



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
AMBIENTALES**

**CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**ARTÍCULO CIENTÍFICO**

**“EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE  
CUAJADA ÁCIDA REFRIGERADA PARA SU USO EN LA  
AGROINDUSTRIA LÁCTEA”**

**AUTOR:** German Cornelio Chiriboga Rueda

**DIRECTOR:** Ing. Jimmy Núñez.

**ASESORES:** Dra. Lucía Yépez

Ing. Marco Lara

M Sc. Carmen Alvear

**IBARRA – ECUADOR**

**2018**

## **DATOS INFORMATIVOS**



**APELLIDOS:** Chiriboga Rueda

**NOMBRE:** German Cornelio

**C. CIUDADANÍA:** 100248642-9

**TELEFONO CELULAR:** 0998974670

**CORREO ELECTRÓNICO:** german\_c16@hotmail.com

**DIRECCIÓN:** Antigua carretera a Quito junto al parque de la Merced de Chorlavi

**AÑO:** 2018

## REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

FICAYA-UTN

FECHA: 08-03-2017

**CHIRIBOGA RUEDA GERMAN CORNELIO.** "EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE CUAJADA ÁCIDA REFRIGERADA PARA SU USO EN LA AGROINDUSTRIA LÁCTEA" / TRABAJO DE GRADO. Universidad Técnica del Norte. Carrera de Ingeniería Agroindustrial. Ibarra. EC. Marzo 2018.

**DIRECTOR:** Ing. Jimmy Núñez Pérez M Sc.

Las cuajadas ácidas como materia prima intermedia, elaboradas a partir de leche de ganado vacuno, pueden ser una clara alternativa para la elaboración de otros derivados lácteos, como son: los quesos de pasta hilada y procesados. Para lograr este propósito, se realizó un estudio de calidad microbiológica y propiedades físico-químicas durante la elaboración y almacenamiento, así como la aplicación de aditivos químicos, con el objetivo de prolongar y establecer tiempos de almacenamientos.

Ibarra 08 de marzo del 2018

.....  
Ing. Jimmy Núñez Pérez M Sc.

**DIRECTOR DE TESIS**

.....  
German Chiriboga

**AUTOR**

## UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

### EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE CUAJADA ÁCIDA REFRIGERADA PARA SU USO EN LA AGROINDUSTRIA LÁCTEA

Chiriboga Rueda Germán Cornelio  
[german\\_c16@hotmail.com](mailto:german_c16@hotmail.com)

#### RESUMEN

Las cuajadas ácidas como materia prima intermedia, elaboradas a partir de leche de ganado vacuno; pueden ser una clara alternativa para la elaboración de otros derivados lácteos, como son: los quesos de pasta hilada y procesados. Para lograr este propósito, se realizó un estudio de calidad microbiológica y propiedades físico-químicas durante la elaboración y almacenamiento, así como la aplicación de aditivos químicos, con el objetivo de prolongar y establecer tiempos de almacenamientos.

Las cuajadas ácidas evaluadas, fueron elaboradas a partir de leche acidificada con ácido cítrico y bacterias ácido lácticas (BAL), a las que se añadió aditivos químicos permitidos como: nisina, sorbato de potasio, stabilak (sistema lactoperoxidasa) y sus combinaciones, teniendo como testigo, leche sin aditivos químicos; a la que se aplicó el proceso de pasteurización. Para el recuento de microorganismos indicadores de contaminación (coliformes totales, *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras), se utilizaron métodos AOAC (Oficial Methods of Analysis), a la materia prima, producto terminado, equipos y manos de operarios que intervinieron en el proceso. A las cuajadas refrigeradas a 4 °C ( $\pm 2$ ) se les realizó un seguimiento microbiológico y fisicoquímico de humedad y pH durante los días de refrigeración; se llegó a la conclusión, que las cuajadas ácidas partiendo de leche sin pasteurizar añadida el sistema

lactoperoxidasa (Stabilak) acidificadas con ácido cítrico, mantiene un conteo microbiológico dentro de los rangos establecidos por las normas, con tiempos cercanos a los 26 días en refrigeración.

**Palabras claves:** calidad microbiológica, leche, cuajada ácida, aditivos químicos.

#### SUMMARY

The acid curds as intermediate raw material, made from bovine milk; They can be a clear alternative for the elaboration of other dairy derivatives, such as: spun and processed pasta cheeses. To achieve this purpose, a study of microbiological quality and physico-chemical properties was carried out during the elaboration and storage, as well as the application of chemical additives, with the aim of extending and establishing storage times.

The acid curds evaluated, were elaborated from milk acidified with citric acid and lactic acid bacteria (BAL), to which were added chemical additives allowed such as: nisin, sorbate of potassium, Stabilak (System lactoperoxidase) and their combinations, having as a control, milk without chemical additives; To which the pasteurization process was applied. For the count of microorganisms indicators of contamination (total coliforms, *Staphylococcus aureus*, molds and yeasts), AOAC (Oficial Methods of Analysis) methods were used, to the raw material, finished product, equipment and hands of operators who intervened in the process. The refrigerated curds at 4 °C ( $\pm$

2) were monitored with microbiological and physicochemical humidity and pH during refrigeration days; It was concluded that acid curds from unpasteurized Milk added the lactoperoxidase system (Stabilak) acidified with citric acid, maintains a microbiological count within the ranges established by standards, for times close to the 26 days with in refrigeration.

**Key words:** microbiological quality, milk, acid curd, chemical additives.

### Introducción

En la actualidad muchos consumidores demandan productos de calidad, motivo por lo cual las plantas procesadoras de lácteos han recurrido a buscar nuevas formas de frenar o inhibir el crecimiento microbiano, debido a que estos son los principales causantes de la descomposición del producto y de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's). Es por ello que en sus formulaciones añaden aditivos químicos permitidos que inhiben a microorganismos contaminantes y así presentar productos inocuos.

Según investigaciones de Castro, y otros (2009), Márquez & García, (2007), Cava, y otros, (2006); al evaluar el efecto inhibitorio del uso nisina sobre la población de *Staphylococcus aureus*, coliformes totales, *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* en queso blanco tipo "telita", que es un queso de pasta cocida elaborado con leche cruda, demostraron que las concentraciones de nisina (10 y 16 mg/kg) adicionadas al a la leche refrigerada a 8 °C ( $\pm 2$ ) ejercieron un efecto inhibitorio sobre la población de *S. aureus* entre el 90 al 99% y para la leche a temperatura ambiente (30 °C) el efecto inhibitorio sobre los *S. aureus* es un de 83%.

El sistema lactoperoxidasa (Stabilak) según la FAO/OMS (2005), es un método usado para mantener la calidad de la leche cruda, en caso de que el lugar de acopio no esté cerca de la planta procesadora o no cuente con un sistema de refrigeración. La activación de la

lactoperoxidasa tiene un efecto bacteriostático (impide que se reproduzcan) y en casos bactericida (elimina la bacteria), esto depende de la carga microbiana inicial, el tipo de contaminación microbiológica y de la temperatura de la leche cruda durante el periodo de tratamiento.

Las cuajadas y los quesos frescos que son destinados para el consumo deben cumplir con algunos prerrequisitos microbiológicos, por lo que algunos autores han establecido la cara microbiana que deben tener para que sean productos de calidad.

Según Del Rosario, Anderson, Calderón, & Pascual (2000) el recuento de carga microbiana promedio de la cuajada es de:

**Tabla 1.** Recuento de microorganismos en la cuajada (col/g).

Cuajada	
Recuento de colonias aerobias mesófilas (31 °C $\pm 1$ )	1x10 <sup>5</sup>
<i>Enterobacteriaceae</i>	1x10 <sup>2</sup>
<i>E. coli</i>	1x10 <sup>1</sup>
<i>Salmonella</i>	Ausencia
<i>St. Aureus</i>	1x10 <sup>2</sup>

Mientras que para Doyle, Beuchat, & Montville (2001), el recuento microbiano para el queso fresco es de:

**Tabla 2.** Recuento microbiano en quesos frescos (ufc/g).

Quesos fresco		
Microorganismos	Límite de buena calidad	Límite de calidad aceptable
Coliformes	1x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>3</sup>
<i>St. Aureus</i>	1x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>3</sup>

La norma ecuatoriana para quesos frescos no maduros, establece los prerrequisitos que debe un cumplir un queso para el consumidor, los valores se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.** Requisitos microbiológicos para quesos frescos no maduros.

Rangos microbiológicos (ufc/g).		
Requisitos	m	M
<i>Enterobacteriaceas</i>	2x10 <sup>2</sup>	103
<i>Escherichia coli</i>	<10	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	102
<i>Listeria monocytogenes/25g</i>	Ausencia	---
<i>Salmonella en 25 g</i>	Ausencia	---

m: índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad.

M: índice máximo permisible para identificar nivel aceptable calidad.

### OBJETIVOS

En la siguiente investigación planteó los siguientes objetivos:

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la calidad microbiológica de cuajada ácida refrigerada para su uso en la agroindustria láctea.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la calidad microbiológica de la materia prima y el producto terminado.

Determinar la carga microbiana en instalaciones, operarios y proceso de elaboración de cuajadas ácidas.

Establecer el tiempo de conservación de las cuajadas ácidas en el periodo de refrigeración.

## MARCO TEÓRICO

### Calidad de la leche

La calidad de los alimentos está asociada directamente con la inocuidad y las formas de comercialización, además se suman las características organolépticas como olor, sabor, textura y cantidad de sustancias contaminantes que pueda tener dicho alimento (FAO, 2009). Para la extracción de leche de vaca y sus derivados lácteos inocuos se debe aplicar las BPO (buenas prácticas ordeño) y las BPM (buenas prácticas de manufactura), siendo estas las herramientas que favorecen a la higiene en los procesos de elaboración de alimentos (Doyle, Beuchat, & Montville, 2001).

Las BPO están directamente relacionadas a la calidad de la leche; puesto que estas nos indican cómo llevar la higiene personal y la desinfección del área de trabajo, de tal manera que ayude a evitar su contaminación y reduzca al mínimo la posibilidad de aumentar su carga microbiana para ofrecer productos seguros y que no presenten una amenaza para la salud de las personas (FAO, 2011).

La valoración de calidad que se realiza a la leche es por el recuento total de bacterias (mesófilos aerobios totales) y se expresa en unidades formadoras de colonia por mililitro (ufc/ml), anteriormente se utilizaba la prueba de azul de metileno, aunque era de fácil aplicación no resultaba del todo precisa para evaluar la calidad higiénica de la leche. El recuento de mesófilos aerobios es un indicador de contaminación para leches

calientes. Los valores normales para mesófilos aerobios totales deben ser menor a 100.000 UFC/ml, mientras que para la leche pasteurizada está entre 40.000 y 80.000 UFC/ml.

Por otra parte las BPM se encargan de los procesos de limpieza e higiene de la planta procesadora, equipos, utensilios y personal que intervienen en los procesos de elaboración, con la finalidad de evitar la contaminación del alimento en las diferentes etapas de producción y comercialización y así obtener productos terminados inocuos y de calidad (FAO, 2011).

### Microbiología de la leche

La leche es un buen medio de cultivo para muchos microorganismos debido a su gran contenido de agua, a su pH casi neutro y su gran variedad de nutrientes disponibles como lactosa, grasa, proteína, minerales y diversos compuestos nitrogenados no proteicos (Doyle, Beuchat, & Montville, 2001).

Una leche de buena calidad microbiológica para el uso en la industria, es establecida mediante normas propias de cada país y algunas de ellas se encuentran resumidas en la tabla 4.

Tabla 4. Límites microbiológicos establecidos por normas.

Límites microbiológico para la leche cruda				
Normativas	Salmonella	AM	CT	STX
INEN 09	Ausencia	5x10 <sup>4</sup>	---	1x10 <sup>2</sup>
RTCR: 401-2006	Ausencia	---	2x10 <sup>3</sup>	5x10 <sup>2</sup>
NTP 202.001	---	1x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>3</sup>	---

AM: Aerobios mesófilos, CT: Coliformes totales, Stx: *Staphylococcus aureus*.

La norma boliviana clasifica a la leche cruda en tres grupo dependiendo del tiempo de reducción del azul de metileno.

Tabla 5. Clasificación de la leche por tiempo de reductasa.

Microbiología de la leche cruda (ufc/ml)			
TRAM	CCS	AM	BE
A (>3horas)	<5x10 <sup>5</sup>	<5x10 <sup>5</sup>	<1x10 <sup>2</sup>
B (1 – 3 horas)	<1x10 <sup>6</sup>	4x10 <sup>6</sup>	<1x10 <sup>2</sup>
C (20 – 60 min)	1x10 <sup>7</sup>	>4x10 <sup>6</sup>	<1x10 <sup>2</sup>

TRAM: tiempo de reducción del azul de metileno; AM: Aerobios mesófilos; CCS: Células somáticas; BE: Bacterias esporuladas.

## Antimicrobianos presente en la leche

Además la leche cruda contiene una serie de compuestos que tiene alguna actividad antimicrobiana, como es la lactoperoxidasa, la lactoferrina y la lisozima (Fernandes, 2008).

La lactoperoxidasa es una enzima que se encuentra en la leche, pero como tal no tiene una actividad microbiana y en presencia de peróxido de hidrógeno puede producir inhibidores microbianos (organismos gram negativos) a esto se conoce como sistema lactoperoxidasa y ayuda a extender la vida de la leche en almacenamiento (Fernandes, 2008).

La lactoferrina tiene una importante función defensiva antibacteriana y antifúngica, ya que altera la pared de los microorganismos causando su muerte. Además la lisozima actúa sobre los compuestos de la pared celular bacteriana causando lisis celular (ruptura de la barrera lipídica). Los microorganismos gram-positivos son mucho más susceptibles que los gram- negativos (Fernandes, 2008).

## Aditivos usados en la elaboración de quesos

Los conservantes se añaden durante la fabricación de los quesos con el fin de inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos (bacterias, mohos y levaduras), que puede ser causantes de muchos defectos (Fox, Guinee, Cogan, & McSweeney, 2000).

Según Pardo & Almanza (2003) los aditivos usados con más frecuencias en la elaboración de quesos son:

Tabla 6. Aditivos usados en la elaboración de quesos.

Aditivos más utilizados	
Aditivo	Uso
Sal nitrato de potasio	Previene el crecimiento de microbios productores de gas; en algunos países su uso es regulado.
Cloruro de calcio	El uso de este aditivos es reponer el calcio que pierde la leche en el proceso de pasteurización; de este depende tener una cuajada excelente.
Cultivos lácticos	Son microbios que se agregan a la leche y generan sabores, aromas y aumenta el poder de conservación y duración.
Sal	El para profundizar el sabor, le da cuerpo y controla los microbios en el producto.

## Nisina

Se usa como aditivo (aprobado por la Food and Drug Administration (FDA)) en la elaboración de productos lácteos por su poder bactericida es eficaz especialmente contra bacterias gram positivas y en particular contra las que producen esporas resistentes al calor; inhibe ciertas cepas de patógenos, tales como: *Clostridium spp.*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus hemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus stearothermophilus* y otros (Barros, 2009).

Tabla 7. Dosificación de la nisina en leche y quesos.

Aplicación de la nisina		
Producto		Adición
Leche pasteurizada	50 mg/kg	
Quesos fresco y procesados	100-250 mg/kg	

## Stabilak (Sistema lactoperoxidasa)

Se usa como un activador enzimático del sistema de lactoperoxidasa, con el propósito de mantener la calidad de la leche cruda y fresca en un tiempo que oscila entre 8 a 30 horas consecutivas posterior al ordeño a una temperatura de 20 a 34 °C. Se comporta como un bactericida de acuerdo a los microorganismos presentes, logrando un retardo en la acidificación de la leche.

## Sorbatos

El sorbato de potasio garantiza que los quesos posean una calidad uniforme y prolongada, evitando pérdidas por mohos y levaduras; su aplicación depende del tipo de queso y el tiempo que se requiera preservar, si el queso es salado en baños salinos puede incorporarse en concentraciones de 0,2 a 1%.

## Procesos de refrigeración y pasteurización de la leche.

La leche al ser un producto muy perecedero se le aplica varios procesos para alargar la vida útil y de entre ellos destacan la refrigeración y la pasteurización.

## Refrigeración

La finalidad de este proceso es mantener la calidad de la leche hasta el momento de ser utilizada, puesto que la temperatura de la leche después del ordeño (33 °C), es adecuada para el crecimiento microbiano por ello es indispensable que la leche sea refrigerada; pero en ningún caso la refrigeración mejora su calidad, sino más bien reduce la proliferación de microorganismos y

por ello prolonga su valor comercial. De igual manera la leche cruda enfriada no se debe almacenar más de 48 horas, ya que existen microorganismos que viven en temperaturas bajas y son capaces de causar sabores y olores desagradables (Revilla, 1982).

Las bacterias en temperaturas de refrigeración de 4 °C y aun menores pueden reproducirse y continuar con su crecimiento, aunque de una forma más lenta; además intervienen otros factores como la limpieza del ambiente y utensilios (Magariños, 2000).

**Tabla 8.** Efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano en la leche cruda.

Efecto de la temperatura en la multiplicación microbiana en la leche cruda producida en diferentes condiciones					
Condiciones de producción	Temp. Almacén °C	Recuentos totales de bacterias por ml			
		Fresco	24 h	48 h	72 h
Vacas, medio ambiente y utensilios limpios	4,4	4295	4138	4566	8427
	10	4295	13691	127727	5725277
	15,5	4295	1587333	33001111	326500000
Vacas limpias, medio ambiente y utensilios sucios	4,4	39082	68028	121864	186254
	10	39082	177437	831615	1761458
	15,5	39082	4461111	99120000	633375000
Vacas, medio ambiente y utensilios sucios	4,4	136533	281546	538775	749030
	10	136533	1170540	13662115	25687541
	15,5	136533	246735671	636884615	3407083333

### Pasteurización

La leche después de la recepción pasa al proceso de pasteurización el cual es encargado de destruir los microorganismos patógenos que más pueda; sin alterar en forma considerable su composición, sabor, ni valor alimenticio. La temperatura de la pasteurización está íntimamente ligada con el tiempo de exposición y ambas están determinadas por la temperatura y el tiempo necesario para la destrucción de microorganismos patógenos más resistentes (Revilla, 1982).

En el caso de la leche, originalmente se tomó como base la destrucción del *Mycobacterium tuberculosis* que requiere 60 °C de temperatura por espacio de 15 a 20 minutos, y sin embargo en la práctica se exige 61 °C por 30 min, con el objeto de contar con un margen de seguridad.

El factor limitante para el uso de la pasteurización es la actuación sobre las

características organolépticas y nutricionales de los alimentos a tratar. La elección de la temperatura y el tiempo de tratamiento vendrá condicionada por la preservación de la composición inicial de los alimentos; en el caso de la leche impedir la desnaturalización de las proteínas (Casp & Abril, 2003). Generalmente se puede usar dos tipos de sistemas de pasteurización:

- Baja temperatura durante un tiempo largo (LTLT: low temperatura - long time) se eleva la temperatura 63 °C y se expone durante 30 minutos, se usa en la leche para mantener su proteínas y destruir el bacilo tuberculoso sin que cause alteraciones.
- Alta temperatura durante tiempo corto (HTST: high temperatura – short time) se expone al producto a 75 °C durante 15 – 20 segundos; en este las propiedades de los productos se ven muy pocos afectados.

### Fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina es un enzima presente en la leche cruda, cuya característica principal, desde el punto de vista analítico, es que tiene una resistencia al calor ligeramente superior a la de las bacterias patógenas que puedan encontrarse en la leche, es decir, es destruida al aplicar el tratamiento térmico de la pasterización. Esta importante propiedad hace posible el control de la pasterización (alta o baja) cualquiera que sea el procedimiento utilizado (Gerber, 1994).

Según Revilla (1982), la fosfatasa alcalina es inactiva por la pasteurización y por ello se usa como base para la prueba de evaluación de la pasteurización de la leche de vaca.

### Contaminación de los alimentos

Todas las personas que tienen contacto con los productos lácteos durante la elaboración, almacenamiento y distribución deben tener conocimientos sobre los riesgos de contaminación que afectan la calidad e inocuidad del producto.

Según Pino et al. (2011) , los alimentos se pueden contaminar de manera directa o indirecta. Las fuentes de contaminación son:

- Contaminación física
- Contaminación química
- Contaminación biológica.

### Especificaciones microbiológicas en superficies vivas e inertes

Las superficies vivas e inertes que están en contacto directo con el alimento deben tener como límites microbiológicos los siguientes (Bravo, 2012):

- Superficies vivas. Cuenta total de mesófilos aerobios  $\leq 3000$  ufc/cm<sup>2</sup>; coliformes totales  $\leq 10$  ufc/cm<sup>2</sup>.
- Superficies inertes: Cuenta total de mesófilos aerobios  $\leq 400$  ufc/cm<sup>2</sup>; coliformes totales  $\leq 200$  ufc/cm<sup>2</sup>.

### Proteolisis en los quesos

Se produce en los queso durante la maduración, y es la responsable de cambios en la textura, elasticidad, dureza, entre otros; contribuye en dar sabor al queso, pero en ocasiones si los pequeños péptidos son amargos y en concentraciones suficientes puede causar amargura, que es un defecto común en los quesos (Fox, Guinee, Cogan, & McSweeney, 2000).

### Lipolisis en los quesos

Se considera indeseable en la mayoría de variedades de quesos debido al gran contenido de ácidos libres (Fox, Guinee, Cogan, & McSweeney, 2000). La lipólisis en los quesos se debe a la presencia de enzimas lipolíticas que degradan los ácidos grasos en ácidos grasos libres, y estos se encargan de dar sabores (Salles, y otros, 2002).

### METODOLOGÍA

Los seguimientos microbiológicos se realizaron a 7 tipos de cuajadas ácidas, que se diferencian entre sí por el método de acidificación y el uso de las combinaciones de los aditivos químicos. Los tratamientos se nombran de la siguiente manera:

T1: cuajada ácida elaborada con leche sin pasteurizar acidificada con ácido cítrico y añadida la combinación de nisina más sorbato de potasio.

T2: cuajada ácida elaborada con leche sin pasteurizar acidificada con ácido cítrico y

añadida la combinación de stabilak (sistema lactoperoxidasa) más sorbato de potasio.

T3: cuajada ácida elaborada con leche sin pasteurizar acidificada con ácido cítrico, sin añadir las combinaciones de aditivos químicos.

T4: cuajada ácida elaborada con leche pasteurizada acidificada con ácido cítrico, sin añadir las combinaciones de aditivos químicos.

T5: cuajada ácida elaborada con leche sin pasteurizar acidificada con bacterias ácido lácticas (BAL) y añadida la combinación de nisina más sorbato de potasio.

T6: cuajada ácida elaborada con leche sin pasteurizar acidificada con bacterias ácido lácticas (BAL) y añadida la combinación de stabilak (sistema lactoperoxidasa) más sorbato de potasio.

T7: cuajada ácida elaborada con leche sin pasteurizar acidificada con bacterias ácido lácticas (BAL) y sin añadir las combinaciones de aditivos químicos.

### Evaluación de la calidad microbiológica de la materia prima y el producto terminado.

Para la calidad microbiológica de la materia prima (leche) y el producto terminado (cuajada ácida) se utilizó las normas: INEN 09, detallan en la tabla 9:

**Tabla 9.** Análisis microbiológicos de la materia prima y producto terminado.

Análisis microbiológicos	Método	Unidad
Coliformes totales	AOAC 986.33	UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	AOAC 2003.08	UFC/g
Mohos y levaduras *	AOAC 997.02	UFC/g

\* Prueba realizada al producto terminado.

### DETERMINACIÓN DE LA CARGA MICROBIANA EN INSTALACIONES, OPERARIOS Y PROCESO DE ELABORACIÓN DE CUAJADAS ÁCIDAS.

Se realizó el método de hisopado en las superficies vivas (manos de operarios) y superficies inertes (marmitas y mesas) que intervinieron en el proceso de elaboración de la cuajada ácida. Los métodos usados se muestran en la tabla 10:

**Tabla 10.** Análisis microbiológicos de superficies vivas e inertes

Análisis microbiológicos	Método	Unidad
Coliformes totales	AOAC 986.33	UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	AOAC 2003.08	UFC/g
Mohos y levaduras	AOAC 997.02	UFC/g

### DETERMINAR EL TIEMPO DE CONSERVACIÓN DE LAS CUAJADAS ÁCIDAS EN EL PERIODO REFRIGERACIÓN.

Se realizó análisis fisicoquímicos y microbiológicos en los días de almacenamiento en frío, los métodos a usarse se detallan en la tabla 11:

**Tabla 11.** Análisis fisicoquímicos y microbiológicos de la cuajada ácida.

Análisis	Método	Unidad
<b>Análisis fisicoquímicos</b>		
pH	NTE INEN 389	Adimensional
Humedad	AOAC 930.15	Porcentaje
Temperatura	Dilatación del líquido	°C
<b>Análisis microbiológicos</b>		
Coliformes totales	AOAC 986.33	UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	AOAC 2003.08	UFC/g
Mohos y levaduras	AOAC 997.02	UFC/g

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

A la leche cruda y a la cuajada se les realizó los análisis microbiológicos al momento de la recepción de la materia prima y al producto terminado al final de su proceso elaboración con el fin de conocer la carga microbiana con la cual se inicia el proceso de elaboración, y almacenaje en refrigeración.

Los resultados microbiológicos obtenidos de la leche cruda se les compararon con la norma INEN 09 y el reglamento técnico RTCR: 401, los resultados obtenidos se encuentran por debajo de los rangos permitidos en cuanto a los tres tipos de microorganismos evaluados.

**Tabla 12.** Resultados microbiológicos de la materia prima (leche cruda).

Resultados microbiológicos de la materia prima (UFC/ml)				
	Salmonella	AM	CT	Stx
<b>Materia prima</b>				
Leche cruda	Ausencia	2.63x10 <sup>4</sup>	1.35x10 <sup>3</sup>	8.7x10 <sup>1</sup>
<b>Normativas</b>				
INEN 09	Ausencia	5x10 <sup>4</sup>	---	1x10 <sup>2</sup>
RTCR: 401	Ausencia	---	2x10 <sup>3</sup>	5x10 <sup>2</sup>

AM: Aerobios mesófilos, CT: Coliformes totales, Stx: *Staphylococcus aureus*.

Los resultados microbiológicos obtenidos de la cuajada ácida se encuentran dentro de los rangos establecidos por la norma INEN 1528, además se usó las normas NOM-121-SSA1 y COVENIN 3822 debido que las normas Oficiales ecuatorianas no contemplan referencia alguna sobre los límites microbiológicos (coliformes totales, mohos y levaduras), sin embargo por efectos prácticos, dichos resultados se compararon con las normas antes mencionadas.

**Tabla 13.** Resultados microbiológicos del producto terminado (cuajada ácida).

Resultados microbiológicos del producto terminado (UFC/g) - tiempo (0 días)				
		CT	Stx	Mohos y Levaduras
	INEN 1528	---	100	---
	COVENIN 3822	1100	1000	1000
	NOM-121-SSA1	100	1000	500
<b>Tratamientos</b>				
1	T1	0	0	1
2	T2	4	0	0
3	T3	450	750	650
4	T4	300	0	100
5	T5	150	200	100
6	T6	100	67	84
7	T7	67	43	1

CT: Coliformes totales; Stx: *Staphylococcus aureus*.

Durante las etapas de elaboración de las cuajadas se realizaron controles de microbiológicos con el fin de descartar una contaminación por manipulación (Cárdenas, 2009).

Se realizó análisis microbiológicos a equipos y manos de operarios que intervinieron en el proceso de elaboración, los resultados obtenidos se presentan en la tabla 14:

**Tabla 14.** Resultados de análisis microbiológicos de equipos y manos de operarios.

Análisis	Recuento		
	CT	Stx	Mohos y levaduras
Manos operario 1	0.1	0.1	0.1
Manos operario 2	0.1	0.1	0.1
Manos operario 3	0.1	0.1	0.1
Manos operario 4	0.1	0.1	0.1
Manos operario 5	0.1	0.1	0.1
Marmita	0.1	0.1	0.1
Tanque recepción	0.1	0.1	0.1
Mesa 1	0.1	0.1	0.1
Mesa 2	0.1	0.1	0.1

CT: Coliformes totales; Stx: *Staphylococcus aureus*

Los resultados se mantienen por debajo de los límites permisibles ( $0.1 \text{ ufc/cm}^2$ ) según la guía técnica para el análisis microbiológico de superficies en contacto con alimentos y bebidas (Ministerio de Salud del Perú, MINSA, 2007) por lo que la aplicación de los procedimientos de las BPM, limpieza y desinfección son eficaces.

#### **Determinación del tiempo de conservación de las cuajadas ácidas en refrigeración**

Para establecer tiempos de conservación, se tienen en cuenta tanto la calidad microbiológica del producto, como las características de pH y humedad, las cuales deben garantizar un producto de calidad.

Se realizó un monitoreo de las propiedades fisicoquímicas (humedad y pH) y microbiológicas durante el almacenamiento a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , para verificar el comportamiento en las distintas alternativas planteadas.

#### **Resultados microbiológicos de las cuajadas ácidas.**

##### **Cuajadas ácidas elaboradas con ácido cítrico**

Para determinar los tiempos de almacenamiento en las cuajadas, se tiene como referencia la norma INEN 082 para queso mozzarella y las normas NOM-121-SSA1 y COVENIN 3822 para coliformes totales, mohos y levaduras, debido que la norma ecuatoriana no contempla referencia.

Para mejor interpretación de los resultados y sus análisis se dividieron en dos grupos: los resultados obtenidos en las cuajadas acidificadas con ácido cítrico se encuentran en la Tabla 16 y los obtenidos a partir cuajadas acidificadas con BAL en la Tabla 17.

**Tabla 17.** Recuento de  $\log(\bar{x} \pm SD)$  de grupos microbianos durante el almacenamiento de las cuajadas acidificadas con ácido cítrico.

Cujajadas acidificadas con ácido cítrico												
M-L				STX				CT				
T4	T3	T2	T1	T4	T3	T2	T1	T4	T3	T2	T1	M/O
2,00±0,00	2,81±0,05	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	2,87±0,04	0,00±0,00	0,00±0,00	0,65±0,07	2,65±0,07	0,05±0,08	0,00±0,00	0
2,54±0,09	3,15±0,04	2,00±0,00	0,24±0,04	1,14±0,13	3,13±0,07	0,30±0,43	0,00±0,00	1,10±0,12	2,95±0,00	1,09±0,07	0,39±0,05	5
2,65±0,07	3,35±0,01	2,00±0,00	0,99±0,12	1,55±0,07	3,53±0,08	1,11±0,10	0,52±0,04	1,69±0,02	3,90±0,04	1,64±0,02	1,00±0,07	10
2,65±0,07	***	2,15±0,21	1,54±0,01	1,81±0,03	***	1,35±0,07	1,54±0,05	2,15±0,21	***	2,00±0,00	1,54±0,06	14
2,78±0,00	***	2,39±0,12	2,00±0,00	2,00±0,00	***	2,00±0,00	2,00±0,00	2,65±0,07	***	2,00±0,00	1,77±0,03	17
2,81±0,05	***	2,45±0,21	2,39±0,12	2,00±0,00	***	2,00±0,00	2,00±0,00	2,84±0,09	***	2,30±0,00	2,24±0,03	20
2,87±0,04	***	2,65±0,07	2,60±0,00	2,00±0,00	***	2,00±0,00	2,00±0,00	2,98±0,03	***	2,30±0,00	2,30±0,04	22
2,95±0,07	***	2,72±0,17	2,60±0,00	2,00±0,00	***	2,00±0,00	2,00±0,00	3,36±0,05	***	2,72±0,17	2,50±0,02	24
***	***	2,87±0,04	2,78±0,00	***	***	2,39±0,12	2,39±0,12	***	***	2,87±0,04	2,75±0,02	26
	1000 3,00				100 2,00				1100 3,04			Limite máx. norma

\*\*\* Valores fuera de rango de la norma; CT: coliformes totales; STX: *S. aureus*; M-L: mohos y levaduras.

Tabla 1815. Recuento de  $\log(\bar{x} \pm SD)$  de grupos microbianos durante el almacenamiento de las cuajadas acidificadas con BAL.

Cujajadas acidificadas con Bacterias ácido lácticas												
M-L				STX				CT				
T7	T6	T5	T4	T7	T6	T5	T4	T7	T6	T5	T4	M/O
0,15±0,21	1,92±0,12	2,00±0,00	0,63±0,00	0,77±0,33	0,77±0,33	1,30±0,00	1,77±0,33	2,00±0,00	2,00±0,00	2,15±0,21	2,15±0,21	0
0,71±0,57	2,30±0,00	2,30±0,00	1,00±0,00	1,15±0,21	1,15±0,21	1,39±0,12	2,15±0,21	2,30±0,00	2,30±0,00	2,30±0,00	2,30±0,00	5
1,60±0,56	2,74±0,06	2,81±0,05	1,15±0,21	1,39±0,12	1,39±0,12	1,50±0,28	2,48±0,00	2,65±0,07	2,65±0,07	2,54±0,09	2,54±0,09	10
2,35±0,49	2,93±0,04	2,93±0,04	1,30±0,00	1,84±0,09	1,84±0,09	1,66±0,26	2,81±0,05	2,77±0,10	2,77±0,10	2,77±0,10	2,77±0,10	14
2,72±0,17	3,06±0,08	3,11±0,10	1,74±0,06	1,95±0,00	1,95±0,00	1,92±0,11	2,98±0,03	2,95±0,07	2,95±0,07	2,93±0,04	2,93±0,04	17
2,90±0,08	3,18±0,00	3,75±0,01	1,84±0,09	2,04±0,00	2,04±0,00	2,20±0,04	3,06±0,03	3,38±0,03	3,38±0,03	3,65±0,01	3,65±0,01	20
	1000 3,00				100 2,00				1100 3,04			Limite Máx. (UFC/g) log <sub>10</sub> UFC/g

CT: coliformes totales; STX: *S. aureus*; M-L: mohos y levaduras

En la Tabla 17 se evidencia que los tratamientos donde se utilizaron aditivos químicos, logran alcanzar los mayores tiempos de almacenamiento; en el tratamiento T1 se añadió nisina en su elaboración se logró alcanzar valores cercanos de 26 días de almacenamiento. Estos resultados fueron similares a las investigaciones de Rita Cava et al. (2006), se utilizó nisina en la elaboración de un queso telita (queso de pasta hilada), obteniendo quesos que llegaron a ser almacenados durante 28 días.

En el tratamiento que se añadió el sistema lactoperoxidasa (Stabilak) (T2) presenta tiempos de almacenamiento similares al T1 cercanos a los 26 días, demostrándose el poder bacteriostático del mismo. En estudios realizados por la FAO/OMS (2005), Ponce (2007), el sistema lactoperoxidasa (Stabilak), tiene un efecto bacteriostático y en algunos casos bactericida. Esto depende de la carga microbiana inicial, el tipo de contaminación microbiológica y de la temperatura de la leche cruda durante el período de tratamiento. Estudios similares en queso mozzarella los realizó Arciniega (2010), el cual plantea que no solo se logró controlar los niveles de microbiología, sino que en algunos casos disminuyó.

En la Tabla 18 el tratamiento (T7), logró alcanzar un tiempo de almacenamiento cercano a los 20 días. Este tiempo está relacionado con la adición de suero fermentado, el cual brinda ciertas cualidades a los alimentos de protegerlos contra microorganismos dañinos. Resultados similares concuerdan con los obtenidos por Aguilar-Uscanga et al. (2006) donde señala que se modificaron la textura y el sabor en quesos Oaxaca (tipo de queso fresco) después de 9 días y el tiempo de vida útil es de 15 a 20 días.

## RESULTADOS FISICOQUÍMICOS DE LAS CUAJADAS ÁCIDAS.

El pH y humedad son propiedades fisicoquímicas que se tienen en cuenta para determinar la calidad y categorías de los quesos, debido a que, en determinados valores afecta a la funcionalidad del producto, por ejemplo el rango de pH de 5,2 a 5,6 es favorable para la elaboración del queso

mozzarella (Ramírez, 2010). Al igual que la FDA (Food and Drug Administration), para los quesos mozzarella se establece cuatro categorías de mozzarella (Codex Alimentarius, 2007), según el contenido de humedad y grasa.

### Monitoreo del pH en las cuajadas ácidas.

A las cuajadas se les realizó mediciones de pH durante el almacenamiento, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 19. Tomando como antecedentes el trabajo de Feeney, Guinee, y Fox (2002), se decidió lavar las cuajadas antes de su almacenamiento para estabilizar los valores de pH en valores entre 5,5 y 5,8 lo cual permitió la disminución de la proteólisis primaria de los quesos.

**Tabla 19.** Cinética de pH en las cuajadas durante su almacenamiento en refrigeración a 4 °C.

Tratamiento	Días de almacenamiento								
	0	5	10	14	17	20	22	24	26
T1	5,83	5,73	5,63	5,61	5,59	5,51	5,36	5,32	5,28
T2	5,83	5,74	5,64	5,63	5,61	5,53	5,38	5,34	5,3
T3	5,74	5,48	5,22	5,18	5,14	4,94	4,83	4,80	4,77
T4	5,85	5,76	5,67	5,64	5,60	5,43	5,27	5,23	5,19
T5	5,52	5,49	5,46	5,44	5,42	5,33	***	***	***
T6	5,61	5,59	5,57	5,56	5,54	5,47	***	***	***
T7	5,50	5,48	5,45	5,45	5,44	5,42	***	***	***

\*\*\* Días fuera de rango en microbiología

Los valores de pH de las cuajadas inician entre 5,5-5,8. Las cuajadas acidificadas con la adición de BAL registraron un valor de 5,5 al iniciar el almacenamiento y presentaron menor disminución en este parámetro, comparadas con las acidificadas con ácido cítrico que iniciaron en 5,8 esto probablemente es debido a la actividad bioquímica de la alta población microbiana en la cuajada, los dos tipos de acidificación continuaron disminuyendo los valores de pH durante su almacenamiento, hasta los valores permitidos por microbiología, manteniéndose dentro de los rangos estudiados por Feeney y Fox (2002), excepto el T3 que se obtuvieron valores de pH de 4,7 los cuales fueron rechazados por presentar una elevada proteólisis, provocada por la hidrólisis de la proteína láctea, evidenciada por la pérdida de firmeza al tacto. Corroborando lo descrito por Guinee (2002). Otros estudios plantean que

para la cuajada obtenida de la elaboración convencional de quesos de pasta hilada se tiene como resultado en un rango de pH entre 5,3 a 5,1 donde todavía se puede obtener un queso firme. Cabe recalcar que valores de pH por debajo de 7 la nisina pierde entre un 20 y 45 % de su actividad según Rita Cava et al. (2006).

### Monitoreo de la humedad de las cuajadas ácidas.

Otro de los parámetros que se mide en la calidad de los quesos es la humedad, para hacer el seguimiento del mismo se realizaron mediciones durante su almacenamiento en refrigeración, los valores se detallan en la Tabla 20. Los valores reportados de humedad como óptimos son entre 45% a 50% (Codex Alimentarius, 2007).

**Tabla 20.** Cinética de humedad de las cuajadas durante su almacenamiento en refrigeración.

Tratamientos	Días de almacenamiento								
	0	5	10	14	17	20	22	24	26
T1	50,29	48,81	47,33	47,03	46,62	44,97	43,66	43,33	43,00
T2	53,66	51,31	48,96	48,78	48,55	47,58	46,15	45,79	45,43
T3	50,33	49,12	47,90	47,61	47,22	45,64	43,22	42,62	42,01
T4	50,66	49,34	48,01	47,90	47,76	47,19	45,06	44,53	44,00
T5	46,29	45,97	45,65	45,43	45,13	43,90	***	***	***
T6	45,52	44,715	43,91	43,80	43,57	42,80	***	***	***
T7	47,89	47,23	46,56	46,37	46,12	45,10	***	***	***

\*\*\* Valores fuera de rango en microbiología

En los dos tipos de acidificaciones para la obtención de cuajadas, se evidencia diferencias en este parámetro. Los tratamientos en los que se acidificó con la adición de BAL en el día 0 tienen valores más bajos y presentan menor disminución con un aproximado del 3% donde el T7 se mantiene dentro de los rangos establecidos por un periodo de 20 días. Para las acidificadas con ácido cítrico comienzan con valores mayores de humedad y presentan una disminución entre un 8-7 %, manteniéndose dentro del rango especificado durante 26 días el tratamiento T2. Los valores de humedad influyen directamente con los valores de pH debido a una mayor concentración de ácido láctico, ya que una disminución en la humedad está relacionado con la liberación de suero

provocando la deshidratación y a su vez provoca el aumento de los sólidos solubles y los valores de materia grasas, de acuerdo con Dave, Oberg y McMahon (2003) un alto contenido de grasa en los queso promueve la hidrólisis de la proteína láctea acelerando el proceso de proteólisis.

### CONCLUSIONES

Los valores de los recuentos microbiológicos de la leche cruda para aerobios mesófilos, coliformes totales y *Staphylococcus aureus*, indican que se encuentran dentro de los límites aceptables determinados por las normas INEN 009 y el RTCR: 401; lo que garantiza la calidad de la cuajada.

Los procesos de limpieza y desinfección de equipos y operarios cumplieron con los parámetros establecidos por la guía técnica peruana para el análisis microbiológico de superficies en contacto con alimentos y bebidas (2007).

La leche sin pasteurizar acidificada con ácido cítrico y con aditivos químicos brinda un producto estable en refrigeración por periodos de 25 días, a diferencia de las acidificadas añadidas BAL que tienen un tiempo de conservación de 20 días.

Valores de pH menores de 5,1, humedad por debajo de 45% y la contaminación microbiológica en las cuajadas, aceleran el proceso de proteólisis y lipólisis afectando sus características organolépticas.

### RECOMENDACIONES

Es necesario realizar un estudio con la combinación del sistema lactoperoxidasa (Stabilak) y pasteurización como tratamiento térmico para alargar el tiempo de conservación de las cuajadas ácidas.

Hacer un seguimiento de microorganismos psicrófilos en el almacenamiento, así como de aumento en el contenido de grasa durante el almacenamiento de las cuajadas ácidas puesto que estos intervienen en los procesos de proteólisis y lipólisis.

## BIBLIOGRAFÍA

Badui Dergal, S. (2012). *La ciencia de los alimentos en la práctica*. Naucalpan: Pearson Educación de México S.A.

Barros, C. (2009). *Los aditivos en la alimentación de los españoles y la legislación que regula su autorización y uso*. Madrid: Visión Libros.

Bravo Martínez, F. (2004). *El manejo higiénico de los alimentos: guía para la obtención del distintivo*. México D.F.: Limusa S.A.

Bravo, F. (2012). *El manejo higiénico de los alimentos: acorde con la NOM-251-SSA1 2010*. México: Limusa.

Campos, M., & Sabsay, C. (2008). *Seguridad e Higiene en la manipulación de alimentos*. Madrid: Ciclos Formativos.

Cárdenas, F. (2009). *Desarrollo de un plan de implementación de buenas prácticas de manufactura en la Industria de Pastificio*. Quito: QUITO/ EPN/ 2009.

Casp, A., & Abril, J. (2003). *Tecnología de alimentos: procesos de conservación de alimentos*. Madrid: Mundi-Prensa Libros S.A.

Castro, G., Valbuena, E., Bríñez, W., Sánchez, E., Vera, H., & Tovar, A. (2009). Comparación del empleo de nisina y cultivos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* para la biopreservación de queso blando. *Revista Científica*, 201-123.

Cava, R., Sangronis, E., Lucci, E., & Woyzechowsky, L. (2006). Efecto de la adición de nisina en queso fresco "telita" sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus*. *Anales Venezolanos de Nutrición*, 69 - 73.

Del Rosario, M., Anderson, P., Calderon, V., & Pascual, J. (2000). *Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas*. Madrid: Diaz de Santos.

Doyle, M., Beuchat, L., & Montville, T. (2001). *Microbiología de los alimentos fundamentos y fronteras*. España: Acribia S.A.

FAO. (2009). *Protocolo de calidad para el orégano argentino*. Argentina.

FAO. (2011). *Manual 1: Buenas prácticas de ordeño*. Ciudad de Guatemala: Guatemala C.A.

FAO. (2011). *Manual 2: Buenas prácticas de manufactura en la elaboración de productos lácteos*. Ciudad de Guatemala: Guatemala C.A.

FAO/OMS. (2005). *Beneficios y riesgos potenciales del sistema de la lactoperoxidasa en la conservación de la leche cruda*. Roma, Italia.

Fernandes. (2008). *Microbiology Handbook. Dairy products*. Leatherhead Publishing.

Fox, P., Guinee, T., Cogan, T., & McSweeney, P. (2000). *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg, Maryland: Aspen Publisher, Inc.

García Rojas, C. E., & Márquez, J. G. (2007). Efecto de la nisina sobre la microflora patógena del queso blanco artesanal tipo "telita" elaborado en una quesera de Upata, Estado Bolívar, Venezuela. *Sociedad Venezolana de Microbiología*, 108-111.

Gerber, N. (1994). *Tratado práctico de los análisis de la leche y el control de productos lácteos*. Madrid: Dossat.

Guzmán, K. (2013). La industria láctea en Valledupar: primera en la región del Caribe. *Scielo*, 93-100.

Magariños, H. (2000). *Producción higiénica de la leche cruda. Guía para la pequeña y mediana empresa*. Guatemala: Producción y Servicios Incorporados S.A.

Márquez, J. G., & García, C. E. (2007). Efecto de la nisina sobre la microflora patógena del queso blanco artesanal tipo "telita" elaborado en una quesera de Upata. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 1008-11.

Ministerio de Salud del Perú, MINSA. (2007). *Guía Técnica para el Análisis Microbiológico de superficies en contacto con alimentos y bebidas*.

NTE INEN 09. (2012). *Leche cruda. Requisitos*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización.

NTE INEN 1528. (2012). *Norma general para quesos frescos no maduros. Requisitos*. Quito: Instituto Ecuatoriano de Normalización.

Pardo, M. E., & Almanza, F. (2003). *Guía de procesos para la elaboración de productos lácteos*. Bogotá: Convenio Andrés Bello.

Revilla, A. (1982). *Tecnología de la leche. procesamiento, manufactura y análisis*. Tegucigalpa.

RTCR: 401. (2006). *Norma Oficial para la Leche Cruda y Leche Higienizada. Especificaciones*. San José - Costa Rica: La Gaceta.

Salles, C., Sommerer, C., Septier, S., Issanchou, C., Chabanet, A., Garem, A., & Le Quéré, J.-L. (2002). Goat cheese flavor: Sensory evaluation of branched-chain fatty acids and small peptides. *J. Food Sci.*, 67: 835-841 .