁴	3,7*10 ⁴	3,75*10 ⁴
Queso Fresco con Leche Pasteurizada	6	a1b0	3,2*10 ⁴	2,9*10 ⁴	3,05*10 ⁴
	7	a1b1	7,1*10 ³	6,9*10 ³	7,0*10 ³
	8	a1b2	2,7*10 ³	2,1*10 ⁵	2,4*10 ³
	9	a1b3	8,1*10 ²	7,5*10 ²	7,8*10 ²
	10	a1b4	2,5*10 ²	2,3*10 ²	2,4*10 ²

Fuente: Laboratorio de la UOITA

Elaborado por: Oscar H. López B, 2010

Tabla N° 16.- Porcentaje de Disminución en el recuento de aerobios totales al incluir nisina en diferentes concentraciones

	Tratamientos		Promedio Aerobios Totales	Porcentaje de Disminución
Queso Fresco con Leche Cruda	1	a0b0	$3,2 \cdot 10^6$	0
	2	a0b1	$8,2 \cdot 10^5$	74,38%
	3	a0b2	$2,95 \cdot 10^5$	90,78%
	4	a0b3	$1,07 \cdot 10^5$	96,66%
	5	a0b4	$3,75 \cdot 10^4$	98,83%
Queso Fresco con Leche Pasteurizada	6	a1b0	$3,05 \cdot 10^4$	0
	7	a1b1	$7,0 \cdot 10^3$	77,05%
	8	a1b2	$2,4 \cdot 10^3$	92,13%
	9	a1b3	$7,8 \cdot 10^2$	97,44%
	10	a1b4	$2,4 \cdot 10^2$	99,22%

Fuente: Laboratorio de la UOITA

Elaborado por: Oscar H. López B, 2010

Nota: Los tratamientos 1 (a0b0), 6 (a1b0) son tratamientos patrones en base a los cuales se ha obtenido el porcentaje de disminución de la carga microbiana

El porcentaje de disminución de la carga microbiana es calculado en base a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Reducción} = (100 - (\text{Recuento con tratamiento} \cdot 100) / (\text{Recuento sin tratamiento}))$$

De acuerdo a los datos presentados en la Tabla N°16; el tratamiento 1 (a0b0: queso con Leche cruda sin pasteurizar y sin tratamiento) presenta mayor contaminación en el recuento total de microorganismos. Mientras que el tratamiento 10 (a1b4: Queso con Leche pasteurizada con 0,5 g de nisina / Kg de queso) alcanza menor contaminación en el recuento total de microorganismos, disminuyendo aerobios totales en leche cruda un 98.8% y en leche pasteurizada un 99.2%

Tabla N° 17.- Análisis de Varianza para Recuento de Aerobios Totales en los diferentes tratamientos aplicados

ANOVA Efectos	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F-calculado	P-Value
Replica	$2,80411 \cdot 10^{10}$	1	$2,80411 \cdot 10^{10}$	0,85	0,3796
Factor A	$3,90477 \cdot 10^{12}$	1	$3,90477 \cdot 10^{12}$	118,87	000
Factor B	$7,17079 \cdot 10^{12}$	4	$1,7927 \cdot 10^{12}$	54,58	000
Interacción AB	$6,90022 \cdot 10^{12}$	4	$1,72505 \cdot 10^{12}$	52,52	000
Residuo	$2,95632 \cdot 10^{11}$	9	$3,2848 \cdot 10^{10}$		
Total	$1,82994 \cdot 10^{13}$	19			

Elaborado por: Oscar H. López B, 2010

El Análisis de varianza al 95% de nivel de confianza establece que existe significancia en los dos factores de estudio (Leche utilizada y nisina) y en la interacción AB. Por lo tanto, no solo el factor A (leche utilizada) es el responsable de la disminución de la carga microbiana final sino también la acción del factor B (nisina) sobre el factor A y por ende sobre la carga microbiana.

Tabla N° 18.- Prueba de Comparación Múltiple Tukey para para identificar el mejor tratamiento en queso fresco

Factor A	Promedio de Aerobios Totales	Grupos Homogéneos
A1.-Leche Pasteurizada	8184,0	a
A0.- Leche Cruda	891900,0	b

Elaborado por: Oscar H. López B, 2010

La prueba de Tukey Tabla N° 18, establece que A1 (Leche Pasteurizada) es el que influye mayoritariamente en el recuento microbiano, esto permite ratificar que para elaborar queso fresco es mejor pasteurizar la leche a utilizar.

Tabla N° 19.- Prueba de Comparación Múltiple Tukey en nisina utilizada

Factor B	Promedio de Aerobios Totales	Grupos Homogéneos
B4 - 0.5g nisina /kg de queso	18870,0	a
B3 - 0.4g nisina /kg de queso	53890,0	a
B2 - 0.3g nisina /kg de queso	148700,0	a
B1 - 0.2g nisina /kg de queso	413500,0	a
B0 – sin tratamiento	1,61525*10 ⁶	b

Elaborado por: Oscar H. López B, 2010

La prueba de Tukey en la Tabla N° 19, establece que B4 (0.5g de nisina /Kg de queso), es el que influye mayoritariamente en el recuento microbiano, demostrando la efectividad de la nisina en la elaboración de queso fresco.

Tabla N° 20.- Prueba de Comparación Múltiple Tukey en Recuento de Aerobios Totales (interacción axb)

INTERACCIÓN		Promedio de Aerobios Totales
Factor A	Factor B	
A1.-Leche Pasteurizada	B4 - 0.5g nisina /kg de queso	240,0
A1.-Leche Pasteurizada	B3 - 0.4g nisina /kg de queso	780,0
A1.-Leche Pasteurizada	B2 - 0.3g nisina /kg de queso	2400,0
A1.-Leche Pasteurizada	B1 - 0.2g nisina /kg de queso	7000,0
A1.-Leche Pasteurizada	B0 – sin tratamiento	30500,0
A0.- Leche Cruda	B4 - 0.5g nisina /kg de queso	37500,0
A0.- Leche Cruda	B3 - 0.4g nisina /kg de queso	107000,0
A0.- Leche Cruda	B2 - 0.3g nisina /kg de queso	295000,0
A0.- Leche Cruda	B1 - 0.2g nisina /kg de queso	820000,0
A0.- Leche Cruda	B0 – sin tratamiento	3,2*10 ⁶

Elaborado por: Oscar H. López B, 2010

La prueba de Tukey en la Tabla N° 20, establece que el tratamiento A1B4 (quesos elaborados con leche pasteurizada con la adición de 0.5g nisina /kg de queso) es el mejor tratamiento por presentar el valor mas bajo de Recuento microbiológico

4.2 Recuento de Coliformes Totales (ufc/gr) en Queso Fresco Elaborado con Leche Cruda y Pasteurizada y con la Adición de Nisina en diferentes concentraciones

$$ufc = \frac{N^{\circ} \text{ colonias} * \text{Factor dilución}}{m \text{ muestra}}$$

Tabla N° 21.- Recuento de Coliformes Totales en Queso Fresco Elaborado con Leche Cruda y Pasteurizada y con la Adición de Nisina en diferentes concentraciones

	Tratamientos		Coliformes Totales (ufc/gr)		Promedio de Coliformes Totales
			R1	R2	
Queso Fresco con Leche Cruda	1	a0b0	1,2*10 ⁵	1,32*10 ⁵	1,26*10 ⁵
	2	a0b1	3,4*10 ⁴	3,9*10 ⁴	3,65*10 ⁴
	3	a0b2	2,5*10 ⁴	2,8*10 ⁴	2,65*10 ⁴
	4	a0b3	1,9*10 ⁴	2,1*10 ⁴	2,0*10 ⁴
	5	a0b4	1,2*10 ⁴	1,5*10 ⁴	1,35*10 ⁴
Queso Fresco con Leche Pasteurizada	6	a1b0	9,6*10 ³	1,04*10 ⁴	1,0*10 ⁴
	7	a1b1	1,15*10 ³	9,7*10 ³	1,06*10 ³
	8	a1b2	7,8*10 ²	7,1*10 ²	7,45*10 ³
	9	a1b3	3,7*10 ²	4,4*10 ²	4,05*10 ²
	10	a1b4	1,7*10 ²	1,3*10 ²	1,5*10 ²

Fuente: Laboratorio de la UOITA

Elaborado por: Oscar H. López B, 2010

Tabla N° 22.- Porcentaje de Disminución en el recuento de aerobios totales al incluir nisina en diferentes concentraciones

	Tratamientos		Promedio de Coliformes Totales	Porcentaje de Disminución
Queso Fresco con Leche Cruda	1	a0b0	$1,26 \cdot 10^5$	0
	2	a0b1	$3,65 \cdot 10^4$	71,03%
	3	a0b2	$2,65 \cdot 10^4$	78,97%
	4	a0b3	$2,0 \cdot 10^4$	84,13%
	5	a0b4	$1,35 \cdot 10^4$	89,29%
Queso Fresco con Leche Pasteurizada	6	a1b0	$1,0 \cdot 10^4$	0
	7	a1b1	$1,06 \cdot 10^3$	89,4%
	8	a1b2	$7,45 \cdot 10^3$	92,55%
	9	a1b3	$4,05 \cdot 10^2$	95,95%
	10	a1b4	$1,5 \cdot 10^2$	98,5%

Fuente: Laboratorio de la UOITA

Elaborado por: Oscar H. López B, 2010

Nota: Los tratamientos 1 (a0b0), 6 (a1b0) son tratamientos patrones en base a los cuales se ha obtenido el porcentaje de disminución de la carga microbiana

El porcentaje de disminución de la carga microbiana es calculado en base a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Reducción} = (100 - (\text{Recuento con tratamiento} \cdot 100)) / (\text{Recuento sin tratamiento})$$

Según la Tabla N° 22; el tratamiento que mayor porcentaje de disminución de Coliformes Totales (ufc/gr) es la combinación de los factores A1: Leche

Pasteurizada con el Factor B4 (0.5gr de Nisina / Kg de queso) disminuyendo coliformes en leche cruda un 89% y en leche pasteurizada un 98.5%.

Al analizar los resultados obtenidos en el recuento de Coliformes Totales y al comparar con los valores establecidos por la IBNORCA se puede identificar que al elaborar quesos con leche cruda las ufc/gr sobrepasan al valor máximo de la norma aún al incluir nisina, mientras que en el caso de los quesos elaborados con leche pasteurizada la muestra sin tratamiento es la única que se encuentra fuera del rango establecido, mientras que las otras muestras al pasterizar y aplicar nisina disminuyen la carga microbiana obteniendo valores de ufc/gr permitidos.

Tabla N° 23.- Análisis de Varianza para Recuento Coliformes Totales en los diferentes tratamientos aplicados

ANOVA Efectos	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	F-calculado	P-Value
Replica	$3,27168 \cdot 10^7$	1	$3,27168 \cdot 10^9$	4,66	0,0591
Factor A	$8,83176 \cdot 10^9$	1	$8,83176 \cdot 10^9$	1259,18	00.00
Factor B	$1,02199 \cdot 10^{10}$	4	$2,55497 \cdot 10^9$	364,27	00.00
Interacción AB	$7,10574 \cdot 10^9$	4	$1,77643 \cdot 10^9$	253,27	00,00
Residuo	$6,31251 \cdot 10^7$	9	$7,0139 \cdot 10^6$		
Total	$2,62532 \cdot 10^{10}$	19			

Elaborado por: Oscar H. López B., 2010

El Análisis de varianza al 95% de nivel de confianza establece que existe significancia en cada uno de los dos factores estudiados (Leche utilizada y nisina) y en la interacción de los mismos. Por lo tanto, no solo el factor A (leche utilizada) es

el responsable de la disminución de coliformes sino también depende la acción del factor B (nisina) sobre el factor A y por ende sobre la carga microbiana

Tabla N° 24.- Prueba de Comparación Múltiple Tukey para queso fresco

Factor A	Promedios de Colifomes Totales	Grupos Homogéneos
A1.-Leche Pasteurizada	2472,0	a
A0.- Leche Cruda	44500,0	b

Elaborado por: Oscar H. López B, 2010

La prueba de Tukey (Tabla N° 24), establece que A1 (Leche Pasteurizada) es el que influye mayoritariamente en el recuento microbiano, lo que permite ratificar que para elaborar queso fresco es mejor pasteurizar la leche a utilizar.

Tabla N° 25.- Prueba de Comparación Múltiple Tukey para nisina utilizada

Factor B	Promedios de Coliformes Totales	Grupos Homogéneos
B4 - 0.5gr nisina /kg de queso	6825,0	a
B3 - 0.4gr nisina /kg de queso	10202,5	ab
B2 - 0.3gr nisina /kg de queso	13622,5	bc
B1 - 0.2gr nisina /kg de queso	18780,0	c
B0 – sin tratamiento	68000,0	d

Elaborado por: Oscar H. López B, 2010

La prueba de Tukey (Tabla N° 25), establece que B4 (0.5gr de nisina /Kg de queso) es el que influye mayoritariamente en el recuento microbiano, esto permite demostrar la efectividad de la nisina en la elaboración de queso fresco.

Tabla N° 26.- Prueba de Comparación Múltiple Tukey para Recuento de Coliformes Totales (interacción axb)

INTERACCIÓN		Promedio de Aerobios Totales
Factor A	Factor B	
A1.-Leche Pasteurizada	B4 - 0.5g nisina /kg de queso	150,0
A1.-Leche Pasteurizada	B3 - 0.4g nisina /kg de queso	405,0
A1.-Leche Pasteurizada	B2 - 0.3g nisina /kg de queso	745,0
A1.-Leche Pasteurizada	B1 - 0.2g nisina /kg de queso	1060,0
A1.-Leche Pasteurizada	B0 – sin tratamiento	10000,0
A0.- Leche Cruda	B4 - 0.5g nisina /kg de queso	13500,0
A0.- Leche Cruda	B3 - 0.4g nisina /kg de queso	20000,0
A0.- Leche Cruda	B2 - 0.3g nisina /kg de queso	26500,0
A0.- Leche Cruda	B1 - 0.2g nisina /kg de queso	36500,0
A0.- Leche Cruda	B0 – sin tratamiento	126000,0

Elaborado por: Oscar H. López B, 2010

La prueba de Tukey en la Tabla N° 26, establece que A1B4 (quesos elaborados con leche pasteurizada y la adición de 0.5g nisina /kg de queso) es el mejor tratamiento por presentar el valor mas bajo.

Tabla N° 27.- Tratamiento para disminuir aerobios y coliformes totales en queso fresco

Microorganismos Analizados	Factor A	Factor B	Porcentaje de Disminución
Aerobios Totales	A1: Leche pasteurizada	B4: 0,5gr de Nisina/Kg de Queso	99,22%
Coliformes Totales	A1: Leche pasteurizada	B4: 0,5gr de Nisina/Kg de Queso	98,50%

Elaborado por: Oscar H. López B, 2010

Al realizar el análisis de varianza se identificó que el mejor tratamiento es a1b4 (quesos elaborados con Leche pasteurizada y la adición de 0.5gr de Nisina /Kg de queso) motivo que esta combinación demostró su efectividad al disminuir 99.2 y 98.50 de Aerobios y Coliformes totales respectivamente, es importante resaltar que los quesos sin tratamiento térmico y sin la aplicación de nisina no alcanzan los valores máximos que sugiere la norma, sin embargo al incluir nisina el producto se encuentra entre los estándares establecidos.

4.4 Análisis Sensorial

Para el análisis sensorial de las muestras se ha considerado elaborar el queso con leche pasteurizada, motivo que este factor permitió que los valores se encuentren en los rangos establecidos en la norma IBNORCA conjuntamente con los cuatro parámetros de cantidad de nisina con su respectivo testigo (sin tratamiento).

Se realizó un control mediante una comparación múltiple utilizando bloques completos para determinar si el catador identifica la intensidad del conservante.

El análisis sensorial se llevó a cabo mediante el uso de 25 panelistas no entrenados y cinco muestras de queso fresco (elaborado con leche pasteurizada y la adición de 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 gr de nisina por Kilogramo de queso con su respectiva muestra testigo), las muestras fueron etiquetadas con una numeración de tres dígitos seleccionados al

azar, puestas en bandejas desechables y acomodado en forma aleatoria para cada uno de los panelistas, a los cuales se les aplicó una encuesta referente a diversos parámetros como olor, color, sabor, textura y aceptabilidad, con una escala hedónica de 1 al 5, siendo uno muy desagradable y cinco muy agradable.

Tratamiento Estadístico De Las Respuestas Experimentales

Pruebas Parametricas

Análisis de varianza y pruebas de comparación Múltiple

Los principales atributos sensoriales a evaluar productos marinos, durante la sesión de cata, con su respectiva escala y valoración fueron los siguientes (Anexo 4 Diseño de Hoja de Cata):

COLOR

Escala	Valoración
Muy Desagradable	1
Desagradable	2
Ni agrada ni Desagrada	3
Agradable	4
Muy Agradable	5

OLOR

Escala	Valoración
Muy Desagradable	1
Desagradable	2
Ni agrada ni Desagrada	3
Agradable	4
Muy Agradable	5

SABOR

Escala	Valoración
Muy Desagradable	1
Desagradable	2

Ni agrada ni Desagrada	3
Agradable	4
Muy Agradable	5

TEXTURA

Escala	Valoración
Muy Dura	1
Dura	2
Ni Dura ni suave	3
Suave	4
Muy Suave	5

ACEPTABILIDAD

Escala	Valoración
Muy Desagradable	1
Desagradable	2
Ni agrada ni Desagrada	3
Agradable	4
Muy Agradable	5

En la hoja de cata elaborada para la evaluación sensorial, se realizó la siguiente codificación de las muestras para no brindar excesiva información al catador y así evitar influenciar en los resultados:

502 : sin Tratamiento

315 : 0.2 gr de nisina / Kg de queso

628: 0.3 gr de nisina / Kg de queso

136: 0.4 gr de nisina / Kg de queso

741: 0.5 gr de nisina / Kg de queso

Tabla N° 28.- Tratamiento aritmético de los datos de la evaluación sensorial del queso fresco con la aplicación de Nisina

Observación	502	315	628	136	741	Sumatoria
	Sin Trata	0,2gr/Kg	0,3gr/Kg	0,4gr/Kg	0,5 gr/Kg	
Color	101	99	98	101	102	501
Olor	95	92	94	97	97	475
Sabor	93	93	92	94	95	469
Textura	77	69	71	73	74	364
Aceptabilidad	100	101	98	99	101	499

Elaborado por: Oscar H. López B, 2010

Se realizó una evaluación sensorial de muestras de queso fresco elaborado con leche pasteurizada, combinando con todos los parámetros del factor B, con su respectiva muestra testigo. El panel sensorial se llevó a cabo en el Laboratorio de la Unidad Operativa de Investigación en Tecnología de Alimentos, se aplicó a 25 estudiantes de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos con conocimientos de evaluación sensorial, a los mismos se les recordó previamente sobre las generalidades de un panel sensorial, características del queso y parámetros a evaluarse en el mismo, se desarrollo 5 grupos.

Se comparó las muestras con tratamiento y la muestra testigo en cuanto a los parámetros de sabor, olor, color, textura, sabor y aceptabilidad.

Tabla 29.- Análisis de Varianza (Evaluación Sensorial del Color)

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Razón de Varianza (Fc)	F _{tablas}
Tratamientos	4	0,432	0,108	0,31952663	2,44723651
Error	120	40,56	0,338		
Total	124	40,992	0,33058065		

Elaborado por: Oscar H. López B., 2010

Hipótesis

H₀: A = B = C = D = E

H₁: A ≠ B ≠ C ≠ D ≠ E

Regla de Decisión.- A un nivel de significancia del 5 %, aceptar H₀ si el valor “F” calculado es menor que el “F” crítico (F_{tablas}).

Decisión.- Se rechaza la hipótesis alternativa y se acepta la hipótesis nula (H₀).

Conclusión.- No existe diferencia significativa en el color de los quesos al aplicar los tratamientos. Sin embargo al mirar las medias calculadas, la muestra con el **tratamiento de 0.5gr de nisina/ Kg de Queso** presentan una media con mayor valor, por tanto los catadores califican a estos dos con un mejor color.

Tabla N° 30.- Análisis de Varianza (Evaluación Sensorial del Olor)

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Razón de Varianza (Fc)	F _{tablas}
Tratamientos	4	0,56	0,14	0,31437126	2,4472365
Error	120	53,44	0,44533333		
Total	124	54	0,43548387		

Elaborado por: Oscar H. López B., 2010

Hipótesis

H₀: A = B = C = D = E

H₁: A ≠ B ≠ C ≠ D ≠ E

Regla de Decisión.- A un nivel de significancia del 5 %, aceptar H₀ si el valor “F” calculado es menor que el “F” crítico (F_{tablas})

Decisión.- Se rechaza la hipótesis alternativa y se acepta la hipótesis nula (H₀).

Conclusión.- No existe diferencia significativa en el olor de los quesos al aplicar los tratamientos. Sin embargo al mirar las medias calculadas, las muestras con

tratamiento de 0.4gr y 0.5gr de nisina/ Kg de Queso. Presenta una media con mayor valor, por tanto los catadores califican a esta con un mejor olor.

Tabla 31.- Análisis de Varianza (Evaluación Sensorial de la sabor)

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Razón de Varianza (Fc)	F _{tablas}
Tratamientos	4	0,512	0,128	0,3023622	2,44723651
Error	120	50,8	0,42333333		
Total	124	51,312	0,41380645		

Elaborado por: Oscar H. López B., 2010

Hipótesis

H₀: A = B = C = D = E

H₁: A ≠ B ≠ C ≠ D ≠ E

Regla de Decisión.- A un nivel de significancia del 5 %, aceptar H₀ si el valor “F” calculado es menor que el “F” crítico (F_{tablas})

Decisión.- Se rechaza la hipótesis alternativa y se acepta la hipótesis nula (H₀).

Conclusión.- No existe diferencia significativa en el sabor de los quesos al aplicar los tratamientos. Sin embargo al mirar las medias calculadas, la muestra con tratamiento 0.5gr de nisina/Kg de queso presentan una media con mayor valor, por tanto los catadores califican a esta dos con un mejor sabor.

Tabla 32.- Análisis de Varianza (Evaluación Sensorial de la textura)

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Razón de Varianza (Fc)	F _{tablas}
Tratamientos	4	1,472	0,368	1,0887574	2,44723651
Error	120	40,56	0,338		
Total	124	42,032	0,33896774		

Elaborado por: Oscar H. López B., 2010

Hipótesis

H₀: A = B = C = D = E

H₁: A ≠ B ≠ C ≠ D ≠ E

Regla de Decisión.- A un nivel de significancia del 5 %, aceptar H₀ si el valor “F” calculado es menor que el “F” crítico (F_{tablas})

Decisión.- Se rechaza la hipótesis alternativa y se acepta la hipótesis nula (H₀).

Conclusión.- No existe diferencia significativa en la textura de los quesos al aplicar los tratamientos.

Tabla 33.-Análisis de Varianza (Evaluación Sensorial de Aceptabilidad)

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	Razón de Varianza (Fc)	F _{tablas}
Tratamientos	4	0,272	0,068	0,22222222	2,44723651
Error	120	36,72	0,306		
Total	124	36,992	0,29832258		

Elaborado por: Oscar H. López B., 2010

Hipótesis

H₀: A = B = C = D = E

H₁: A ≠ B ≠ C ≠ D ≠ E

Regla de Decisión.- A un nivel de significancia del 5 %, aceptar H₀ si el valor “F” calculado es menor que el “F” crítico (F_{tablas}).

Decisión.- Se rechaza la hipótesis alternativa y se acepta la hipótesis nula (H₀).

Conclusión.- No existe diferencia significativa en la aceptabilidad de los quesos al aplicar los tratamientos.

4.5 Determinación de tiempo de vida útil

Para el cálculo del tiempo de vida útil en queso se dió un seguimiento al mejor tratamiento (0.5gr nisina/Kg de queso) y su respectiva muestra testigo

4.5.1 Recuento de Coliformes Totales en Queso Fresco testigo (sin tratamiento)

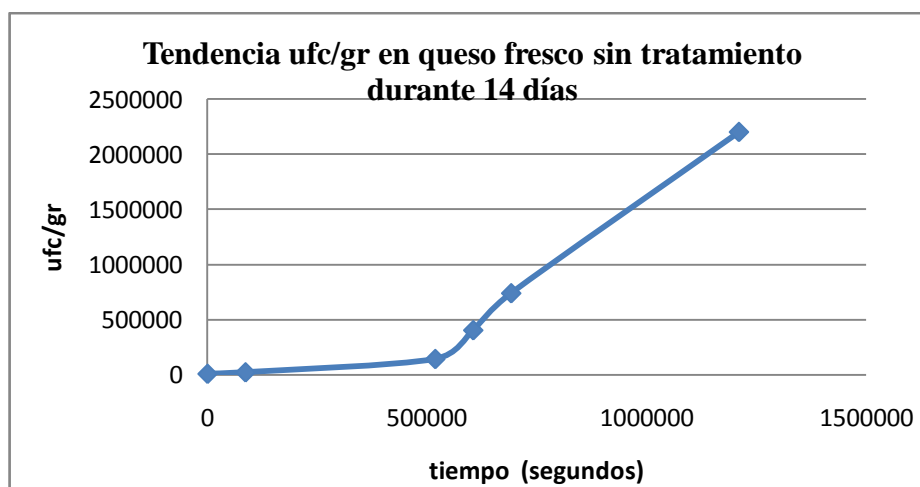
Tabla N° 34.- Recuento de Coliformes Totales en Queso Fresco testigo (sin tratamiento) para la determinación de vida útil durante 14 días

Tiempo		(ufc/gr)		Promedio	Ln ufc/gr
días	seg	R1	R2		
0	0	$1,02 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^4$	$1,06 \cdot 10^4$	9,26860928
1	86400	$2,16 \cdot 10^4$	$2,65 \cdot 10^4$	$2,405 \cdot 10^4$	10,08789028
6	518400	$1,26 \cdot 10^5$	$1,63 \cdot 10^5$	144500	11,88103479
7	604800	$4,2 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^5$	$4,05 \cdot 10^5$	12,91164235
8	691200	$7,0 \cdot 10^5$	$7,8 \cdot 10^5$	$7,4 \cdot 10^5$	13,51440547
14	1209600	$2,4 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$	14,60396792

Fuente: Laboratorio de la UOITA

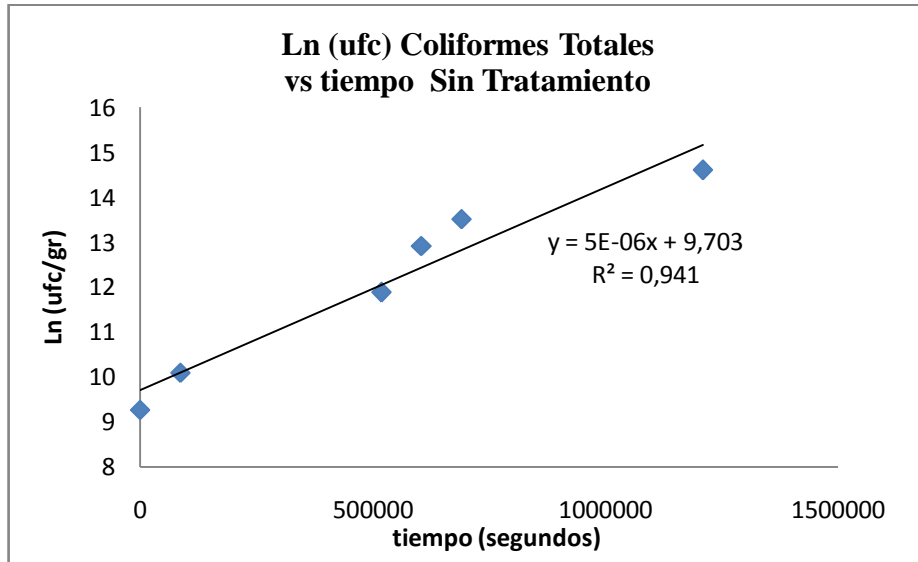
Elaborado por: Oscar H. López B., 2010

Gráfico N° 5.- Tendencia de ufc/gr (coliformes totales) en queso fresco sin tratamiento durante 14 días



Elaborado por: Oscar H. López B., 2010

Gráfico N° 6.- Ln(ufc/gr) Coliformes Totales vs tiempo en Queso Fresco sin tratamiento



Elaborado por: Oscar H. López B., 2010

Para determinar el tiempo de vida útil se ha utilizado la siguiente formula:

$$\ln C = kt + \ln C_0$$

C = parámetro escogido como límite de tiempo de vida útil

C₀ = concentración inicial

t = tiempo de reacción

k = constante de velocidad de reacción

$$\ln C = kt + \ln C_0$$

$$\ln(C) = 5E-06x + 9,703$$

$$\ln C_0 = 9,703$$

$$k = 5 \cdot 10^{-6}$$

$$C = 5 \cdot 10^5$$

C = 5000 ufc/g se recomienda como nivel máximo de coliformes totales en queso fresco, de acuerdo al IBNORCA, pero por razones de calculo se ha multiplicado por

$1 \cdot 10^2$ debido al alto nivel microbiológico y con este valor se puede realizar el cálculo para 14 días y una comparación entre las muestras analizadas.

$$\ln C - \ln C_0 = kt$$

$$\ln C = kt + \ln C_0$$

$$t = \frac{\ln(C) - \ln(C_0)}{k}$$

$$t = \frac{3,41936338}{5 \cdot 10^{-6}}$$

$$t = 683872,675 \text{ Segundos}$$

$$t = 8 \text{ Días}$$

Al realizar los cálculos respectivos para determinar el tiempo de vida útil de queso fresco sin tratamiento, se identificó que el tiempo a temperaturas de refrigeración (6.5°C) es de 8 días, es importante recalcar que a los 8 días de seguimiento el queso aun mantenía sus características normales, en los días 13 y 14 el queso empezó a cambiar su coloración de blanca a blanca amarillenta, durante este periodo de estudio del queso el desuerado fue mínimo.

4.5.2 Recuento de Coliformes Totales en Queso Fresco con tratamiento (0.5gr nisina/kg queso) para la determinación de vida útil durante 14 días

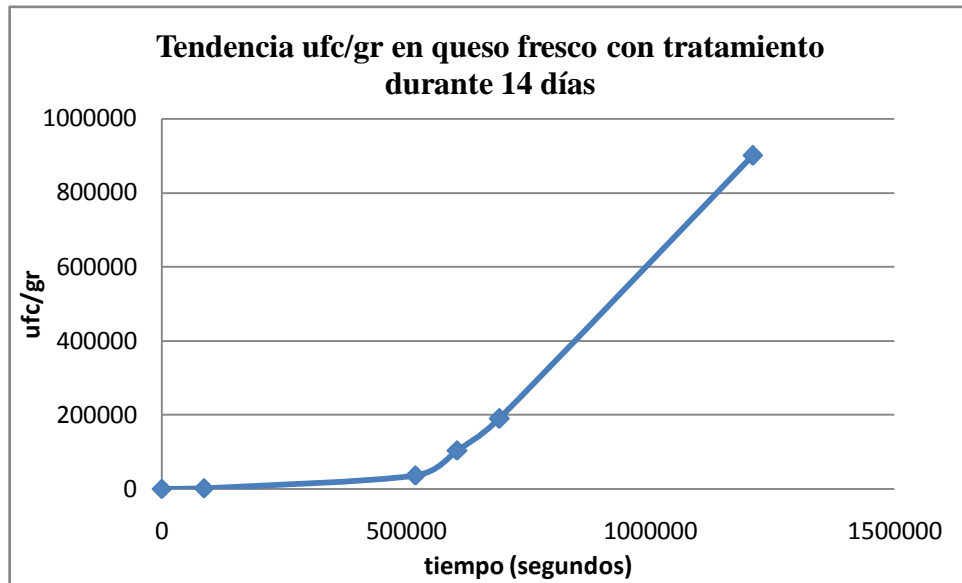
Tabla N° 35.- Recuento de Coliformes Totales en Queso Fresco con tratamiento (0.5gr nisina/kg queso) para la determinación de vida útil durante 14 días

Tiempo		(ufc/gr)		Promedio	Ln ufc/gr
días	seg	R1	R2		
0	0	$2,8 \cdot 10^2$	$3,2 \cdot 10^2$	$3,0 \cdot 10^2$	5,703782475
1	86400	$2,5 \cdot 10^3$	$3,5 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$	8,006367568
6	518400	$3,2 \cdot 10^4$	$4,1 \cdot 10^4$	$3,65 \cdot 10^4$	10,50506754
7	604800	$9,6 \cdot 10^4$	$1,12 \cdot 10^5$	$1,04 \cdot 10^5$	11,55214618
8	691200	$2,2 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^5$	12,15477935
14	1209600	$8,7 \cdot 10^5$	$9,3 \cdot 10^5$	$9,0 \cdot 10^5$	13,71015004

Fuente: Laboratorio de la UOITA

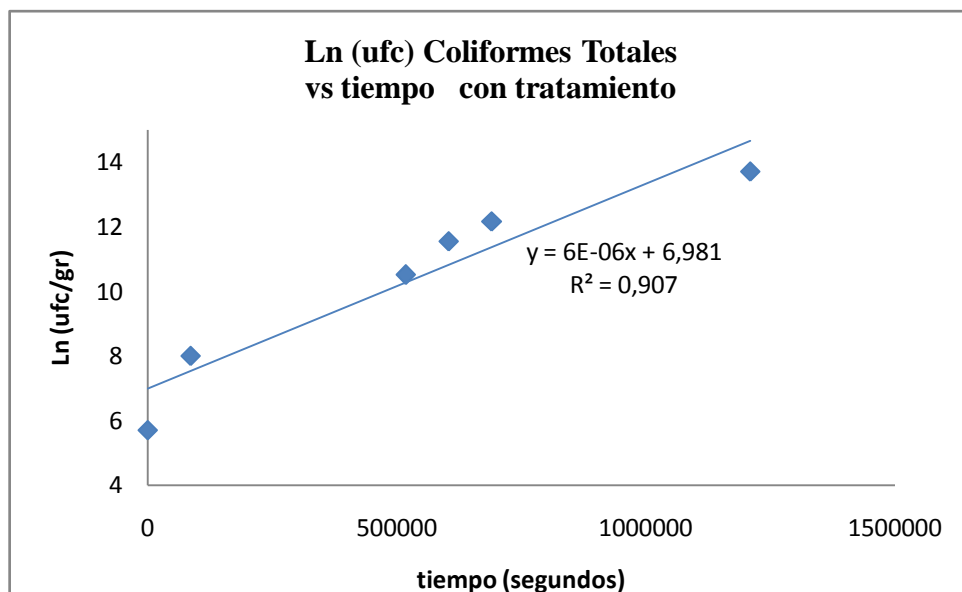
Elaborado por: Oscar H. López B., 2010

Gráfico N° 7.- Tendencia de ufc/gr en queso fresco con tratamiento durante 14 días



Elaborado por: Oscar H. López B., 2010

Gráfico N°8.- Ln(ufc/gr) Aerobios Totales vs tiempo en Queso Fresco con tratamiento



Elaborado por: Oscar H. López B., 2010

$$\ln C = kt + \ln C_0$$

C = parámetro escogido como límite de tiempo de vida útil

C₀ = concentración inicial

t = tiempo de reacción

k = constante de velocidad de reacción

$$\ln C = kt + \ln C_0$$

$$\ln(C) = 6E-06x + 6,981$$

$$\ln C_0 = 9.703$$

$$k = 6 \cdot 10^{-6}$$

$$C = 5 \cdot 10^5$$

C = 500 ufc/g se recomienda como nivel máximo de coliformes totales en queso fresco, de acuerdo a la Norma INEN 1528/1987, pero por razones de cálculo se ha multiplicado por $1 \cdot 10^2$ debido al alto nivel microbiológico y con este valor se puede realizar el cálculo y una comparación entre las muestras analizadas.

$$\ln C - \ln C_0 = kt$$

$$\ln C = kt + \ln C_0$$

$$t = \frac{\ln(C) - \ln(C_0)}{k}$$

$$t = \frac{6,14136338}{6 \cdot 10^{-6}}$$

$$t = 1023560,56 \text{ Segundos}$$

$$t = 12 \text{ Días}$$

Al realizar los cálculos respectivos para determinar el tiempo de vida útil de queso fresco con 0.5 gr de nisina/Kg de queso, se identificó que el tiempo a temperaturas de refrigeración (6.5°C) es de 12 días, es importante recalcar que hasta los 13 días de seguimiento el queso aun mantenía sus características normales, en el día 14 el queso empezó a cambiar su coloración de blanca a blanca amarillenta, durante este periodo de estudio del queso el desuerado fue mínimo.

4.6 Estudio Económico

A continuación se detallan todos los aspectos del estudio económico:

MATERIA PRIMA	Valor unitario	Cantidad	Sub Total
Leche (lt)	0,350	100	35,000
Cloruro de calcio (gr)	0,014	20	0,280
Cuajo (gr)	0,007	2	0,014
Sal (gr)	0,001	198	0,123
MATERIALES INDIRECTOS			
Fundas de polietileno	0,020	33	0,660
TOTAL	0,392	353	36,077

DEPRECIACIÓN						
ACTIVOS FIJOS	Costo	Deprec. anual	Deprec. mensual	Costo por hora	Horas utilizadas	Costo/hora
Olla de cocción	1.000,00	100,00	8,33	0,012	0,5	0,006
Tina quesera	1.500,00	150,00	12,50	0,017	1,5	0,026
Cuarto frío	3.000,00	150,00	12,50	0,017	20	0,347
Utensilios	150,00	15,00	1,25	0,002	5	0,009
Mesa	500,00	50,00	4,17	0,006	2	0,012
TOTAL						0,399

Personal 1 7 horas /día					
SUELDOS					
Sueldo Mensual	# personas	Sueldo /hora	Sueldo por día	Sueldo por hora	Total del sueldo
313,43	1	1,306	9,142	1,143	9,142

SUMINISTROS			
Detalle	Cantidad	V. Unitario (\$)	V. Mensual (\$)
Energía eléctrica (Kw)	10	0,1353	1,35
Agua (lt)	90	0,0003	0,03
Diesel (gal)	2	1,0500	2,10
Detergente (Kg)	0,25	2,2700	0,57
Suman			4,05

Costo de Producción De Queso Fresco Sin Tratamiento	
	Total
Materia Prima	35,954
Activos Fijos	0,399
Sueldo	9,142
Servicios	4,051
Total Costo de Producción	49,547
Precio Unitario	1,50

NISINA	Valor unitario/gr	Cantidad	Sub Total	Costo nisina /queso
Nisina	0,32	7,7	2.46	0,075

Costo de Producción de Queso Fresco con 0.5gr de Nisina	
	Total
Materia Prima	36,416
Activos Fijos	0,399
Sueldo	9,142
Servicios	4,051
Nisina	2.46
Total Costo de Producción	52.01
Precio Unitario	1,57

Con este estudio se ha determinado el costo de la producción de queso fresco de 500gr es de \$1.50, estimando el costo de materia prima, activos fijos y su respectiva depreciación, se ha incluido a una persona quien labora en el área de quesos, con 7 horas por día que es el tiempo considerado en producir los quesos, la hora restante la utiliza en colaboración para la producción de otros productos, a todo esto se añadió el costo de servicios básicos, posterior a identificar el precio unitario de queso fresco se incluye el costo de 7.7 gr nisina utilizados en 100lt de leche misma cantidad procesada por parada, obteniendo un adicional de 15 ctvs. por kilo de queso o a su vez 7,5 ctvs. por cada queso producido, dando como valor final de producción \$ 1.57 por queso fresco (500gr) con 0.5gr de nisina/Kg de queso

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Con la identificación del tratamiento A₁B₄ como el mejor, se demostró que para la elaboración de queso se utiliza leche pasteurizada y concentración de nisina de 0.5 gr /kg de queso o 7.7g / 100lt de leche utilizados, esto permite incrementar el tiempo de vida útil sin alterar características sensoriales y físico-químicas.
- Se realizó un análisis sensorial con muestras de queso elaborado con leche pasteurizada y nisina, y se identificó que los quesos no presentaban diferencia significativa en sus características organolépticas en relación a la muestra testigo.
- El añadir 0.5gr de nisina / Kg de queso fresco elaborado en leche pasteurizada permitió disminuir un 98.5% de Coliformes Totales, al cabo de 14 días de almacenamiento a 6.5°C los resultados demostraron que el uso de nisina permite extender la vida útil en queso fresco.
- Mediante el análisis de costos se determinó que por 165 Kg de queso fresco el costo de producción es de \$49.54 USD, con un precio unitario de \$1.50 USD por 500gr de queso, al añadir 0.5gr de nisina/Kg de queso el costo de producción incrementa a \$ 52.01 USD y el precio unitario a \$ 1.57 USD, si el precio de venta es de \$1.70 USD al incrementar nisina aun existe utilidad.

5.2 Recomendaciones

- Al identificar que la nisina favorece los procesos de conservación y comercialización de queso fresco, mediante una considerable reducción de la carga microbiológica y prolongación de tiempo de vida útil se recomienda al Centro de Adiestramiento lechero usar este bioconservante.
- Se recomienda que el personal del Centro de Adiestramiento Lechero vigile el proceso de elaboración de queso fresco cuando colaboran los señores estudiantes, para que de esta manera se cumpla las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), tiempos y temperaturas del proceso.
- Se recomienda que después de añadir nisina la manipulación de los quesos se la realice con las mismas condiciones de asepsia para evitar contaminación cruzada, porque el uso de nisina no sustituye las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) .

CAPITULO VI

PROPUESTA

6.1. Datos Informativos

- **Título:** “Aplicación de Nisina para Incrementar el Tiempo de Vida Útil en Queso Fresco en el Centro de Adiestramiento Lechero (CAL)”
- **Unidad Ejecutora:** Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.
- **Beneficiario:** Centro de Adiestramiento Lechero (CAL)
- **Provincia:** Tungurahua
- **Cantón:** Ambato
- **Dirección:** Rumiñahui y Pichincha
- **Director del Proyecto:** Ing. Cesar German Tomala
- **Personal Operativo:** Egdo. Oscar Hernán López Benalcázar

6.2. Antecedentes de la Propuesta

Gustavo y Colaboradores (2009) La nisina es capaz de frenar el crecimiento de microorganismos. El empleo de bacteriocinas, representa una alternativa para elaboración de quesos con mejor calidad microbiológica.

Sangronis Elba, García Jesús (2007), El uso de la nisina, es una alternativa para disminuir los riesgos de la elaboración de queso, aumentar la vida útil del producto y en consecuencia mejorar su comercialización

Las conclusiones de este estudio han permitido demostrar la efectividad de la nisina, disminuir la carga microbiana e incrementar el tiempo de vida útil, sin alterar las características sensoriales del producto.

Además este bioconservante no influye significativamente en lo que respecta al costo, simplemente incrementa \$ 0.01 USD por unidad de queso (500gr)

6.3 Justificación

El Centro de Adiestramiento lechero (CAL) a más de otros productos elabora queso fresco, una de las problemáticas en lo que respecta la comercialización es la competencia que existe con otras marcas porque ellas al utilizar conservantes, diferente tipo de empaque como es al vacío, han prolongado el tiempo de vida útil de sus quesos, sin embargo en el CAL no incluyen ningún tipo de conservante por brindar un queso saludable.

La nisina es una bacteriocina atóxica (se inactiva por las enzimas del tracto digestivo humano), disminuye la carga microbiana del producto y así aumenta su tiempo de vida útil, esto permite reducir la contaminación inicial del producto y mantenerlo en condiciones adecuadas hasta que llegue al cliente el queso con características agradables.

Por esta razón el presente proyecto es de gran utilidad para el CAL porque le permitirá disminuir la carga microbiana del queso, prolongar un aproximado de 4 días adicionales de vida útil, ayudando en la distribución y comercialización del queso.

6.4 Objetivos

6.4.1 Objetivo General

- Proponer el uso de nisina para prolongar el tiempo de vida útil en queso fresco en el Centro de Adiestramiento Lechero (CAL)

6.4.2 Objetivos Específicos

- Elaborar un manual de la aplicación de nisina y la tecnología de la elaboración de queso fresco.
- Difundir al personal del Centro de Adiestramiento Lechero el uso de nisina en la Elaboración de Queso Fresco.

- Realizar un seguimiento de la efectividad de la nisina para prolongar el tiempo de vida útil en la elaboración de queso fresco en el Centro de Adiestramiento Lechero.

6.5 Análisis de Factibilidad

El análisis de factibilidad es la sensibilidad del proyecto a ciertos factores que pueden ser tanto externos como internos y que influyan en la ejecución del mismo.

El Centro de Adiestramiento Lechero cuenta con el talento humano fijo para elaborar queso fresco con la adición de nisina, por esta razón en lo que respecta al personal el proyecto es factible.

El centro de Adiestramiento Lechero (CAL) cuenta con sus propias instalaciones: amplia planta piloto, ollas de cocción tipo Bach, tina quesera, moldes, balanzas, cuarto frío para la refrigeración y almacenamiento de los quesos, en fin la planta cuenta con todos los equipos necesarios para elaborar quesos.

El recurso económico será decisión del personal Administrativo del CAL, la inversión mensual es de \$19.71 USD por 61.6 gr de nisina, para 200 litros de leche utilizados en la elaboración de queso fresco semanalmente.

Al ser estos \$19.71 USD el costo de nisina por 800 litros de leche utilizados para elaborar un aproximado de 132 Kilos de queso fresco mensualmente, con la garantía de prolongar el tiempo de vida útil y brindar al cliente quesos de calidad con baja carga microbiana, es viable el uso de este bioconservante, porque a mas de tener un costo considerable podría el CAL aumentar las ventas y producir mayor cantidad de queso, por todo lo expuesto esta propuesta resulta factible.

6.6 Fundamentación

Esta propuesta se fundamenta en Buenas Prácticas de Manufactura, tecnología de lácteos - queso fresco, hoja técnica de las concentraciones permitidas de nisina y las conclusiones del presente estudio.

La fundamentación legal de esta propuesta se apega a las Normas INEN tanto para la elaboración de queso fresco como para el análisis microbiológico útil para el seguimiento de la efectividad de la nisina en queso fresco.

6.7 Metodología

La propuesta para la elaboración de queso fresco con adición de nisina en el Centro de Adiestramiento Lechero, es la siguiente:

- Analizar los resultados y las conclusiones del presente proyecto
- Elaborar un manual para difundir el uso de nisina en la elaboración de queso fresco al personal fijo y transitorio (estudiantes del instituto) del CAL, además incluir en el manual Buenas Prácticas de Manufactura para impulsar la aplicación de estas durante la producción de queso fresco.
- Elaboración de queso fresco con la adición de nisina y verificación de la efectividad de la nisina, por medio de seguimiento microbiológico.

6.8 Administración

La ejecución de la propuesta estará coordinada por los responsables del proyecto Ing. Cesar German, Egdo. Oscar López B. y los interesados, en este caso el Centro de Adiestramiento Lechero, los mismos que planificarán la producción de quesos con la adición de nisina.

6.9 Previsión de la Evaluación

La evaluación al uso de nisina en queso fresco se la realizará por medio de la verificación de características físico-químicas, como son peso, rendimiento, pH acidez, con las mismas que podemos analizar si se esta cumpliendo con los parámetros establecidos en normativos.

Para comprobar la efectividad de la nisina se dará un seguimiento microbiológico a muestras de queso, para identificar si se encuentra entre los rangos establecidos en normativos.

BIBLIOGRAFÍA

AGROCENTRO Lechero, ficha técnica de nisina

ALVARADO, Juan; 1996, “Principios de ingeniería Aplicados a Alimentos,” Ed. Radiocomunicaciones; Quito- Ecuador, pp 372-398.

CABEZA H. Enrique A. “Aplicación de la Microbiología Predictiva en la determinación de la vida útil de los alimentos” Departamento de Microbiología Facultad de Ciencias Básicas Universidad de Pamplona, Pamplona, Colombia 2004 [En línea]. Disponible en: <http://enalcahe.googlepages.com/UsodelaMicrobiologaPredictivaparaest.pdf>

CASTRO Gustavo, VALBUENA Emiro, BRÍÑEZ Wilfido, SÁNCHEZ Egar, VERA TOVAR Armando, “Comparación del Empleo de Nisina y Cultivos de *Lactococcus Lactis subsp. Lactis* para la Biopreservación de Queso Blanco” [en línea]. Disponible en: <http://www.fcv.luz.edu.ve/Pdf/2009/02/articulo14.pdf>

CASTRO M., GARRO O., CAMPOS C., GERSCHENSON, L. “Efecto de Sorbato de Potasio, Nisina y Tween20 sobre el crecimiento de *Zygosaccharomyces bailii*” Universidad Nacional del noroeste Buenos Aires Argentina 2004 [en línea].

CAVA Rita, SANGRONIS Elba, LUCCI Elisabetta, WOYZECHOWSQUI Lidia, “Efecto de la adición de nisina en queso fresco telita sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus*” (en línea). Disponible en : <http://www.scielo.org.ve/scielo>.

DIARIO Los Andes - Riobamba - Ecuador - Prensa – Noticias/ lunes, 29 de diciembre de 2008 Se fortalecieron los sectores productivo y agropecuario en Tungurahua
http://www.diariolosandes.com.ec/index2.php?option=com_content&do_pdf=1&id=11453

DICCIONARIO, Online (1998).” Método Experimental” [En línea].

Disponible en:

<http://www.diccionarios-online.com.ar/psy/m%E9todo+experimental.html>

GOMEZ, Juan C. Él Universo “Según Ganaderos, precio de la leche no compensa gastos ni el trabajo” [En línea]. Disponible en:

<http://www.eluniverso.com/2009/07/25.html>

GUTIERREZ JULIO (2008), “Tecnología de Lácteos” Ambato – Ecuador 2008 pp: 30-36

HARB V. Christian, HERRERA A. Verónica, y TORRES T. Mabel, “Evaluación de la producción de nisina a partir del *lactococcus lactis* subsp. *Lactis*” Centro de Estudios y de investigación en biotecnología (CIBIOT) Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia 2008 [En línea]. Disponible en: http://www.expoinnovaquimica.com/sitio/docs/memorias/posters/EVALUACION_DE_LA_PRODUCCION.pdf

HERNAEZ Laura, STASZEWSKI Mariana, JAGUS Rosa “Respuesta de *Listeria innocua* a distintos estreses luego de la aplicación de antimicrobianos naturales en suero de queso” Laboratorio de microbiología Industrial Universidad de Buenos Aires, Argentina 2007 memorias CIBIA VI,

HERRERA E. Luis, MEDINA F. Arnaldo, NARANJO L. Galo, PROAÑO B. Jaime, "Tutoría de la Investigación", Maestría en Gerencia de Proyectos Educativos y Sociales, Primera Edición, Asociación de Facultades Ecuatorianas de Filosofía y Ciencias de la Educación, AFEFCE, Quito - Ecuador, 2002, 319 pp.

INEN Normas, Normas 1528 1987-07/Queso Fresco

INEN Normas, Normas 66 1987-07/ Aditivos

IBNORCA, Norma 33008-2003/ Queso Fresco

MÁRQUEZ José G, GARCÍA Carmen E “Efecto de la nisina sobre la microflora patógena del queso blanco artesanal tipo "telita" elaborado en una quesera de Upata, Estado Bolívar, Venezuela” [en línea]. Disponible en http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562007000200010&lng=es&nrm=iso&tlng=es

MUSGRAVE Alan, “Paradigma Positivista” [En línea]. Disponible en: http://scielo.bvs-psi.org.br/scielo.php?pid=S1609-74752006000100009&script=sci_arttext&tlng=es

MARTÍNEZ f. Beatriz “Bacteriocinas de *lactococcus lactis* aislados de quesos asturianos: nisina z y lactococina 972” (Departamento de Biología Funcional) de la Universidad de Oviedo, Asturias 1996 [En línea]. Disponible en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/8416/1/bea%20tesis.pdf>

NIEVES CRUZ. Felipe (2006) “La investigación exploratoria” [En línea]. Disponible en: [http://www.gestiopolis.com/canales7/mkt/investigacion-exploratoria-y-algunos-aportes-a-la-investigacion-de-mercados.htm\(01.08.2009\)](http://www.gestiopolis.com/canales7/mkt/investigacion-exploratoria-y-algunos-aportes-a-la-investigacion-de-mercados.htm(01.08.2009))

PROQUIGA S.A. “Ficha técnica –Nisina” [En línea]. Disponible en: <http://www.proquiga.es/descarga/nisina.pdf>

RONDÓN E., PACHECO Delahaye E., ORTEGA F.” Estimación de la vida útil de un análogo comercial de mayonesa utilizando el factor de aceleración Q_{10} ” Facultad de Agronomía, Universidad Central, Venezuela 2004, [En línea]. Disponible en : http://www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S0378-78182004000100007&lng=es&nrm

SALTOS, Hector A. “Diseño Experimental” Ambato-Ecuador 1993 pp: 42-43

SANGRONIS Elba, GARCÍA Jesús, “Efecto de la adición de nisina en los parámetros físicos, químicos y sensoriales del queso “telita” [en línea].

Disponible en:

<http://bases.bireme.br/cgi-in/wxislind.exe/iah/online/?IsisScriptLILACS&lang=&indexSearch=ID>

SUMMER Baldomero Dr. “Investigación bibliográfica” Argentina-2009 [En línea].

Disponible en:

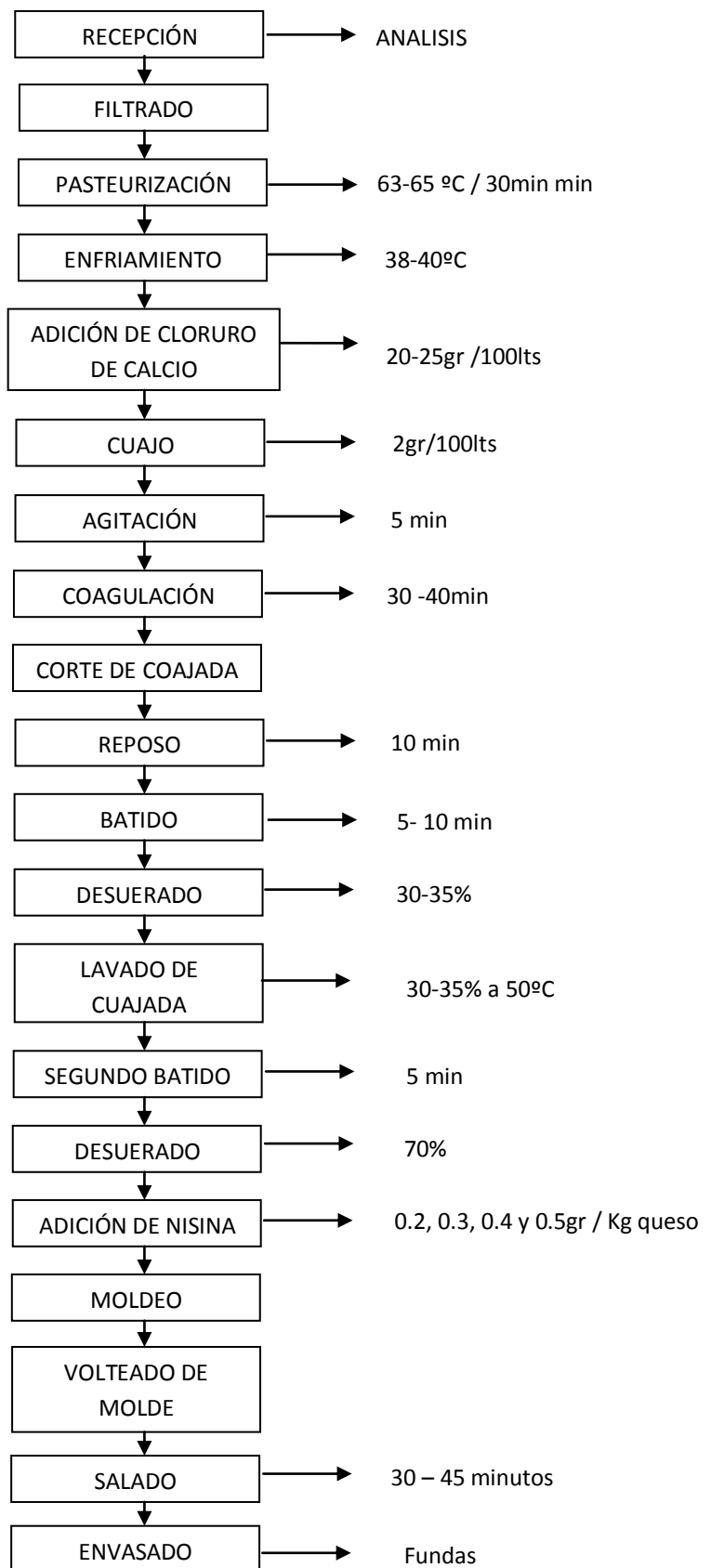
<http://www.hospitalolavarria.com.ar/Investigaci%C3%B3n%20bibliogr%C3%A1fica.htm>

Anexos

Anexo1

ANEXO 2

Diagrama de proceso de la Elaboración de queso Fresco con adición de Nisina



ANEXO Nº 3

ENCUESTA DIRIGIDA A AL PERSONAL DEL CENTRO DE ADIESTRAMIENTO LECHERO (CAL)

DATOS GENERALES

Instituto: Tecnológico Agropecuario Luis A. Martínez

Centro de Adiestramiento Lechero

Personal de Planta

Fecha:

Ocupación Desempeñada:

Nº	Preguntas	Respuestas	CÓDIGO
1	En la elaboración de Queso fresco en el Centro de Adiestramiento Lechero se utiliza algún tipo de conservante?	SI NO	1.- () 2.- ()
2	Conoce usted algún tipo de conservante para la elaboración de quesos?	SI NO Mencione el mas común?	1.- () 2.- ()
3	Ha escuchado usted acerca del uso de nisina en la elaboración de queso fresco?	SI NO	1.- () 2.- ()
4	Conoce usted la cantidad de nisina que se utiliza por Kg de queso?	SI NO	1.- () 2.- ()

GRACIAS

Anexo 4

ANEXO 5

Diagrama de Proceso de la Aplicación de nisina para incrementar el tiempo de vida útil en Queso Fresco en el Centro de Adiestramiento Lechero



Pasteurización



Mezclado



Adición de cuajo



Desuerado



Cortado de la cuajada



Agitación



Moldeado



Cortado



Análisis Físico-químico



Envasado



Análisis Microbiológico



Incubación

Siembra de
muestras



Conteo de colonias
en cajas



Análisis Sensorial (cataciones)

Anexo 1. Matriz de Analisis

Situación actual real negativa	Problema a ser investigado	Situación futura deseada positiva	Propuestas de solución
Quesos frescos con alto porcentaje de contaminación	Contaminación microbiana de queso fresco	Utilización de nisina para conservación de quesos	Mejorar la calidad del queso fresco, extender su vida útil utilizando nisina para su elaboración
Desaprovechada utilización de nisina para conservación de quesos frescos		Reemplazo de conservantes sintéticos en la elaboración de queso fresco	
Queso fresco con deficiente calidad y corto tiempo de vida útil		Queso fresco de calidad y prolongado tiempo de vida útil	
Perdida de clientes por quesos contaminados			

Elaborado por. Oscar H. López B. 2009

4.2 Cronograma

Nombre de la Actividad	Comienzo	final	Jul	Agos	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb	Mar	Abril	Mayo
1 Identificación del problema	sáb 18/07/09	sáb 18/07/09	■										
2 Desarrollo del Capitulo I	lun 20/07/09	lun 27/07/09	■	■									
3 Desarrollo del Capitulo II	sab 25/07/09	lun 10/08/09	■	■	■								
4 Desarrollo Capitulo III	sab 01/08/09	sab 08/08/09	■	■	■								
5 Desarrollo Capitulo IV	sab 08/08/09	sab 15/08/09	■	■	■								
6 Presentación del Proyecto	sab 15/08/09	sab 15/08/09	■	■	■								
7 Corrección y Aumento de Trabajo	lun 17/08/09	mier 04/11/09	■	■	■	■	■	■					
8 Presentación y Aprobación de Tema	mier 04/11/09	jue 19/11/09					■	■	■				
9 Asignación de tutor	jue 19/11/09	jue 19/11/09					■	■	■				
10 Ejecución del proyecto	jue 19/11/09	vier 20/11/09					■	■	■				
11 Recopilación de Información de nisina	lun 23/11/09	vier 27/11/09					■	■	■				
12 Pruebas de concentraciín de nisina en queso fresco	lun 30/11/09	vier 4/12/09					■	■	■				
13 Aplicación de pruebas microbiológicas	lun 7/12/09	vier 11/12/09					■	■	■				
14 Analisis de resultados	lun 14/12/09	vier 18/12/09					■	■	■				
15 Réplica de concentración de nisina en queso fresco	lun 4/01/10	vier 09/01/10						■	■	■			
16 Aplicación de pruebas microbiológicas	lun 11/01/10	vier 16/01/10						■	■	■			
17 Analisis de resultados microbiológicos	lun 18/01/09	vier 23/01/10						■	■	■			
18 Identificación de la mejor concentración	vier 23/01/10	lun 25/01/10						■	■	■			
19 Recopilación de información de analisis de vida útil en queso fresco	lun 25/01/10	jue 28/01/10						■	■	■			
20 Elaboración de queso fresco con aplicación de nisina	jue 28/01/10	vier 29/01/10						■	■	■			
21 Pruebas microbiológicas	vier 29/01/10	vier 12/02/10						■	■	■			
22 Analisis de resultados microbiológicos	lun 15/02/10	vier 19/02/10						■	■	■			
23 Analisis de vida útil	vier 19/02/10	vier 26/02/10						■	■	■			
24 Preparación de muestra para catación	lun 01/03/10	lun 08/03/10						■	■	■			
25 Cataciones de quesos	lun 08/03/10	vier 12/03/10						■	■	■			
26 Analisis de resultados catadores	lun 15/03/10	lun 22/03/10						■	■	■			
27 Elaboración de tesis	lun 22/03/10	jue 08/04/10						■	■	■			
28 Presentación de borrador a Tutor	juev 08/04/10	juev 08/04/10						■	■	■			
29 Revisión de Tesis	juev 08/04/10	juev 15/04/10						■	■	■			
30 Corrección de tesis	juev 15/04/10	lun 26/04/10						■	■	■			
31 Presentación de Tesis	lun 26/04/10	lun 26/04/10						■	■	■			
32 Evaluación de Tesis	lun 03/05/10	lun 31/05/10						■	■	■	■	■	■



PRODUCTO: Queso fresco

Sírvase efectuar la siguiente catación de QUESO FRESCO, señalando con una "X" la característica que usted considere más apropiada para describir a cada una de las muestras

Características	Muestra de Queso Fresco				
	502	315	628	136	741
COLOR					
Muy Desagradable					
Desagradable					
Ni agrada ni Desagrada					
Agradable					
Muy Agradable					

OLOR	502	315	628	136	741
Muy Desagradable					
Desagradable					
Ni agrada ni Desagrada					
Agradable					
Muy Agradable					

SABOR	502	315	628	136	741
Escala					
Muy Desagradable					
Desagradable					
Ni agrada ni Desagrada					
Agradable					
Muy Agradable					

TEXTURA	502	315	628	136	741
Muy Dura					
Dura					
Ni Dura ni suave					
Suave					
Muy Suave					

ACEPTABILIDAD	502	315	628	136	741
Muy Desagradable					
Desagradable					
Ni agrada ni Desagrada					
Agradable					
Muy Agradable					

OBSERVACIONES:

.....

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN