

**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**  
**Campus Tuxtepec**

**Ingeniería en Alimentos**



**Tesis**

Evaluación microbiológica del queso de hebra (pasta hilada) empleando un recubrimiento tipo empaque con nisina inmovilizada

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**Ingeniero en Alimentos**

**Presenta**

Azucena Gaytán Agama

**Directora**

Dra. Cynthia Magaly Antonio Cisneros

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México. Septiembre 2024



**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN  
CAMPUS TUXTEPEC**

**INGENIERIA EN ALIMENTOS**


**ACTA DE REVISIÓN DE TESIS**


En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 27 de agosto del 2024, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la jefatura de carrera de la licenciatura en Ingeniería en Alimentos decidieron examinar la tesis titulada “**Evaluación antimicrobiana del queso de hebra (pasta hilada) empleando un recubrimiento tipo empaque con nisina inmovilizada**” presentada por la egresada C. Azucena Gaytán Agama, aspirante al título de Licenciatura.

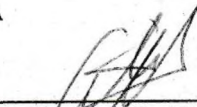
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que la aspirante proceda con el proceso de titulación.

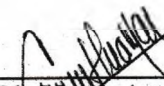
Tuxtepec, Oaxaca. A 12 de Julio del 2024

Atentamente  
LA COMISIÓN REVISORA

  
M. en C. Fernando Zapot Hazas  
Profesor Investigador  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de tesis

  
M. en C. José Daniel Rodríguez Ortiz  
Profesor Investigador  
Revisor de tesis

  
Dra. Xochil Avila Alejandro  
Profesora Investigadora  
Universidad del Papaloapan  
Revisor de tesis

  
Dra. Cynthia Magaly Antonio Cisneros  
Profesora Investigadora  
Universidad del Papaloapan  
Director de tesis

Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec. Circuito Central No. 200. Colonia Parque Industrial.  
Cp 68301, Tuxtepec, Oax. Tel 01287 8759240. [www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN  
CAMPUS TUXTEPEC

INGENIERIA EN ALIMENTOS

Tuxtepec, Oax. 27 de Agosto del 2024

Oficio No.	JCIA/025/2024
Asunto	Autorización de impresión de tesis

**C. Azucena Gaytán Agama**  
Egresada de la carrera Ingeniería en Alimentos  
Universidad del Papaloapan  
Presente

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis titulado: "Evaluación antimicrobiana del queso de hebra (pasta hilada) empleando un recubrimiento tipo empaque con bacteriocina inmovilizada" para obtener el título de Licenciado en Ingeniería en Alimentos.

Por lo anterior y de acuerdo al reglamento institucional, se le da trámite legal para que proceda a la impresión del trabajo presentado.

El jurado del examen profesional esta compuesto por los siguientes profesores investigadores:

**Dr. Miguel Ángel García Muñoz** (Universidad del Papaloapan-Ingeniería en Alimentos)  
**M. en C. Fernando Zapot Hazas** (Universidad del Papaloapan-Ingeniería en Alimentos)  
**Dra. Xóchil Avila Alejandré** (Universidad del Papaloapan-Ingeniería en Biotecnología)  
**Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo** (Universidad del Papaloapan-Ingeniería en Alimentos)  
**Dr. José Daniel Rodríguez Ortiz** (Universidad del Papaloapan-Ingeniería en Alimentos)

Sin más por el momento, le agradezco el apoyo. Reciba un saludo cordial.

Atentamente  
*Terra uberrima, mens aperta*  
*Bœu Lo-tama, chi jí jú*

  
Vo. Bo. M. en C. Héctor López Arjón  
Vice Rector Académico



VICE-RECTORIA  
ACADEMICA

cop. Egresada, para su conocimiento  
cop. Dra. Cynthia Magaly Antonio Cisneros. Directora de tesis, para su conocimiento  
cop. Archivo

Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec. Circuito Central No. 200. Colonia Parque Industrial.  
Cp 68301, Tuxtepec, Oax. Tel 01287 8759240. [www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

El presente trabajo no ha sido empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de la investigación del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la Universidad del Papaloapan para la reproducción del documento con el fin de intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec y al Instituto de Biotecnología por la disponibilidad para registrar dicha tesis en el marco del proyecto interno de investigación: Evaluación antimicrobiana y antioxidante de bacteriocinas soportadas sobre biopelículas de caseína con número de registro 09/2021/UNPA-IBT

## DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido culminar esta etapa, a mi familia que siempre estuvo en cada dificultad que se presentaba, a mi madre que es mi ejemplo a seguir por lo valiente y perseverante que es, durante todo este tiempo siempre me apoyó de manera incondicional, estuvo para mí en las buenas y en las malas, sin ella no me hubiese sido posible seguir adelante.

A mis amigos, por hacer de estos cinco años los mejores, por todos los momentos tristes y felices que pasamos juntos, la semana pesada de exámenes, convivios, viajes y anécdotas compartidas. Con mención especial a Fátima, gracias por tu compañía estos últimos años, por no hacerme sentir mal cuando me explicabas un tema que no terminaba de entender con esa paciencia y dedicación que te caracteriza, por estar conmigo en los días buenos y malos, por las risas y lágrimas compartidas, una de las mejores cosas que me dejó la universidad es tu amistad, gracias por todo.

A Dago que a pesar de haberte conocido en mis últimos semestres te volviste alguien muy especial e importante, gracias por las comidas que compartiste conmigo, por las risas compartidas que para nada eran escandalosas, de verdad gracias por todo.

A mi directora de tesis, la Dra. Cynthia, por tomarse el tiempo de aceptarme como su tesista, por su paciencia y perseverancia en todo este proceso, por alentarme día a día a seguir adelante y por confiar en que podía lograrlo, si llegué a sentir que me estaba ahogando en el proceso ella siempre me sacó a flote.

Al comité revisor integrado por los profesores investigadores: Dra. Alma Xóchilt Ávila Alejandré, Dr. Miguel Ángel García Muñoz, M.C. Fernando Zapot Hazas, Dr. Paul Mauricio Sánchez Campos y, por último, pero no menos importante al M.C. José Daniel Rodríguez Ortiz.

A mí misma, por la perseverancia y el esfuerzo.

También quiero agradecer a Naruto Uzumaki quien me enseñó a nunca rendirme ¡Dattebayo!

## CONTENIDO

	Página
<b>RESUMEN</b>	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XIII</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>14</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	<b>16</b>
2.1. Leche de bovino	16
2.2. Quesos	17
2.2.1. Queso de pasta hilada	23
2.2.2. Microbiota del queso	25
2.2.2.1. Mohos y levaduras	26
2.2.2.2. Bacterias coliformes	27
2.2.2.3. Mesófilos y termófilos aerobios	28
2.2.2.4. Psicrófilos y psicrotróficos	29
2.2.2.5. Bacterias ácido lácticas	30
2.3. Enfermedades de transmisión alimentaria y microorganismos patógenos en alimentos	31
2.4. Métodos de conservación de alimentos	33
2.4.1. Refrigeración y congelación	34
2.4.2. Liofilización	36
2.4.3. Esterilización	36
2.4.4. Pasteurización	37
2.4.5. Secado	37
2.5. Empaques y recubrimiento	38
2.6. Aditivos antimicrobianos	40
2.6.1. Bacteriocinas como agentes antimicrobianos	41
2.6.2. Nisina	42
<b>III. ANTECEDENTES</b>	<b>44</b>
3.1. Justificación	62
3.2. Hipótesis	63
3.3. Objetivos	63

<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>64</b>
4.1. Reactivos y materia prima	<b>64</b>
4.2. Métodos	<b>64</b>
4.2.1. Selección y preparación de recubrimiento de caseína/nisina	<b>65</b>
4.2.2. Pruebas de plataforma en leche fresca de bovino	<b>66</b>
4.2.3. Preparación de queso de pasta hilada	<b>68</b>
4.2.4. Actividad microbiológica	<b>68</b>
4.2.4.1. Preparación de la muestra	<b>69</b>
4.2.4.2. Cuenta de bacterias aerobias en placa	<b>69</b>
4.2.4.3. Cuenta de microorganismos coliformes totales en placa	<b>70</b>
4.2.4.4. Mohos y levaduras	<b>71</b>
<b>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>72</b>
5.1. Preparación de biopelículas o recubrimientos	<b>72</b>
5.2. Elaboración de queso de hebra y pruebas de plataforma	<b>74</b>
5.3. Análisis microbiológico	<b>77</b>
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>88</b>
6.1. Perspectivas	<b>89</b>
<b>VII. REFERENCIAS</b>	<b>90</b>
<b>VIII. ANEXOS</b>	<b>102</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Límites máximos de contenido microbiano para leche y derivados lácteos según la NOM-243-SSA1-2010.	<b>21</b>
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de quesos según la NOM 121-SSA1-1994.	<b>24</b>
<b>Tabla 3.</b> Aplicaciones de recubrimientos comestibles en alimentos, con nisina incorporada como antimicrobiano.	<b>46</b>
<b>Tabla 4.</b> Proporciones empleadas en la elaboración de las biopelículas, Leyva-Hernández (2022) y Girón-Campechano (2023).	<b>65</b>
<b>Tabla 5.</b> Temperatura y tiempo de incubación para crecimiento de bacterias aerobias en placa.	<b>70</b>
<b>Tabla 6.</b> Parámetros de calidad en leche fresca	<b>76</b>
<b>Tabla 7.</b> Recuento de bacterias aerobias (Termofílicos, 55 °C ± 2 °C) en queso de pasta hilada, empleando recubrimientos de caseína y nisina. Agar cuenta estándar.	<b>79</b>
<b>Tabla 8.</b> Recuento de bacterias aerobias (Mesófilos aerobios, 35 °C ± 2 °C) en queso de pasta hilada, empleando recubrimiento de caseína y nisina. Agar cuenta estándar.	<b>80</b>
<b>Tabla 9.</b> Recuento de bacterias aerobias (Psicrotróficos, 20 ± 2 °C) en queso de pasta hilada, empleando recubrimientos de caseína y nisina. Agar cuenta estándar.	<b>82</b>
<b>Tabla 10.</b> Recuento de bacterias aerobias (Psicrofílicos, 5 ± 2 °C) en queso de pasta hilada, empleando recubrimientos de caseína y nisina. Agar cuenta estándar.	<b>83</b>
<b>Tabla 11.</b> Recuento de Mohos y levaduras (3 a 5 días, 25°C) en queso de pasta hilada, empleando recubrimiento de caseína y nisina. Agar Papa Dextrosa.	<b>84</b>
<b>Tabla 12.</b> Recuento de coliformes totales en placa (24 h ± 2 h, 35°C) en queso de pasta hilada, empleando recubrimiento de caseína y nisina. Agar rojo violeta bilis lactosa.	<b>87</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Metodología general empleada en el desarrollo experimental	<b>64</b>
<b>Figura 2.</b> Esquema de preparación de los recubrimientos. Preparación de la solución formadora de película (SFP), formulación (F) y recubrimientos por el método vaciado en placas de vidrio.	<b>66</b>
<b>Figura 3.</b> Pruebas de plataforma en leche fresca. A) potencial de hidrógeno, B) densidad, C) prueba de alcohol y D) acidez titulable.	<b>67</b>
<b>Figura 4.</b> Proceso de siembra en medio de cultivo para conteo de microorganismos: A) diluciones, B) incorporación de medio, C) incorporación del inóculo, D) solidificación y E) incubación.	<b>71</b>
<b>Figura 5.</b> Biopelículas blanco A, B y C.	<b>72</b>
<b>Figura 6.</b> Biopelículas con bacteriocina (Nisina): A) NI2525, B) NI2550, C) NI5025 y D) NI5050.	<b>72</b>
<b>Figura 7.</b> Proceso de elaboración del queso de hebra estandarizado.	<b>74</b>
<b>Figura 8.</b> Queso de pasta hilada obtenido en este trabajo de investigación	<b>75</b>
<b>Figura 9.</b> Tratamientos experimentales del queso de pasta hilada con aplicación del recubrimiento: A) T1(NI2525), B) T2(NI2550), C) T3(NI5025), D) T4(NI5050). Blanco: E) B1(2525), F) B2(2550), G) B3(5025), H) B4(5050). Quesos sin recubrimiento: I), J).	<b>77</b>

## ABREVIATURAS

<b>BAL</b>	Bacterias ácido lácticas
<b>F</b>	Formulación
<b>FDA</b>	Food And Drugs Administration
<b>GRAS</b>	Generalmente reconocidas como seguras
<b>NIS</b>	Nisina
<b>UFC</b>	Unidad formadora de colonias
<b>SFP</b>	Solución formadora de película
<b>p/v</b>	peso/volumen
<b>p/p</b>	peso/peso

## RESUMEN

El aumento de la población y la preocupación en los consumidores por adquirir alimentos frescos, inocuos y sabrosos; ha creado la necesidad de usar empaques amigables con el ambiente. El uso de recubrimientos comestibles enriquecidos con bacteriocinas puede ayudar a resolver el problema de la contaminación microbiana de los alimentos listos para comer sin alterar la frescura y el sabor. En este trabajo de investigación se elaboraron biopelículas tipo recubrimiento con nisina inmovilizada empleando caseína como polímero (2.5 y 5.0 g/mL) y glicerol como plastificante (2.5 y 5.0 mL/mL), esto es, las condiciones experimentales de trabajos previos con el propósito de reproducir las propiedades fisicoquímicas. Después se caracterizó fisicoquímicamente leche de bovino recién obtenida de un rancho local empleando pruebas rápidas (pH, temperatura, prueba de alcohol, acidez y densidad). Se elaboró queso de pasta hilada (queso de hebra) empleando el método de fermentación enzimática, se utilizó un proceso de malaxado en agua caliente a 70 °C y un proceso de refrigeración a 4°C. Los recubrimientos se aplicaron a las muestras de queso de hebra preparados en la etapa correspondiente y se dejaron reposar en refrigeración por 3 días. Después, los quesos fueron analizados microbiológicamente; se determinó mesófilos aerobios, mohos y levaduras y coliformes totales. Los resultados en leche mostraron valores de pH en 6.6, acidez en 24.5 °D, temperatura en 25.9 °C, densidad en 1.026 g/mL y prueba de alcohol negativa en leche durante todo el experimento. El recuento de termófilos (55 °C) fue negativo en todos los tratamientos con nisina, en mesófilos (35 °C) la media fue T2, T3 < T1<T4 respecto a los blancos. En bacterias psicrótróficas (20 °C) la media fue T1<T3<T2<T4 respecto a los blancos con UFC/g menor, mientras que en psicrófilas (5 °C) no hubo crecimiento en los tratamientos y en blancos. Los resultados de mohos y levaduras (25 °C) la media fue T1<T4<T2<T3 respecto a los blancos con un crecimiento mayor. Mientras que coliformes en placa (24 °C) solo hubo crecimiento en T4<T2. Estos resultados preliminares muestran la aplicación de las biopelículas como recubrimientos de queso de hebra, un alimento de alto consumo local, con inhibición en mesófilos aerobios, mohos y levaduras y coliformes totales.

**Palabras clave:** bacteriocina, coliformes, leche de bovino, mesófilos aerobios, nisina, queso de hebra

## ABSTRACT

The increase in population and consumer concern about purchasing fresh, safe and tasty foods; has created the need to use friendly packaging. The use of edible coatings enriched with bacteriocins can help solve the problem of microbial contamination of ready to eat foods without altering freshness and flavor. In this study, coating-type biofilms were prepared with immobilized nisin using casein as polymer (2.5 and 5.0 g/mL) and glycerol as plasticizer (2.5 and 5.0 mL/mL), that is, the experimental conditions of previous works with the purpose to reproduce the physicochemical properties. Freshly obtained bovine milk from a local ranch was then physicochemical characterized using rapid tests (pH, temperature, alcohol test, acidity and density). Pasta filata cheese (string cheese) was made using the enzymatic fermentation method, a hot water malaxation process at 70 °C and a refrigeration process at 4 °C were used. The coatings were applied to the string cheese samples prepared in the corresponding stage and allowed to rest in the refrigerator for 3 days. After, the cheeses were microbiologically analyzed; Aerobic mesophiles, molds and yeasts and total coliforms were determined. The results in milk showed pH values pH 6.6, acidity 24.5 °D, temperature 25.9 °C, density 1.026 g/mL and negative alcohol test in milk throughout the experiment. Thermophiles (55 °C) was negative in all treatments with nisin, in mesophiles (35 °C) the average was T2, T3 < T1 < T4 compared to target. Psychrotrophic bacteria (20 °C) the average was T1<T3<T2<T4 compared to target with lower CFU/g, while in psychrophilic bacteria (5 °C) there was no growth in the treatments. The results for molds and yeasts (25 °C) averaged T1<T4<T2<T3 compared to the whites with greater growth. While in plate coliforms (24 °C) there was only growth in T4<T2. These preliminary results show the application of biofilms as coatings for string cheese, a highly consumed food locally, with inhibition of aerobic mesophiles, molds and yeasts, and total coliforms.

**Key works:** bacteriocin, coliforms, bovine milk, aerobic mesophiles, nisin, string cheese

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de transmisión alimentaria son un factor primordial y de suma importancia para la salud a nivel mundial, son el principal motivo de morbilidad y mortalidad y es una de las principales causas de la delimitación del desarrollo económico. Los alimentos producidos en países en desarrollo y subdesarrollo son más susceptibles a la contaminación debido a múltiples factores como, la falta de acceso al agua potable para la desinfección y preparación de los alimentos, higiene personal deficiente y manipulación inadecuada, transporte y almacenamiento inadecuado (Bisht *et. al.*, 2021; Zheng *et. al.*, 2023). El consumo de quesos artesanales está relacionado con brotes de enfermedades transmitidas por alimentos; estos quesos son producidos principalmente con el objetivo de comercializarse. Estos quesos son elaborados con tecnologías tradicionales en pequeños lotes y con la menor mecanización posible, por lo general este proceso es largo y tiene que estar monitoreado (Rangel *et. al.*, 2023). El queso Oaxaca es un queso tradicional popular, siendo este uno de los preferidos y consumidos por los mexicanos, con una suavidad característica, cuenta con una textura fibrosa única y un sabor suave. Su proceso de elaboración viene es similar al queso mozzarella (Rodríguez *et. al.*, 2014). Los alimentos perecederos como las frutas, verduras, productos cárnicos y lácteos como los quesos, son los de mayor relación con las enfermedades de transmisión alimentaria (Chaudhari *et. al.*, 2023). La contaminación en los quesos puede tener origen químico, físico y biológico, sin embargo, estos dos últimos son los más estudiados. Los peligros físicos comúnmente reportados en diversas investigaciones en los productos lácteos son objetos extraños, cabello, pedazos de tela, insectos; mientras que los peligros biológicos más comunes en los quesos son, *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* y *S. aureus* (Chávez Martínez *et. al.*, 2019).

En la actualidad debido a los problemas medioambientales y de sostenibilidad se está fomentando el uso de nuevos métodos de conservación, entre los cuales se encuentran los recubrimientos comestibles con el uso de antimicrobianos, estos representan una buena opción puesto que al igual que los recubrimientos que se utilizan convencionalmente en la conservación de los alimentos (cera, parafina, cloruro de polivinilo) ya que previenen el deterioro y prolongan la vida útil; además de esto, los recubrimientos comestibles pueden

actuar como portadores de agentes antimicrobianos aportando múltiples ventajas frente a los recubrimientos elaborados con materiales convencionales (Costa *et. al.*, 2018).

En las últimas décadas se han hecho diversos estudios que destacan a las bacteriocinas como conservantes antimicrobianos de alimentos, en frutas y verduras, carnes, jugos y productos lácteos. Entre estas bacteriocinas se encuentra la nisina, esta ha sido ampliamente estudiada entre todas las bacteriocinas y cuenta con la aprobación para su aplicación en los alimentos como GRAS (generalmente reconocidas como seguras) (Verma *et. al.*, 2022).

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Leche de bovino

La NOM-243-SSA1-2010 define a la leche como la secreción natural de las glándulas mamarias de las vacas sanas o de cualquier otra especie animal, excluido el calostro. Para la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la leche es uno de los alimentos de mayor consumo alrededor del mundo. Este alimento no solo juega un papel importante a nivel nutricional, sino que también es un factor importante en la economía. El consumo mundial de leche y sus derivados supera los 6 mil millones de consumidores (Luiz *et. al.*, 2018). La leche bovina es la leche fresca o no pasteurizada más consumida por los seres humanos y representa el 83% de la producción mundial de leche, seguida de la leche de búfala con el 13%, la leche de cabra con un 2%, leche de oveja con un 1% y la leche de camello con un 0.3% (Becker *et. al.*, 2016). No se dispone de estadísticas para otro tipo de especies animales como los caballos, burros y los yaks, pero la contribución a la producción de leche no corresponde a más del 0.1% (Claeys *et. al.*, 2014). La leche bovina aporta beneficios significativos para personas de diversas edades, como fomentar el crecimiento, prevención de infecciones gastrointestinales, incremento de la función del sistema inmunológico, mejora del rendimiento físico y reducción de la presión arterial; en otras palabras la leche contiene los componentes necesarios para que los mamíferos recién nacidos crezcan y se desarrollen (Ning *et. al.*, 2024). Su composición comprende de proteínas (3-3.9%), lactosa (4.4-5.6%), grasas (3.3-5.4%) y minerales (0.7-0.8%). La leche es una fuente dietética de una variedad de micronutrientes importantes, en los que se incluye el calcio, fósforo, magnesio, zinc, yodo, potasio, vitamina , vitamina B, vitamina B12 y vitamina B2 (Dror y Allen, 2014); a estos componentes se atribuyen las características bioquímicas y nutricionales, y la energía derivada se debe a la alta presencia de fracción de lactosa (Luiz *et. al.* , 2018; Roy *et. al.*, 2020). La leche es un producto perecedero, no se debe de almacenar por mucho tiempo, sin embargo, la mayor parte de la producción láctea se consume en forma de productos lácteos frescos (FAO, 2019).

### 2.2. Quesos

Los productos lácteos son consumidos alrededor de todo el mundo debido a sus características nutricionales y funcionales. Este grupo de productos se consume en todos los rangos de edades debido a sus propiedades saludables, siendo uno de estos productos el queso; este cuenta con un precio elevado si se compara con otros productos lácteos (Abedini *et. al.*, 2023). El queso es un producto lácteo muy popular en todo el mundo, este producto es uno de los más antiguos e importantes, este se elabora de diferentes sabores, tipos y apariencias, es considerado una fuente dietética importante de proteínas, grasa y otros componentes; por ello mismo la evaluación de los atributos de calidad es fundamental tanto para los consumidores como para la industria (Lei y Sun, 2019).

El queso es el nombre que se les da a un grupo de productos alimenticios fermentados que se producen en una gran escala de sabores y formas alrededor de todo el mundo. No obstante, el objetivo de preparar queso es conservar los principales componentes de la leche, el queso ha estado en constante desarrollo hasta transformarse en un alimento de alta cocina con cualidades características, además de ser un alimento de aportación nutrimental (McSweeney *et. al.*, 2017). El queso es un alimento lácteo importante, su importancia se refleja en el hecho de que aproximadamente el 30% de la población mundial se utiliza para la elaboración de queso (Bittante *et. al.*, 2022). Este se ha producido desde hace miles de años y se ha adaptado a las condiciones técnicas, sociales y económicas de diversas partes del mundo. Además, los procesos tecnológicos que se asocian con el entorno de fabricación dan aspecto a la química y microbiología de los quesos locales, que eventualmente desarrollan las características visuales, de olor y textura que reflejan y personifican la identidad del queso tradicional (Dugat-Bony *et al.*, 2016). Tradicionalmente, el queso se fabrica convirtiendo la leche fluida en una masa semisólida haciendo uso de un agente coagulante como cuajo. Este producto puede variar en sus características, incluido el color, sabor y la firmeza que comúnmente pueden atribuirse a la tecnología de producción, el origen de la leche, contenido de humedad y el tiempo de envejecimiento (para quesos madurados) (Santiago-López *et. al.*, 2018).

La composición química del queso (contenido de proteínas, grasa y humedad) influye de manera significativa en la calidad del queso puesto que se encuentra influenciada por el rendimiento de la producción y ejerce un papel directo en la seguridad microbiológica, vida útil, textura, proteólisis y las propiedades funcionales del queso. Estos parámetros son variados dependiendo el tipo de queso, determinando su forma final de consumo, es decir consumo directo o bien utilizado como ingrediente en otros alimentos como pastas, pizzas, etc. (Bilhar *et al.*, 2024).

Los quesos se clasifican según los criterios siguientes: tomando en cuenta la especie de hembras lactantes (vacas, búfalas, cabras, etc.), tipo de coagulante (microbiano, vegetal, animal, químico), tiempo de maduración (fresca, corta, media o larga), las propiedades de textura (muy blando, blando, firme/semiduro, muy duro), la proporción de grasa con respecto a la materia seca (sin grasa, baja en grasa, media en grasa, entera y alta en grasa) (Bittante *et al.*, 2023). Existe una gran variedad de quesos que se elaboran a base de leche bovina, ovina, caprina, o búfala, bacterias de ácido láctico (BAL). En la actualidad podemos encontrar un cuantioso comercio internacional de las variedades de quesos siendo la mayoría de estos producidos en diversos países. No hay registros de una lista definitiva, pero se tiene en cuenta que hay un valor aproximado de 1000 variedades de quesos (McSweeney *et al.*, 2017).

Los factores responsables de la amplia gama de variedades de quesos que se producen alrededor de todo el mundo son el tipo de leche, los pretratamientos que se le realizan a la leche, los tipos de iniciadores microbianos que se utilicen, el método y la intensidad de la acidificación, el agente coagulante y las condiciones de coagulación, la cocción y el corte de la cuajada, la adición de hierbas y/o especias, el proceso de escurrido y prensado, la técnica de salado, el tratamiento que se le dé a la corteza, las condiciones y el tiempo de maduración. Todos estos atributos dan lugar a las especificaciones de los diferentes tipos de quesos en cuanto a términos de sus características sensoriales (Bittante *et al.*, 2023).

Así mismo diversos investigadores han realizado estudios sobre los efectos de las características de la leche bovina en los perfiles sensoriales del queso investigado, la influencia de los animales lactantes y los factores ambientales. En estas investigaciones

## II. MARCO TEÓRICO

se han estudiado el efecto de la raza, etapa de lactancia, el estado de la salud del animal, el tipo de alimentación sobre los perfiles sensoriales de los quesos. La percepción de las características sensoriales en los quesos tiene gran influencia en las decisiones de consumo y en los comportamientos que guardan relación con los alimentos (Cipolat-Gotet *et. al.*, 2018).

La producción de queso ha ido creciendo en los últimos 20 años a una tasa promedio anual de aproximadamente 1.5%. esto se puede atribuir al creciente aumento de la población, el ingreso per cápita, las nuevas tendencias alimentarias, el nuevo estilo de vida, el uso del queso como ingrediente en diferentes platillos y los sectores industriales (Korakhashvili y Jeiranashvilib, 2016). Este sector lácteo ha presentado un aumento en la demanda debido al reconocimiento que reciben algunos quesos como alimentos funcionales, en particular en lo que respecta al aporte de prebióticos y probióticos; así mismo también presentan componentes como péptidos, polisacáridos, ácidos grasos y ácidos orgánicos, todos conocidos como componentes bioactivos los cuales ejercen efectos positivos en la salud del consumidor (Santiago-López *et. al.*, 2018).

El queso es un producto vulnerable en cuanto a contaminación microbiana, esto disminuye la vida útil del producto provocando un riesgo significativo para la salud del consumidor. Esta contaminación frecuentemente es causada por bacterias, mohos y levaduras los cuales propician el desarrollo de sabores desagradables generalmente cuando el producto es almacenado sin embalaje (Hoda y Samah, 2021).

En la actualidad la quesería es una de las industrias más importantes en México, esta utiliza aproximadamente un 25% del total de la leche que se produce en el país. Se estima que los queseros artesanales o de pequeña escala utilizan al menos un porcentaje similar de leche para la producción de queso. La importancia de la industria quesera refleja que el 70% de todo el queso mexicano proviene de producciones a pequeña escala. En México se reconoce hasta la fecha cerca de 40 variedades diferentes de queso, siendo las variedades más importantes, el queso fresco, panela, Chihuahua y Oaxaca, debido a sus altos volúmenes de producción ya sea por producción artesanal, semi-mecanizada o mecanizada (Gonzales-Córdoba *et. al.*, 2016). En México la ley de salud y la norma oficial NOM-243-SSA1-2010 son las encargadas de regular las normas de las prácticas

## II. MARCO TEÓRICO

sanitarias y de seguridad para la elaboración del queso, estas normas establecen los valores máximos que son permitidos de carga microbiana en los quesos y derivados lácteos (Tabla 1) (Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010), así mismo establece que el proceso de pasteurización de la leche debe de ser obligatoria, esto para asegurar que el producto sea apto para su posterior consumo (Castro *et. al.*, 2013).

**Tabla 1.** Límites máximos de contenido microbiano para leche y derivados lácteos según la NOM-243-SSA1-2010.

Microorganismo	Límite máximo	Productos
Organismos coliformes totales	$\leq 100$ UFC/g o mL $\leq 50$ UFC/g o mL $\leq 20$ UFC/g o mL $\leq 10$ UFC/g o mL	<p>Helados y sorbetes. Quesos de suero Bases o mezclas para helados.</p> <p>En punto de venta: Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; pasteurizados.</p> <p>En planta: Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; pasteurizados o deshidratados. Mantequilla, cremas, leche condensada azucarada, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche.</p>
<i>Staphylococcus aureus</i>	$\leq 10$ UFC/g o mL por siembra directa $\leq 100$ UFC/g o mL 1000 UFC/g	<p>Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado pasteurizado.</p> <p>Mantequilla, cremas, leche condensada azucarada, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche. Quesos madurados y quesos procesados.</p> <p>Quesos frescos y quesos de suero.</p>
<i>Salmonella spp</i>	Ausente en 25g o mL	<p>Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado: pasteurizados y deshidratados. Quesos frescos, madurados y procesados. Quesos de suero.</p> <p>Cremas, leche fermentada o acidificada, dulces a base de leche*, helados, sorbetes y bases para helados. Mantequillas.</p>
<i>Escherichia coli</i>	100 UFC/g o mL $\leq 3$ NMP/g o mL $\leq 10$ NMP/g	<p>Quesos frescos.</p> <p>Leche utilizada como materia prima para la elaboración de quesos.</p> <p>Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; deshidratados.</p> <p>Quesos madurados y procesados.</p>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausente en 25g o mL	<p>Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado; pasteurizados **</p> <p>Quesos. Quesos de suero.</p> <p>Helados, bases para helados y sorbetes **.</p>

<i>Vibrio cholerae</i> ***	Ausente en 25g	Quesos frescos. Helados, sorbetes y bases para helados.
	Ausente en 50g	Quesos de suero.
Enterotoxina <i>estafilococcica</i>	Negativa	Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado; deshidratados y la que se emplee como materia prima para elaboración de quesos. Quesos frescos, madurados y procesados. Helados, sorbetes y bases para helados.
Toxina botulínica**	Negativa	Quesos frescos, madurados y procesados, envasados al alto vacío.
Mohos y levaduras	500 UFC/g o mL	Quesos frescos, madurados*** y quesos de suero.
	100UFC/g o mL	Quesos procesados.
	50 UFC/g o mL	Bases o mezclas para helados.
Mesofílicos aerobios	200,000 UFC/g o mL	Helados y sorbetes.
	100,000 UFC/g o mL	Bases para helado.

\* Para aquellos que contienen chocolate, cocoa, coco, huevo y semillas. \*\* Se determinará únicamente en situaciones de emergencia sanitaria, cuando la SSA de acuerdo a los resultados microbiológicos detecte su presencia, y ordenará la realización de un plan de trabajo por parte del fabricante o importador para controlar la presencia. \*\*\* Aquellos productos que para su maduración requieren de hongos, pudieran estar fuera de este límite.

### 2.2.1. Queso de pasta hilada

Este queso, también conocido como queso Oaxaca, queso de hebra o quesillo, es un queso de tipo pasta hilada o cuajada estirada, muy popular y uno de los productos lácteos más consumidos en México (Gonzales-Córdoba *et. al.*, 2016). Es un queso tradicional mexicano, su origen se remonta a finales del siglo XIX y principios del siglo XX (Sepúlveda y Chávez, 2016). El queso Oaxaca lleva este nombre en honor al estado de Oaxaca, aparentemente su lugar de origen, en donde habitualmente se le conoce como “quesillo” y en el resto de los estados como queso Oaxaca (Castro *et. al.*, 2013). Este tipo de queso es considerado como un queso fresco y puede llegar a contener un 50% de humedad (Gonzales-Córdoba *et. al.*, 2016). Las características principales del queso de hebra son el sabor suave y ácido, alta cremosidad y buena fundibilidad. Este tipo de quesos pueden ser elaborados a pequeña y mediana escala, en el proceso de su elaboración se puede utilizar leche cruda fermentada naturalmente y en los quesos elaborados a gran escala se suele utilizar leche pasteurizada acidificada ya sea con cultivos iniciadores o ácidos orgánicos (Caro *et. al.*, 2020).

El mercado mundial de los quesos de pasta filata se valoró en 55.492,8 millones de dólares en el 2018, y se espera que esta taza crezca un 2% en el periodo del 2021 al 2028, alcanzando así los 65.01 millones de dólares en el 2028 (alrededor del 57% del mercado mundial de queso) (Fusco *et. al.*, 2022). En la tabla 2 se puede apreciar la clasificación de los quesos según la NOM 121-SSA1-1994.

Los quesos de pasta filata-hilada tuvieron origen en las zonas del norte del mediterráneo, que abarcan Italia, Grecia, los Balcanes, Turquía y Europa del este. En la actualidad estos quesos aún se siguen elaborando en algunas regiones haciendo uso de métodos tradicionales de la leche de vacas, cabras, búfalas de agua y ovejas, pero por otro lado también existe la producción a gran escala de quesos utilizando tecnologías nuevas. El término pasta filata se deriva de una frase italiana que significa pasta hilada o cuajada estirada. Esto hace referencia a un proceso único de plastificación y estiramiento compartido por todos los quesos estilo pasta filata lo cual proporciona a este grupo de quesos una autenticidad compartida (McMahon y Oberg, 2017).

**Tabla 2.** Clasificación de quesos según la NOM 121-SSA1-1994.

Clasificación	Tipos de queso
	Frescos
Frescales	Panela, Canasto, Sierra, Ranchero, Fresco, Blanco, Enchilado, Adobado
Pasta cocida	Oaxaca, Asadero, Mozzarella, Del Morral, Adobera.
Acidificados	Cottage, Crema, Doble Crema, Petit Suisse, Nuefchatel
	Madurados
Prensados de pasta dura	Añejo, Parmesano, Cotija, Reggianito
Prensados	Cheddar, Chester, Chihuahua, Manchego, Brick, Edam, Gouda, Gruyere, Emmental, Cheshire, Amsterdam, Butterkase, Coulomiers, Dambo, Erom, Friese, Fynbo, Havarti, Harzer-Kase, Herrgardsost, Huskallsost, Leidse, Maribo, Norvergia, Provolone, Port Salut, Romadur, Saint Paulin, Samsoe, Svecia, Tilsiter, Bola, Jack.
Con mohos	Azul, Cabrales, Camembert, Roquefort, Danablu, Limburgo, Brie
Procesados	
Fundidos y para untar	Amarillo

Este queso se elabora de manera tradicional con leche fresca de vaca. La cuajada previamente acidificada se amasa en agua caliente para darle forma a las hebras. El control de la acidez de la leche y la cuajada es importante para elaborar de manera artesanal este tipo de queso. Este queso es ampliamente utilizado como ingrediente para diferentes recetas de comida mexicana como tlayudas, quesadillas, entre otras (Ramírez Rivera *et. al.*, 2023).

La manera de comercializar el queso Oaxaca regularmente es mediante el envasado al vacío, debido a que éste preserva por mayor tiempo su calidad (Fuentes *et. al.*, 2015). De acuerdo con el servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP, 2017) en México una mayor cantidad de personas prefiere el consumo de queso Oaxaca, su consumo no solo se restringe dentro del país si no también se comercializa en el exterior. En el 2016, México logró exportar 1912 toneladas de quesillo, generando divisas a

nuestro país por 7 millones 96 mil dólares, siendo Estados Unidos el país principal en adquirir queso, sus compras estuvieron por encima de 6 millones 855 mil dólares el mismo año. Hay que mencionar además de que si la leche ha sido pasteurizada o no antes de la elaboración del queso Oaxaca, se deben de tomar en cuenta otros factores que ponen en riesgo de contaminación microbiana del queso, tales como la higiene del ambiente y de los trabajadores así como la posibilidad de una contaminación posterior al procesamiento, en consecuencia la elaboración de este queso debe de acompañarse de una etapa de maduración adecuada y una supervisión microbiológica continua hasta su posterior distribución y consumo (Yoon *et. al.*, 2016). Los quesos son productos altamente perecederos, en este sentido es importante desarrollar envases idóneos para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos durante la distribución y almacenamiento del producto para prolongar su vida útil (Anjos *et. al.*, 2023).

### **2.2.2. Microbiota del queso**

El queso cuenta con una composición microbiana muy diversa, esta puede variar desde la parte de adentro hasta la superficie (Jonnala *et. al.*, 2018), el microbioma del queso varía según el tipo de queso, de las condiciones ambientales y del procesamiento, de la especie del origen de la leche, de los tratamientos térmicos (pasteurización, cocción, refrigeración) y las condiciones de maduración del queso (Giagnoni *et. al.*, 2023) a diferencia del queso elaborado con leche pasteurizada, la microbiota de los quesos elaborados a base de leche cruda es de naturaleza diversa y heterogénea. En general las poblaciones microbianas del queso se pueden dividir en dos grupos: las poblaciones iniciales, las cuales se encargan de impulsar el proceso de maduración, y las poblaciones secundarias que se encargan de los aspectos sensoriales (O'Sullivan y Cotter, 2017). Los quesos elaborados a partir de leche cruda tienen un tiempo de maduración más corto que los quesos elaborados con leche pasteurizada debido a su carga microbiana (Montel *et. al.*, 2014). Por ello mismo, un mejor conocimiento de la composición del microbioma del queso es importante para comprender el impacto que este tiene en las características sensoriales deseables o, por lo contrario, en la calidad negativa del queso (Giagnoni *et. al.*, 2023).

### 2.2.2.1. Mohos y levaduras

Los microorganismos responsables del deterioro de los alimentos lácteos incluyen bacterias Gram negativas y positivas, así como una amplia gama de mohos y levaduras. Los hongos (mohos y levaduras) destacan en el deterioro de los alimentos, estos pueden encontrarse en entornos de producción primaria, así como en el área del procesamiento, cabe resaltar que el deterioro causado por mohos y levaduras es responsable de una gran pérdida y desperdicios alimenticios trayendo pérdidas económicas (Martin *et. al.*, 2022). Estos pueden propiciar defectos no visibles, como olores y sabores indeseados o alteraciones que se vean a simple vista como la decoloración (producción de pigmentos) o desarrollo en la superficie del alimento comprometiendo su vida útil, la calidad y seguridad del mismo (Di Renzo *et. al.*, 2023). La contaminación en los alimentos por algunas especies de mohos y levaduras representan una amenaza para la salud de los seres humanos y animales; algunas especies de mohos y levaduras son productoras de micotoxinas, estas pueden llegar a representar cierto grado de toxicidad y carcinogenicidad llegando así a afectar los síntomas neuropsiquiátricos y procesos inmunológicos propiciando así trastornos del neurodesarrollo, por esto la oportuna detección de mohos y levaduras en alimentos es un factor importante para disminuir los riesgos para la salud del consumidor así como también el desperdicio de alimentos (Ntakatsane *et. al.*, 2021).

El deterioro por mohos representa un problema importante en la calidad del queso debido a la capacidad para desarrollarse aún en condiciones de bajo oxígeno, actividad de agua y niveles de carbohidratos en presencia de conservantes químicos. Los mohos pueden crecer de manera lenta a temperatura ambiente pero también a temperaturas de refrigeración causando efectos visibles y sensoriales. La susceptibilidad de los quesos al deterioro causado por mohos va a depender de factores intrínsecos, así como de factores extrínsecos como: la calidad de las materias primas, actividad de agua, pH, las condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad relativa, tipo de envasado), condiciones ambientales durante su elaboración y su procesamiento (Martin *et. al.*, 2022). Se calcula que la contaminación fúngica representa entre el 5 y 10% de la pérdida de los alimentos en todo el mundo. Diversos productos lácteos, como el queso, el yogur, nata agria y otros productos lácteos fermentados o concentrados, son más susceptibles al deterioro fúngico; esta contaminación puede producirse a lo largo de la toda la cadena

de transformación de los productos lácteos, desde el inicio de la producción primaria hasta la terminación del producto. El entorno de procesamiento es la fuente que guarda relación con la contaminación fúngica de los productos alimenticios. La contaminación por levaduras también puede transmitirse por el aire, aunque por lo general es más común que se origine en las superficies de trabajo, ingredientes (frutas, preparativos) y el entorno de la producción (Buehler *et. al.*, 2018).

El control en el desarrollo de mohos y levaduras causantes en la descomposición de los productos lácteos se puede realizar mediante diversos enfoques como por ejemplo: aplicando las buenas prácticas de fabricación en las instalaciones de procesado; la gestión de la materia prima y el control en el desarrollo de mohos y levaduras utilizando estrategias como cultivos protectores, conservantes y estrategias de envasado (Martin *et. al.*, 2022).

### **2.2.2.2. Bacterias coliformes**

Las bacterias coliformes que se encuentran presentes en los alimentos son indicadores de mala higiene en la manipulación de los alimentos, especialmente en aquellos alimentos que no son tratados por el efecto de calentamiento. La seguridad de los alimentos crudos depende principalmente de la higiene con la que se manipulen (Krahulcov *et. al.*, 2022).

Las bacterias coliformes son un grupo de bacterias gram negativas, anaerobias facultativas que tienen forma de bastón, tienen la capacidad de fermentar lactosa produciendo ácidos y gases en 48 h a una temperatura de 32 a 35°C (Trmcic *et. al.*, 2016). Los coliformes se encuentran presentes en el suelo, agua no tratada, la superficie de los equipos y las heces. *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* son los géneros que pertenecen al grupo de los coliformes, pero solo *Escherichia coli* reside en el tracto intestinal de humanos y animales como hábitat natural (Perín *et. al.*, 2019). Las bacterias coliformes pueden tener su origen en una variedad de fuentes en el ambiente de la granja lechera, materiales vegetales, equipos y fuentes fecales. Los niveles altos de coliformes en la leche cruda (>1000 UFC/mL) pueden indicar prácticas poco higiénicas de salubridad, una refrigeración inadecuada o la presencia de mastitis por coliformes.

Las vacas con mastitis en el ordeño pueden introducir coliformes en la leche cruda en los tanques de almacenamiento, por lo que el recuento de las células somáticas también se puede correlacionar con la presencia de bacterias coliformes. La vaca puede llegar a presentar mastitis por factores como el estiércol, el suelo y el agua (Martín *et. al.*, 2016). Estas bacterias eran utilizadas como indicadores de contaminación fecal. Sin embargo, como estas bacterias se encuentran distribuidas en la naturaleza independientemente de las heces, ahora se les considera indicadores sanitarios. Así mismo las bacterias coliformes producen malos sabores por lo que también son utilizados como indicadores de calidad, por esto mismo, los niveles de coliformes se miden en la carne, productos del mar y productos lácteos (Tominaga., 2019).

### **2.2.2.3. Mesófilos y termófilos aerobios**

Las bacterias termófilas y mesófilas preocupan a la industria alimentaria debido a sus esporas altamente resistentes (algunas llegan a sobrevivir incluso a 125°C por tiempos de hasta 30 minutos) y enzimas de deterioro termoestables, igualmente del potencial del deterioro, el caso de *Bacillus cereus* es conocido como un posible agente de intoxicación alimentaria, provocando dos tipos de intoxicación alimentaria los cuales se conocen como síndromes emético y diarreico. Se tiene información de la producción de toxinas por parte de estas bacterias (Sadiq *et. al.*, 2016).

Las bacterias termófilas son consideradas una fuente importante de contaminación en los alimentos puesto que su presencia tanto en el medio ambiente como en las materias primas suponen riesgos para la seguridad alimentaria. Estas bacterias subsisten en circunstancias cálidas, con temperaturas de crecimiento de alrededor de 55°C. Una de las principales razones de colonización de las bacterias termófilas es que tienen la capacidad de formar biopelículas en superficies de acero inoxidable siendo este el material comúnmente utilizado en las líneas de producción de leche en las granjas (Wang *et. al.*, 2021).

Las bacterias mesófilas son un grupo de bacterias que tienen la capacidad de desarrollarse en presencia de oxígeno a temperaturas que oscilan entre 20 y 45°C con una temperatura óptima entre 30 a 40°C (Amazará *et. al.*, 2022). Este tipo de bacterias es uno de los indicadores más amplios, puesto que incluye a todas aquellas bacterias que sean capaces de formar colonias en un periodo de tiempo de 24 horas, entre las

bacterias mesófilas que comúnmente podemos encontrar *Proteus sp*, *Enterococos* y *Pseudomonas*. Las infecciones bacterianas en los consumidores se atribuyen principalmente a las bacterias mesófilas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), que por lo general encuentran un crecimiento óptimo a temperaturas de aproximadamente 37°C (Cruz Gil *et. al.*, 2022).

### 2.2.2.4. Psicrófilicos y psicrotróficos

La refrigeración es uno de los métodos de conservación para mantener la frescura de los alimentos, esto porque a bajas temperaturas las reacciones químicas y microbianas que pueden llegar a afectar a los alimentos se pueden retardar. Sin embargo, algunos alimentos perecederos pueden llegar a dañarse incluso en almacenamiento en frío, esto debido a microorganismos que tienen la capacidad de adaptación al frío (Qian *et. al.*, 2023). Dependiendo de la temperatura de crecimiento, los microbios de baja temperatura se dividen en psicrófilicos y psicrotróficos (Zhang *et. al.*, 2019).

En una definición más estricta las bacterias psicrófilicas son bacterias o arqueas extremófilas que tienen una temperatura óptima de crecimiento de aproximadamente 15 °C o menos, su temperatura máxima de crecimiento es de 20 °C y una temperatura mínima de crecimiento de 0 °C o menos. Estas bacterias se desenvuelven en entornos de bajas temperaturas, como en sistemas de refrigeración y congelación. Estos microorganismos han conseguido su adaptación a nivel de sus membranas celulares, las proteínas que las constituyen, así como sus enzimas, lo que hace que puedan sobrevivir a bajas temperaturas, siendo estas bacterias resultado de adaptaciones a bajas temperaturas (Jin *et. al.*, 2022).

Por otro lado, los psicrotróficos son bacterias o arqueas tolerantes al frío las cuales tienen la capacidad de crecer a bajas temperaturas, pero sus temperaturas óptimas y máximas de crecimiento se encuentran entre 15 y 20 °C (Qian *et. al.*, 2023). Estas bacterias no son un componente habitual de la comunidad microbiana de la ubre de la vaca, por lo tanto estas bacterias tienden a ser el resultado de la contaminación de la leche durante el ordeño (Saha *et. al.*, 2024). Llegan a la leche de manera general por la falta de higiene en los utensilios y los equipos los cuales tienen contacto directo con la leche, el crecimiento se ve favorecido por las condiciones de tiempo y temperatura para su almacenamiento (Salgado *et. al.*, 2020). Otras fuentes informan que las ubres y pezones

sucios, tuberías o enfriadores de leche, el agua residual en las máquinas de ordeño son precursores de contaminación por bacterias psicrótróficas (Saha *et. al.*, 2024).

Las bacterias psicrótróficas suelen representar >10% de la microflora inicial de la leche cruda, particularmente en condiciones higiénicas; sin embargo esta cifra puede llegar a ser de >75% en condiciones de poca higiene (Vithanage *et. al.*, 2016). Estas bacterias producen enzimas extracelulares como proteasas y lipasas, estas enzimas son responsables de descomponer las fracciones de proteínas y lípidos en diversos productos lácteos. Los triglicéridos al ser hidrolizados por las lipasas provocan una falta de sabor en productos como crema, mantequilla, quesos y leche UHT. Las proteasas se encuentran asociadas con el rendimiento del queso blando y el amargor de la leche. La caseína es estable al calor, pero puede ser degradada por las proteasas. Las bacterias psicrótróficas tienen un impacto relevante en la tasa de deterioro de la leche y de los productos lácteos almacenados en el frigorífico (Saha *et. al.*, 2024).

Las bacterias psicrótróficas que se encuentran en la leche cruda incluyen a los géneros Gram negativos como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobacter* y *Hafnia* y los géneros grampositivos *Bacillus*, *Microbacterium*, *Staphylococcus* y *Carnobacterium* (Yuan *et. al.*, 2019). A estas bacterias también se les denomina como bacterias resistentes al frío (Zhang *et. al.*, 2019).

### **2.2.2.5. Bacterias ácido lácticas**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos que se encuentran relacionados con la producción de ácido láctico como principal o único producto de la fermentación de carbohidratos. Estas bacterias son Gram positivas, no esporulantes, catalasas negativas, anaeróbicos, aerotolerantes, tolerantes a los ácidos, por lo general son cocos o bacilos a excepción de algunas especies pertenecientes a los estreptococos, enterococos, lactococos y carnobacteriagéneros, las bacterias ácido lácticas no son patógenas y generalmente se reconocen como seguras (GRAS) o de calidad alimentaria (Mozzi, 2016). Se clasifican en diferentes géneros como *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Bifidobacterium*. Se pueden encontrar

## II. MARCO TEÓRICO

en zonas de muchos nutrientes como la leche, carne y bebidas, de manera particular en fermentadas, así también se pueden encontrar en el intestino y las vías respiratorias de humanos y animales; estas bacterias se prefieren para la bioconservación porque son seguras de consumir, mejoran el sabor y durante el almacenamiento dominan de manera natural la microflora de muchos alimentos inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas en los alimentos. La disposición de las bacterias ácido lácticas para producir ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, metabolitos antimicrobianos y bacteriocinas han puesto a este grupo de bacterias en uno de los mejores lugares como conservantes en los alimentos (Yves *et. al.*, 2023). Así también según sus productos fermentativos beneficiosos, las especies de bacterias ácido lácticas se pueden clasificar en tipos homofermentativos y heterofermentativos. Las BAL homofermentativas son productoras solo de ácido láctico mientras que las heterofermentativas también producen ácido láctico, pero también otros ácidos. Muchas especies de bacterias ácido lácticas están empezando a tener cierto grado de reconocimiento tomando en cuenta sus diversos atributos beneficiosos en distintas áreas biotecnológicas relacionadas con la fermentación incluido la tolerancia a los ácidos, la actividad antimicrobiana, la seguridad para el consumo humano y animal y la fermentación a escala industrial (Obinwanne Okoye *et. al.*, 2022).

Las bacterias ácido lácticas son utilizadas en la producción de diversos productos lácteos como quesos, yogur, suero de leche, bebidas fermentadas, los cuales son consumidos alrededor de todo el mundo (Pelcastre *et. al.*, 2023). Estas bacterias presentan diversas características probióticas y tecnológicas en la industria alimentaria, como mejorar el contenido nutricional, la textura y el sabor de los alimentos fermentados, producir componentes bioactivos beneficiosos e inhibir el crecimiento de patógenos (Cui y Qub, 2024).

### **2.3. Enfermedades de transmisión alimentaria y microorganismos patógenos en alimentos**

Una enfermedad de transmisión alimentaria (ETA) es aquella enfermedad causada por la ingesta de agua y alimentos contaminados provocando un efecto negativo en la salud del consumidor, puede ser de forma aguda o crónica, estas enfermedades pueden ser

## II. MARCO TEÓRICO

causadas por microorganismos o sustancias tóxicas que llegan a contaminar al alimento en cualquier etapa de su elaboración (Ruiz *et. al.*, 2017).

El sistema alimentario presenta cierto grado de complejidad en cuanto a la inocuidad de los alimentos, los peligros para la inocuidad de los alimentos abarcan una gran variedad patógenos y sustancias químicas, estos peligros pueden encontrarse en diferentes alimentos y en niveles distintos de contaminación, a su vez estos peligros pueden presentar ciertos riesgos a la salud del consumidor (Pires *et. al.*, 2023).

Las enfermedades de transmisión alimentaria corresponden a una importante carga de la salud a nivel mundial; a finales de la década de los 90 la certificación de inocuidad de los alimentos se convirtió en un organismo regulatorio importante e influyente a nivel público, así como privado. Así las normas de seguridad alimentaria son las encargadas de brindar apoyo y protección a los consumidores de enfermedades de transmisión alimentaria (Zheng *et. al.*, 2023).

Cada año se registran alrededor de 600 millones de enfermedades y 420,000 descensos a causa de las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), dichas enfermedades son ocasionadas por diversos microorganismos que se encuentran presentes en los alimentos, causando enfermedades como norovirus, salmonelosis, campilobacteriosis, listeriosis, brucelosis, etc. (Espinosa *et. al.*, 2022). Estas enfermedades suelen ser muy comunes, llegando a afectar a millones de personas alrededor de todo el mundo; pudiendo encontrarse partículas indeseadas en los alimentos. Los organismos patógenos, sustancias químicas y materiales radiactivos son problemas a los que se enfrenta la salud pública (Wiwanitkit, 2018).

La mayoría de las enfermedades transmitidas por los alimentos se encuentran relacionados con microorganismos patógenos como *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia spp*, *Enterococcus spp*, etc. Entre estas, *Escherichia coli (E. coli)*, *Salmonella entérica* y *Staphylococcus aureus* se consideran las especies más importantes, propagándose a través de diversos alimentos en todo el mundo (Saleh Ibrahim *et. al.*, 2023). La presentación clínica más común de estas enfermedades suele ser un trastorno gastrointestinal, pueden presentarse también dolores abdominales, diarrea, náuseas, vómito, fiebre, etc (Wiwanitkit., 2018).

## II. MARCO TEÓRICO

Cuando estos microorganismos patógenos viajan desde su punto de origen hasta el ser humano usando como vehículos de transmisión a los productos alimenticios pueden causar diversas enfermedades (Farit *et. al.*, 2023). Si el consumidor es fuerte pero si el agente patógeno es extremadamente virulento se puede propiciar una enfermedad. Para promover la interrelación entre el huésped y el agente causal estos deben de existir en el mismo lugar y al mismo tiempo; también debe haber contacto entre el ser humano, un animal y el agente causal, esto puede ser un punto de partida del proceso fisiopatológico de la enfermedad en el organismo del ser humano o animal (Wiwanitkit, 2018). Estos patógenos provienen de diferentes fuentes encontrándose de manera común en plantas, suelo, el agua y los animales. La transmisión zoonótica se produce principalmente en la estadia de estos agentes en productos animales como las carnes, aves, huevos y productos lácteos. Los productos alimenticios también pueden llegar a contaminarse durante su procesamiento debido a que no se manejan de manera higiénica por parte de los trabajadores, esto en conjunto con la poca higiene puede resultar en contaminación cruzada (Farit *et al.*, 2023). Los microorganismos alimentarios por lo general incluyen microorganismos que se utilizan en la producción, microorganismos que provocan el deterioro de los alimentos y los que son transmitidos por los mismos alimentos. La contaminación microbiana en alimentos hace referencia principalmente al deterioro causado por microorganismos patógenos en las que se incluyen a las bacterias, hongos y virus (Fan *et. al.*, 2023).

### **2.4. Métodos de conservación de alimentos**

Los consumidores se preocupan por adquirir alimentos seguros que cumplan los estándares de calidad, tales como la calidad nutricional y sensorial, un tiempo largo de vida útil, y mantener la frescura del alimento (López *et. al.*, 2019). La demanda por alimentos que se encuentren listos para consumir o semiacabados ha ido en aumento en los últimos años, así mismo también aumentan los desafíos en la cadena de suministro particularmente con la globalización del comercio de los alimentos y el uso de instalaciones de procesamiento para la distribución de alimentos, por esto mismo es necesario tener alimentos con una vida útil prolongada para poder llegar a los segmentos de mercado más grandes, por otro lado la posibilidad de que los productos se deterioren y como consecuencia microorganismos patógenos los contaminen es una preocupación

constante. Por estas razones se utilizan diversos métodos de conservación esto con el objetivo de superar los problemas antes mencionados y garantizar la calidad y seguridad de los alimentos (Zhang *et. al.*, 2021).

### **2.4.1. Refrigeración y congelación**

Estas técnicas de conservación en alimentos se han utilizado por mucho tiempo, aunque hay que tener en cuenta que incluso con temperaturas bajas no se destruyen los microorganismos ni las enzimas, si no que solo se reduce su actividad, la conservación sólo se llevará a cabo si estas temperaturas bajas se mantienen, por esto mismo es importante contar con una cadena en frío eficaz durante la vida comercial del producto (Berk, 2018).

La refrigeración es un método de conservación que se destaca por evitar la adición de conservantes artificiales y no cambiar drásticamente las propiedades sensoriales de los productos alimenticios. Este proceso debe realizarse a temperaturas que oscilan entre 4°C. Un control inadecuado de las temperaturas recomendadas durante la refrigeración aumenta los riesgos de proliferación microbiana disminuyendo la vida útil de los alimentos (Tuany *et. al.*, 2021). El proceso de enfriamiento de los alimentos incluye diversos fenómenos físicos, como la transferencia de calor y masa (Kumar *et. al.*, 2023). Los alimentos al comportarse como un cuerpo caliente dentro del refrigerador y el flujo de la energía térmica son producidos por un proceso de difusión desde el interior hasta la superficie del alimento, a continuación, ocurre una disipación por convección al aire frío circundante. El flujo de aire elimina el calor de los alimentos y ayuda a distribuir la temperatura dentro del sistema de refrigeración (Tuany *et. al.*, 2021). La refrigeración acostumbra a ser obligatoria en todas las etapas de la cadena de suministro de alimentos, desde su procesamiento en granjas, así como en la industria alimentaria hasta su almacenamiento en refrigeradores domésticos antes de su llegada a los consumidores finales (Bigliaa *et. al.*, 2022).

Por otro lado la congelación reduce la actividad enzimática de los alimentos y por lo tanto prolonga la vida útil del alimento, pero cambia el estado físico de una sustancia para convertir el agua en hielo, en algunos casos esto provoca la pérdida de algunos nutrientes, por esto mismo el proceso debe de llevarse a cabo de manera cuidadosa para poder asegurar una conservación en buen estado (Aste *et. al.*, 2017). El proceso de

## II. MARCO TEÓRICO

congelación no esteriliza los alimentos, sin embargo, se extiende la vida útil de los productos porque el agua que se necesita para la actividad microbiana o bioquímica no se encuentra disponible (Shikha *et. al.*, 2016).

Generalmente un alimento es considerado congelado cuando su temperatura central es de aproximadamente de  $-18^{\circ}\text{C}$ , es recomendable que esta temperatura deba de mantenerse durante toda la cadena de suministro de frío, puesto que las variaciones de temperatura pueden provocar una descongelación parcial de los alimentos, dañando su estructura y reduciendo la vida útil de los mismos (Bigliaa *et al.*, 2022). Los pasos decisivos que definen un proceso de congelación involucran la formación de cristales de hielo (nucleación) y el aumento del tamaño de los cristales. La formación de un núcleo de cristal de hielo crítico es el primer paso para desarrollar un cristal de hielo, este suceso depende de la temperatura. A la temperatura en la que aparecen los primeros cristales de hielo se le conoce como punto de congelación o frecuentemente también se le denomina como temperatura inicial de congelación. Durante el proceso de congelación se elimina el calor sensible y latente (Shikha *et. al.*, 2016). El proceso de congelación se encuentra dividida en tres etapas: la primera etapa consiste en enfriar el producto desde la temperatura inicial hasta su punto de congelación inicial (etapa de pre-enfriamiento), la segunda etapa que consiste en eliminar el calor latente de cristalización (etapa de transición de fase) y la última etapa en la cual se reduce la temperatura a una temperatura de almacenamiento final (etapa de subenfriamiento) (Fadiji *et. al.*, 2021). En la primera fase los alimentos liberan calor sensible; el agua que se encuentra presente en los alimentos es eliminada en forma de hielo; y la concentración de solutos en la fracción que no se encuentra congelada aumenta a medida que avanza el proceso de congelación. En la segunda ocurre un ligero incremento de temperatura de manera inmediata después de la nucleación, que corresponde a la eliminación del calor latente; en esta etapa la mayor parte del agua se encuentra congelada y la mayor parte del calor latente es eliminada. En la tercera etapa de la congelación, la temperatura de los alimentos es reducida desde la temperatura de cambio de fase hasta la temperatura de congelación final. En esta etapa es liberada una cantidad pequeña de calor gracias al enfriamiento del hielo, y la mayor parte del agua restante se congela en esta etapa (Shikha *et. al.*, 2016).

### 2.4.2. Liofilización

La liofilización es una técnica de secado importante, esta técnica se ha convertido en uno de los procesos más importantes para la conservación de los alimentos. La liofilización se basa en la sublimación del disolvente de un producto. Este disolvente puede ser agua o un disolvente orgánico, el cual se cristaliza a bajas temperaturas y después se transforma directamente del estado sólido a la fase de vapor. La liofilización se realiza a bajas temperaturas, preservando las características de calidad de los alimentos limitando así los daños sufridos por los compuestos termolábiles (Waghmare *et. al.*, 2021). La temperatura del producto se lleva por debajo del punto de congelación y el agua se elimina sublimándola a vapor de agua a una presión inferior al punto triple del agua (Waghmare *et. al.*, 2023). Una desventaja que presenta este proceso es que suele ser costoso puesto que se requiere periodos de tiempo más largos y por consecuencia un consumo mayor de energía (Valadez *et. al.*, 2017). Por lo general el proceso de liofilización incluye tres procesos: congelación, secado por sublimación y secado analítico, entre los cuales la sublimación es el proceso principal de liofilización, y aproximadamente entre el 98 al 99% del disolvente de la muestra se eliminará mediante la sublimación directa de sólido a gas (Yang *et. al.*, 2024). En el proceso de liofilización primero la muestra se congela, después el agua congelada (hielo) se sublima al vacío (secado por sublimación), a continuación, se eleva la temperatura y se desorbe el agua descongelada. Dando como resultado un producto seco poroso el cual puede almacenarse sin congelar de manera preferente a temperatura ambiente, este puede durar almacenado por mucho tiempo, incluso años. La liofilización requiere un control cuidadoso para obtener un producto final de alta calidad. Este proceso requiere de control en parámetros como la temperatura a la que opera la máquina, la presión que hay en la cámara de liofilización y el tiempo utilizado para dicho proceso (Merivaara *et. al.*, 2021).

### 2.4.3. Esterilización

La esterilización es el proceso utilizado para la eliminación de microorganismos vivos y sus elementos germinativos como esporas y endosporas. El calor ha sido utilizado como un agente purificador y limpiador por mucho tiempo. Debido a la diferencia de temperatura, el calor se puede transferir de una forma a otra ya que es una forma de

energía que se puede mover por convección, radiación o conducción (Bharti *et. al.*, 2022). La esterilización es uno de los métodos de conservación de alimentos más eficaces y se ha utilizado ampliamente en casi todas las áreas de fabricación de alimentos. La esterilización se define como el proceso que puede proporcionar una inactivación casi completa de los microorganismos. La esterilización se logra aplicando calor de alta intensidad (121 a 140°C) a los productos alimenticios. Este proceso es utilizado para eliminar bacterias y esporas resistentes al calor, aunque por otra parte las limitantes de este proceso son las pérdidas de valor nutricional de los alimentos y los cambios que produce en el color, sabor y textura de los productos finales (Xiang y Farid, 2016).

### **2.4.4. Pasteurización**

La pasteurización es un método de conservación de alimentos en el cual se utiliza un tratamiento a altas temperaturas (Asadbeigi *et. al.*, 2023). La pasteurización tiene como objetivo la eliminación de bacterias patógenas en los alimentos y del deterioro e inactivación de enzimas indeseables que puedan encontrarse en los productos alimenticios, la intensidad y el tiempo de este proceso depende del tipo de alimento, el equipo con el cual se esté trabajando y el método utilizado que se esté llevando a cabo (López *et. al.*, 2016). La pasteurización se utiliza para la fabricación de productos alimenticios microbiológicamente seguros, teniendo en cuenta que con este proceso se logra reducir o inactivar un recuento microbiano, aunque con el uso de temperaturas altas también se tiene la posibilidad de afectar las propiedades sensoriales y funcionales de los alimentos (Figueroa-Sepúlveda *et. al.*, 2021).

### **2.4.5. Secado**

El secado es uno de los métodos más antiguos que se han utilizado como métodos de conservación en alimentos mediante la reducción de la actividad de agua ( $a_w$ ), lo que propicia un retardo en el deterioro de los alimentos debido a la inhibición del crecimiento microbiano, reacciones químicas y actividades enzimáticas (Ngamwonglumlert y Devahastin, 2018). El proceso de secado consiste en separar pequeñas cantidades de agua u otro líquido de un material sólido con el objetivo de reducir el contenido de líquido residual (Padilla-Frias *et. al.*, 2018). La eliminación de la humedad no solo inhibe el crecimiento microbiano, sino que también minimiza el peso total del producto, acorta el

espacio de embalaje y así minimiza el costo de embalaje y transporte (Huang *et. al.*, 2020).

Los objetivos del proceso de secado son: la conservación de los productos frescos, haciendo que estos se puedan encontrar disponibles durante todo el año; la conversión del producto fresco en seco conservando su calidad final y la reducción del volumen y peso del producto, esto con la finalidad de facilitar su transporte y almacenamiento; por último, el procesamiento sostenible, ya que los métodos de secado más populares utilizan grandes cantidades de energía con baja eficiencia. Así las nuevas tecnologías de secado deberían de aportar ventajas como una mayor eficiencia energética, mejor calidad en el producto, reducción de costos y un menor impacto ambiental (Calín Sánchez *et. al.*, 2020).

### **2.5. Empaques y recubrimientos**

Los materiales que se utilizan para envasado y empacado de alimentos por lo general siempre ha sido el plástico elaborado a base de petróleo, esto podría ser no tan beneficioso para el consumidor puesto que estos empaques pueden propiciar la migración de partículas microplásticas al alimento que pueden ingresar al organismo en conjunto con el alimento, algunos estudios revelan que se han encontrado partículas microplásticas en la sangre y en el tejido del ser humano, los microplásticos no degradables están asociados a enfermedades importantes (Zhang *et. al.*, 2023).

En los últimos años el desarrollo de nuevas tecnologías de envasado se ha acelerado de manera considerable debido a los crecientes requisitos de seguridad alimentaria y el cuidado en la nutrición de los consumidores. Una gran variedad de biopolímeros como los polisacáridos y las proteínas se han estado utilizando como apoyo en los envases actuales de alimentos, esto con el objetivo de reemplazar los materiales de la industria petroquímica. Estos envases relativamente nuevos han llamado la atención tanto de los consumidores como de los investigadores (Lan *et. al.*, 2021). El envasado en los alimentos se utiliza para brindarle protección y cumplir con la función de barrera en contra de la contaminación del ambiente y otros factores como la temperatura, daños mecánicos, gases, polvo, humedad, luz, microorganismos, etc. Los envases tienen el objetivo de prolongar la vida útil de los alimentos minimizando las pérdidas y desperdicios (Xiaohan *et. al.*, 2022).

## II. MARCO TEÓRICO

El envasado de alimentos se encuentra en el centro del ojo público y político en muchos países. Una de las soluciones que se presentan puede ser el reciclaje y el desarrollo de materiales de embalajes alternativos que minimicen la contaminación causada por los plásticos. Las soluciones en la actualidad apuntan prioritariamente en la disposición y los efectos sobre la salud del empaque primario el cual se encuentra en contacto directo con el producto y con los consumidores, sin embargo, los sistemas alimentarios también incluyen envases secundarios, estos permiten la carga en estantes y por último los envases terciarios que se encuentran diseñados para minimizar el estrés y los daños que puedan generarse a lo largo de la cadena de suministros (Chakori *et. al.*, 2022). Este problema puede resolverse mediante el desarrollo de materiales biodegradables que sustituyan a los no biodegradables. Entre numerosos enfoques en este campo, hay uno que propone el uso de materiales basados en polisacáridos. Estos polímeros son biodegradables, no tóxicos y son obtenidos a partir de recursos renovables. Son numerosas las investigaciones que desarrollan nuevas formulaciones mediante el uso de polímeros, mezclados con algunos compuestos funcionales (Aleksanyan, 2023).

Los recubrimientos comestibles surgen como respuesta directa a esta necesidad de ofrecer una solución viable y ecológica que promete redefinir los estándares de conservación de los alimentos. Entre los diversos métodos de conservación de alimentos, los recubrimientos comestibles han ido ganando popularidad considerable debido al importante potencial que tienen para prolongar la vida útil de los productos alimenticios. A parte de la utilidad de los recubrimientos comestibles su relevancia radica también en el concepto de sostenibilidad, el cual se considera cada vez más importante en cuanto a las prácticas modernas de la industria alimentaria (Juric *et. al.*, 2024). Según (Yaashika *et. al.*, 2023) los recubrimientos comestibles son microcapas de polisacáridos, proteínas, lípidos, compuestos bioactivos y materiales compuestos, los cuales son aplicados directamente rodeando la estructura del alimento mediante inmersión o pulverización, estos recubrimientos ofrecen protección contra la radiación UV, regulan la humedad y mantienen el equilibrio interno entre el soluto y el gas involucrado en el proceso de maduración y respiración de productos perecederos. Una de las características de los recubrimientos es la capacidad para ser ingeridos por los consumidores sin presentar riesgos para la salud (López-Polo *et. al.*, 2024). En estos recubrimientos también se

pueden agregar plastificantes y tensoactivos para mejorar las características del producto final como mayor flexibilidad y elasticidad (Leite *et. al.*, 2023). Como bien se mencionó estos recubrimientos generalmente se prepararán a partir de biopolímeros, cada grupo de material tiene beneficios, así como inconvenientes; los recubrimientos de proteínas y polisacáridos tienen características mecánicas fuertes, una buena barrera contra el oxígeno y humedad relativa intermedia y baja, aunque es una barrera débil contra el vapor de agua debido a su naturaleza hidrofílica, las proteínas utilizadas en los recubrimientos pueden ser de fuentes vegetales y animales, las proteínas animales pueden ser gelatina, proteína del suero, caseína, y las proteínas vegetales mayormente estudiadas suelen ser la zeína del maíz, el gluten de trigo y la proteína de soja; por otro lado los polisacáridos utilizados suelen ser el alginato y celulosa (Leite *et. al.*, 2023).

Por otro lado, los recubrimientos lipídicos proporcionan hidrofobidad y cohesión, estos proporcionan una buena barrera contra la humedad y el oxígeno, prolongando así la calidad de los alimentos a largo plazo, las ceras, los ácidos grasos, las resinas y los lípidos neutros son los compuestos lipídicos más utilizados para la fabricación de películas y recubrimientos comestibles (Devi *et. al.*, 2024). Estos recubrimientos comestibles sirven como portadores de sustancias activas como aromatizantes, probióticos, antioxidantes, y antimicrobianos que pueden actuar en la superficie de los alimentos. Los compuestos antimicrobianos son aditivos utilizados para controlar el deterioro por microorganismos, la mayoría de antimicrobianos se encuentran reconocidos como seguros (GRAS), actualmente se utilizan diversos tipos de compuestos antimicrobianos que de manera eficaz pueden incorporarse en los recubrimientos comestibles, entre los cuales se incluyen sustancias de fuentes vegetales como lo son los aceites esenciales, de fuentes animales como enzimas (lisozima y péptidos bioactivos), polisacáridos (quitosano y otros), y de fuentes microbianas como metabolitos (ácidos orgánicos y bacteriocinas) (Silva *et. al.*, 2023).

### **2.6. Aditivos antimicrobianos**

Los aditivos alimentarios son sustancias naturales o artificiales que son añadidos a los alimentos, esto como propósito de evitar su degradación, mejorar sus propiedades organolépticas y poder conservar su calidad, por lo que en los últimos años tanto la

industria alimentaria como la farmacéutica han desarrollado un especial interés en ellos, debido a sus diversas aplicaciones. Por ejemplo, los aditivos antioxidantes cumplen con el papel clave en la conservación en los alimentos y medicamentos del estrés oxidativo que provoca un deterioro rápido de ingredientes funcionales (Xiaoyan *et. al.*, 2024).

Según el Codex Alimentarius los aditivos son cualquier sustancia que normalmente no se utiliza como alimento ni como ingrediente alimentario, tenga valor nutritivo o no. Se añaden a los alimentos con fines sensoriales de usos múltiples durante el proceso de fabricación, procesamiento, envasado o transporte de los alimentos (Fawzy *et. al.*, 2024).

El uso de los aditivos se justifica solo cuando su uso corresponde a una necesidad tecnológica y responde a un objetivo definido de cumplir con una función tecnológica, preservar la calidad nutricional de los alimentos. La mayoría de los aditivos que se utilizan en la industria alimentaria son los aromatizantes, estos son añadidos para mejorar el aroma y sabor. Después encontramos a los preparados enzimáticamente los cuales se utilizan generalmente para productos de panificación, en la elaboración de zumos de frutas, en la elaboración de vino y cerveza y en la elaboración de quesos. otros aditivos ocupados son los colorantes, edulcorantes. Los colorantes son agregados cuando en los alimentos se requiere reemplazar los colores que fueron perdidos durante la preparación o para que su apariencia sea más llamativa. Los edulcorantes sin azúcar a menudo son añadidos cuando no se quiere utilizar azúcar, esto porque aportan menos calorías o ninguna cuando son añadidos a los alimentos (Nardo y Anfossi, 2020).

Los aditivos conservantes se encuentran agrupados en dos categorías: los antioxidantes y los antimicrobianos. Los antioxidantes ayudan a retrasar o prevenir el deterioro de los alimentos causado por procesos oxidativos; por otro lado, los agentes antimicrobianos inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos y de deterioro en los alimentos al combatir procesos clave en el metabolismo celular (Bolan *et. al.*, 2024). Uno de los antimicrobianos utilizados como aditivos son las bacteriocinas (Verma *et. al.*, 2022).

### **2.6.1. Bacteriocinas como agentes antimicrobianos**

Las bacteriocinas son péptidos o proteínas ribosómicas, antimicrobianos termoestables y de bajo peso molecular que son sintetizados por diversas especies de microbios, incluidas las BAL, y muestran actividades antimicrobianas contra bacterias patógenas en

## II. MARCO TEÓRICO

alimentos y cierto tipo de especies de hongos (Verma *et. al.*, 2022). Las bacteriocinas son incoloras, inodoras, por lo cual son una buena opción para los productos alimenticios puesto que no cambian sus propiedades, son estables a altas temperaturas, un bajo pH y a una diversa gama de concentraciones de sal (Aljohani *et. al.*, 2023). Las bacteriocinas se encuentran clasificadas en tres clases principales: clase I: pequeños péptidos modificados postraduccionalmente con una masa de molecular <5 kDa, clase II: bacteriocinas no modificadas con una masa molecular de 6 a 10 kDa y clase III péptidos más grandes > 10 kDa, termolábiles subdividiéndose cada uno en subclases. Las bacteriocinas tienen distintos mecanismos de acción y se pueden dividir en aquellas que promueven un efecto bactericida, con o sin lisis celular, o bacteriostáticas, que inhiben el crecimiento celular (Silva *et. al.*, 2018). La mayoría de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (BAL), de manera particular las que inhiben las bacterias gram positivas, ejercen su efecto antibacteriano al atacar los mecanismos asociados con la envoltura celular, los antibióticos y algunas bacteriocinas de clase II se dirigen al lípido II y eliminan la síntesis de peptidoglicano, otras bacteriocinas utilizan el lípido II como molécula de acoplamiento para poder iniciar la formación de poros, lo que da lugar a una variación del potencial de la membrana del citoplasma y finalmente la muerte celular. La nisina, la bacteriocina más estudiada hasta el momento es capaz de actuar bajo ambos mecanismos (Aljohani *et. al.*, 2023). La nisina, la pediocina y la micocina son las únicas bacteriocinas que se encuentran aprobadas por la FDA que se utilizan como conservantes de alimentos, al inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y patógenos transmitidos por alimentos (Naskar y Sun Kim, 2021). Principalmente son aplicados en productos lácteos, de manera especial en los quesos procesados (Aljohani *et. al.*, 2023).

### **2.6.2. Nisina**

La nisina es una bacteriocina antibiótica producida por *Lactococcus lactis* (Norouzi *et. al.*, 2018) por su origen natural y no toxicidad para el ser humano, este péptido antimicrobiano es de interés para la industria alimentaria. La nisina se encuentra compuesta por 34 aminoácidos de los cuales 13 se encuentran involucrados en modificaciones postraduccionales, induciendo la formación de cinco estructuras en forma

## II. MARCO TEÓRICO

de anillos. La nisina al atacar el lípido II de las formas vegetativas de bacterias gram positivas, la nisina interrumpe la transglicosilación, esto da lugar a la formación de poros en la membrana celular y a la inhibición de la biosíntesis de la pared celular. Aunque la nisina puede ser eficaz actuando sobre la pared celular de bacterias Gram positivas, las bacterias Gram negativas por lo general son resistentes, puesto que la membrana externa impide el acceso de la nisina a la membrana citoplasmática (Modugno *et. al.*, 2018; Chan *et. al.*, 2023).

La nisina cuenta con una amplia actividad inhibidora contra bacterias grampositivas, de manera particular contra bacterias formadoras de esporas como los *bacillus*, y *clostridium*, ya que las esporas son más sensibles a los péptidos que las células vegetativas. Hay que destacar también que la nisina muestra un gran potencial de inhibición contra algunos géneros de bacterias que nos forman esporas en las que se incluye la *Listeria*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Mycobacterium* y *Pediococcus*. Además, la nisina actúa contra las biopelículas bacterianas que forman estructuras complejas y confieren una mayor resistencia a los agentes antimicrobianos al alterar o prevenir su formación. La nisina muestra poca actividad antimicrobiana contra los hongos filamentosos, células de levadura y virus (D. Tavares *et. al.*, 2024).

La nisina es estable cuando los alimentos se almacenan refrigerados, demuestra estabilidad térmica, y se degrada en el sistema intestinal. La actividad antimicrobiana de la nisina contra las bacterias de los alimentos puede mejorarse aún más si se añaden junto con otros compuestos antimicrobianos (Shivae *et. al.*, 2021).

### III. ANTECEDENTES

La investigación de (Zhong *et. al.*, 2014) tuvo como objetivo evaluar el rendimiento de tres materiales de recubrimiento diferentes (quitosano, alginato de sodio y aislado de proteína de soja) y cuatro métodos diferentes de aplicación de recubrimiento (inmersión, recubrimiento, pulverización y pulverización electrostática) para recubrir queso mozzarella. Las propiedades de las soluciones de recubrimiento, la morfología y los cambios básicos de calidad del queso durante el almacenamiento a 4°C fueron evaluados. Se prepararon tres soluciones de recubrimiento diferentes: (1) 2 g/100 g de quitosano se disolvieron 0.5 g/100 g de glicerol (quitosano: glicerol = 1:4) en 1 g/100 g de ácido acético (CA); (2) Se disolvieron 1 g/100 g de alginato de sodio y 0.25 g/100 g de glicerol (alginato de sodio: glicerol = 1:4) en agua desionizada (SA); y (3) se disolvieron 5 g/100 g de aislado de proteína de soja y 1.25 g/100 g de glicerol (aislado de proteína de soja: glicerol = 1:4) en agua desionizada y se calentaron en un baño de agua a 80 °C durante 45 min (SP). Se eligieron cuatro métodos de recubrimientos diferentes: 1) inmersión (D); (2) bañar (E); (3) pulverización (S); y (4) pulverización electrostática (ES). El tiempo de recubrimiento se estableció en 30 s para CA y SA, y en 20 s para SP, excepto para el método de inmersión. En el proceso de inmersión el proceso de secado fue de 20 s para CA y SA. Después del proceso de recubrimiento las muestras se secaron al aire por 1h y se colocaron en recipientes de plástico y se almacenaron a 4°C por 14 días. En el método de inmersión las muestras se sumergieron directamente en la solución de recubrimiento durante el tiempo mencionado anteriormente; para el método de recubrimiento cada solución de recubrimiento se bombeó mediante una bomba peristáltica a través de un tubo de plástico con 6 mm de diámetro interior. La velocidad se controló a 50 mL/min, la boquilla de goteo a 2 cm de cada muestra se movió a mano para tener un recubrimiento completo. Tanto el método de pulverización como el de pulverización electrostática se llevaron a cabo mediante un pulverizador SC-ET. La pistola pulverizadora se fijó perpendicularmente aprox. 50 cm sobre una bandeja de metal con 3 muestras dispuestas en forma de triángulo. La tasa de pulverización y la presión de alimentación se establecieron en 3.8 L/h y 1.8 kg/cm<sup>2</sup>, respectivamente. Para la pulverización electrostática, el voltaje se estableció en 7.5 kV y la corriente de carga en 60 mA.

### III. ANTECEDENTES

En los resultados del espesor del recubrimiento, la superficie del recubrimiento mediante el método de inmersión fue compacta y lisa, sin poros ni grietas. En los dos métodos de pulverización, el espesor de la película disminuyó, pero la superficie del recubrimiento apareció rugosa con aparentes protuberancias distribuidas al azar. La superficie del recubrimiento mediante pulverización electrostática tuvo mayor suavidad que mediante el método de pulverización. Los valores de espesor por método de inmersión para los recubrimientos CH, SA y SP, fueron de aproximadamente 66.6, 71.9 y 81.8  $\mu\text{m}$  respectivamente, el espesor por el método por recubrimiento fue cercano a los valores por inmersión dando como resultado 64.6, 83.3  $\mu\text{m}$ . La pulverización dio resultados más pequeños, 30,6, 54,2 y 68,5  $\mu\text{m}$  para CH, SA Y SP y la pulverización electrostática mejoró la adhesión del CS sobre la superficie del queso y el espesor del recubrimiento aumentó a 10  $\mu\text{m}$  en comparación con el método de pulverización. En todos los casos, la pérdida de peso aumento de forma lineal con el paso del tiempo, las tasas de pérdida de peso fueron del 1.54%, 2.12% y 1.85% por día para el queso sin recubrimiento ( $R^2 = 0.99$ ), para el queso recubierto con SA por inmersión ( $R^2 = 0.99$ ) y queso recubierto SP mediante pulverización electrostática ( $R^2 = 0.99$ ). de manera general los quesos con recubrimiento tuvieron una menor pérdida de peso en comparación con los quesos sin recubrir. El análisis de dureza se realizó basándose en la prueba de compresión. La dureza del queso sin recubrir fue de 75.88 N el primer día. Después de ser recubierto, los valores de dureza del queso mostraron disminuciones significativas ( $P < 0.05$ ). La dureza del queso aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ) con el tiempo y el grado de aumento osciló entre 410.2 % y 990.5 % durante todo el tiempo. Se encontró que los recubrimientos comestibles retrasan el proceso de endurecimiento del queso encontrándose que los recubrimientos SA produjeron la textura más suave del queso, especialmente aplicado mediante dos métodos de pulverización.

**Tabla 3.** Aplicaciones de recubrimientos comestibles en alimentos, con nisina incorporada como antimicrobiano.

Alimento	Método	Referencia
Queso	Investigación de diferentes métodos de aplicación de recubrimientos sobre el desempeño de recubrimientos comestibles sobre queso Mozzarella.	Zhong <i>et. al.</i> , 2014
Queso	Recubrimiento comestible a base de almidón y quitosano para mejorar la vida útil del queso Bod Ljong.	Mei <i>et. al.</i> , 2015
Carne de pollo	Recubrimiento de alginato de sodio incorporado con nisina, <i>Cinnamomum zeylanicum</i> y aceites esenciales de romero sobre la calidad microbiana de la carne de pollo y el destino de <i>Listeria monocytogenes</i> durante la refrigeración.	Raeisi <i>et. al.</i> , 2016
Lomo de cerdo	Efecto del recubrimiento de quitosano/nisina/ácido gálico en la conservación del lomo de cerdo, con atmósfera modificada con alto contenido de oxígeno.	Warner <i>et. al.</i> , 2019
Queso Gouda	Recubrimientos comestibles sobre queso Gouda como barrera contra la contaminación externa durante la maduración.	Berti <i>et. al.</i> , 2019
Carne de cerdo	Incorporación de nisina y extracto de semillas de uva en un recubrimiento comestible de gelatina de quitosano y su efecto en el almacenamiento en frío de carne de cerdo fresca.	Xiong <i>et. al.</i> , 2020
Queso	Desarrollo de película biodegradable mediante adición de nisina Z a una matriz de hidroxipropilmetilcelulosa para la preservación del queso mozzarella.	Freitas <i>et. al.</i> , 2020
Jamón	Control de <i>Listeria monocytogenes</i> en loncheados de jamón ibérico curado mediante alta presión en combinación con un envase ecológico a base de quitosano, nisina y fitoquímicos de salvado de arroz.	Martillanes <i>et. al.</i> , 2021
Carne	Recubrimiento comestible de alginato de sodio con nanocápsulas de aceite esencial de canela y nisina sobre la calidad y vida útil de las rebanadas de carne durante la refrigeración.	Zhang <i>et. al.</i> , 2022
No aplica	Actividad antimicrobiana de bacteriocinas inmovilizadas en biopelículas de caseína.	Leyva, 2022
Manzana	Efectos del recubrimiento comestible de zeína-nisina sobre la carga fisicoquímica y microbiana de la manzana 'Granny Smith' después de un almacenamiento a largo plazo.	Belay <i>et. al.</i> , 2023
No aplica	Determinación de características fisicoquímicas y fenoles totales en biopelícula preparadas con bacteriocinas.	Girón, 2023

Los aditivos alimentarios se pueden clasificar en: conservantes, nutricionales, agentes colorantes, agentes saborizantes y agentes texturizantes. Entre los agentes conservantes podemos encontrar a la nisina (Bimpizas-Pinis *et. al.*, 2022). A continuación se describen algunas aplicaciones en diferentes alimentos en la Tabla 3.

La investigación de (Mei *et. al.*, 2015), tuvo como objetivo determinar la efectividad de los agentes antimicrobianos de pino incorporados en recubrimientos de almidón de quitosano sobre las características microbiológicas del queso Bod Ijong durante el almacenamiento refrigerado. Las soluciones formadoras de recubrimiento se prepararon utilizando una solución de quitosano (1.3%, p/v) dispersando quitosano en ácido acético al 1% (p/p) con agitación constante. Se dispersó almidón de castaña (WCS) en agua desionizada para obtener una solución de almidón al 1.5% (p/v). La solución se calentó a 75°C durante 60 minutos para producir una pasta. Luego se preparó la solución de almidón-quitosano mezclando 200 ml de pasta de almidón, 200 ml de solución de quitosano y 1.5 g de glicerol (plastificante) agitando durante 60 min. Las muestras se dejaron enfriar antes de añadir los antimicrobianos. Después del enfriamiento se añadieron extracto de fruto de *Cornus officinalis* (COFE) (1%p/p), NIS (10.000 UI/g) y aceite esencial de aguja de pino (PNEO) (0.35% v/v). Las muestras de queso (15g c/u) se sumergieron en la solución de recubrimiento dos veces durante 1 minuto, posteriormente se escurrieron sobre tamices de acero inoxidable durante 30 minutos después de la primera inmersión y durante 60 minutos después de la segunda inmersión. Las muestras control se sumergieron en agua destilada siguiendo el mismo procedimiento. Luego los quesos se dejaron durante 8 h a 12°C (85% HR) en una habitación a temperatura y humedad controlada hasta que el recubrimiento estuviera seco. Estos quesos se almacenaron por 12 h a 4°C, los quesos recubiertos fueron comparados con los no recubiertos (blanco negativo). El recuento microbiano se llevó a cabo antes de su envasado y después de 0, 5, 10, 15, 20 y 25 días de almacenamiento (12 °C, 85 % HR) en muestras de prueba y de blanco.

Las muestras fueron codificadas de la siguiente manera: WCSC-COAT (queso Bod Ijong recubierto con solución WCS-quitosano), WCSC-COFE-COAT queso Bod Ijong recubierto con solución WCSC que contenía 1% p/p (COFE), WCSC-PNEO-COAT queso Bod Ijong recubierto con solución WCSC que contenía 0.35% v/v (PNEO), WCSC-

### III. ANTECEDENTES

NISCOAT queso Bod Ijong recubierto con solución WCSC que contiene NIS (10.000 UI/g], NO-COAT (queso Bod Ijong sin recubrimiento). Los recuentos microbianos para el queso Bod Ijong fueron aproximadamente 6.6, 2.9, log UFC/g para APC (recuento aerobio en placa), mohos y levaduras. Los quesos envasados con o sin películas comestibles se monitorearon hasta que el recuento microbiano alcanzó un umbral microbiológico de estafilococos (<1000 log UFC/g) o hasta que aparecieron mohos visibles en su superficie durante el almacenamiento refrigerado. El APC de los quesos sin recubrimiento aumentó significativamente con el tiempo de almacenamiento, por el contrario, el APC disminuyó considerablemente con el tiempo en las muestras envasadas con WCSC-PNEO-COAT, WCSC-COFE-COAT y WCSC-NIS-COAT, alcanzando 5.9, 5.8 y 5.8 log UFC/g después de 25 días de almacenamiento, el queso que tuvo mayor APC fue el WCSC-COAT, para el queso WCSC-COAT se observó un APC similar dentro de los primeros 5 días de almacenamiento en comparación con el queso NO-COAT. El APC más bajo encontrado en el queso WCSC-COAT durante el almacenamiento (del día 5 al 15) no fue estadísticamente significativo ( $P > 0.05$ ), el APC aumentó a partir del día 15. Para el queso con COFE y NIS, el APC disminuyó gradualmente durante el almacenamiento refrigerado. Para el queso WCSC-PNEO-COAT, se encontró un APC más bajo desde el día 0 al día 20 y un APC más alto después del día 20.

Después de 15 días de almacenamiento a 12°C, el crecimiento de levaduras y mohos en la superficie de los quesos fue significativo en las muestras WCSC-NIS-COAT, WCSC-COAT y NO-COAT Bod Ijong la nisina tiene una eficacia mínima para inhibir el crecimiento de levaduras y mohos; por el contrario, las muestras de queso Bod Ijong tratadas con COFE o PNEO no mostraron crecimiento visible de levadura ni moho durante todo el período de almacenamiento.

El objetivo del estudio de (Raeisi *et. al.*, 2016), fue preservar la calidad microbiana de los filetes de carne de pollo durante un tiempo de almacenamiento utilizando soluciones de recubrimiento activo de alginato de sodio incorporadas con nisina, aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) y aceites esenciales de romero que se agregaron de manera individual y en combinación (CEO + REO). Se prepararon soluciones de alginato al (2% p/v) en agua destilada esterilizada a una temperatura controlada (80°C), esta

### III. ANTECEDENTES

mezcla se agitó hasta su completa solubilización. También se preparó una solución de cloruro de calcio (2% p/v) en agua destilada y se esterilizó en autoclave (121°C, 15 min). La solución madre de nisina se preparó disolviendo nisina en HCL (106 UI/mL) filtrando esta solución a través de un filtro de 0,2 µm de poro. Todas las soluciones se mantuvieron a 4°C; sin embargo, se calentaron a temperatura ambiente antes de su uso.

Para distribuir de forma correcta el CEO y REO en la solución de alginato y formar una solución estable se utilizó un emulsionante (tween 80, 0,2 g/g de REO) en la solución de alginato y se agitó durante 30 min a 40 °C las muestras de pollo se sumergieron en soluciones de alginato durante 5 min, se dejaron escurrir por 2 min y a continuación se sumergieron en la solución de CaCl<sub>2</sub> por 1 min para inducir la reacción de reticulación. Al final, las muestras se almacenaron a 4 °C y se analizaron periódicamente los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15. Se determinó el recuento total viable (TVC): El valor inicial (día 0) del TVC en la carne de pollo fue 3.6 log UFC/g indicando una buena calidad de la carne de pollo. Los valores de TVC de todas las muestras aumentaron durante el almacenamiento. Las muestras CON (muestras sin solución de recubrimiento) y ALG (muestras recubiertas con solución de alginato) tuvieron la tasa de incremento más alta durante el almacenamiento y el menor incremento durante el almacenamiento al igual que el menor índice lo presentaron los tratamientos combinados que incluyen muestras de CEO+REO, REO+N y CEO+N, respectivamente (P<0.05). El uso de individual de estos agentes mostró que la nisina es menos eficaz que los aceites esenciales para inhibir el incremento de los valores de TVC; sin embargo, la combinación de ambos (CEO+REO) fue más eficaz que su combinación con nisina (REO+N y CEO+N). Este resultado puede deberse al efecto inhibitorio de los antimicrobianos combinados que suprimen el crecimiento de los organismos de deterioro Gram positivos y Gram negativos. Si se toma en cuenta el valor de 7 log UFC/g, como nivel máximo aceptable del valor TVC para carne fresca de ave, los tratamientos combinados no alcanzaron este valor inclusive hasta el final del tiempo de almacenamiento (15 días).

Los valores iniciales de los recuentos psicrótrofos de las muestras estaban en el rango de 3.5 a 4.9 log UFC/g, similar a los resultados de TVC. Los valores iniciales de los recuentos psicrótrofos de las muestras estaban en el rango de 3.5 a 4.9 log UFC/g, similar a los resultados de TVC, el recuento psicrótrófico de todas las muestras aumentaron durante el almacenamiento y el efecto combinado de los antimicrobianos fue mayor que

### III. ANTECEDENTES

sus efectos antimicrobianos individuales, con el mayor efecto para la combinación CEO+REO. Las muestras CON y ALG tuvieron el valor más alto de recuento de bacterias psicotróficas (8.8 y 8.5 log UFC/g, respectivamente), seguidas de N (8.3 log UFC/g, respectivamente), CEO (7.8 log UFC/g), REO (7.2 log UFC/g), CEO+N (7.3 log UFC/g), REO+N (6.8 log UFC/g), y CEO+REO (6.3 log UFC/g) al final del periodo de almacenamiento (día 15).

El recuento de *Pseudomonas* fue de aproximadamente 3.6 log UFC/g, que aumentó durante el almacenamiento y alcanzó una población final de 7.8, 7.2, 7.1 y 7.0 log UFC/g en las muestras CON, ALG, N y CEO, respectivamente; mientras que la población final de las muestras REO, CEO+N, REO+N y CEO+REO fue de 6.5, 6.5, 6.2 y 5.9 log UFC/g, respectivamente. Estos recuentos indicaron que las muestras nunca alcanzaron el valor de 7 log UFC/g durante todo el periodo de almacenamiento. La población en todos los tratamientos fue significativamente ( $P < 0.05$ ) inferior a los del control. El recuento inicial de mohos y levaduras fue muy bajo (2.0 log UFC/g); sin embargo, durante el almacenamiento aumentó a una población final de 6.7 y 6.5 log UFC/g para la muestra CON y ALG, respectivamente, como tratamientos con los valores más altos de recuento de mohos y levaduras y 5.1, 5.5, 5.9 para CEO+N, REO+N y CEO+REO, respectivamente, como tratamientos con los valores más bajos de recuento (2,0 log UFC/g). Todos los tratamientos de este estudio causaron significativamente valores más bajos de recuento de levaduras y mohos desde el 6º día de almacenamiento hasta el final del mismo, en comparación con las muestras CON ( $P < 0,05$ ).

La investigación de (Warner *et. al.*, 2019). tuvo como objeto de estudio estudiar una combinación de nisina/ácido gálico/ quitosano y envasado en atmósfera modificada con alto contenido de oxígeno (HO MAP, 80% O<sub>2</sub>+ 20% CO<sub>2</sub>) sobre la conservación del lomo de cerdo fresco durante el almacenamiento en frío ( $2 \pm 1$  °C, 20 días). Se prepararon cuatro soluciones de recubrimiento: soluciones de quitosano (CHI), ácido gálico en solución de quitosano (CHI/GA), nisina en solución de quitosano y ácido gálico (CHI/N) y nisina en solución de quitosano (CHI//N/GA). La solución de recubrimiento de quitosano (CHI 2% p/p) se preparó añadiendo 20g de quitosano a 1000 mL de ácido acético al 1% p/v agitando a temperatura ambiente. Para preparar la solución de recubrimiento de

### III. ANTECEDENTES

quitosano nisina (CHI/N), se mezcló nisina al 0.2% p/p. Se añadió sucesivamente el ácido gálico (0.2% p/p) y nisina (0.2% p/p) en la solución de quitosano para formar una solución de recubrimiento CHI/N/GA. Las rodajas (5 cm) de la carne de lomo de cerdo y se dividieron en cinco grupos de tratamiento. A parte del grupo sin recubrimiento (CON), estas lonchas de cerdo se sumergieron respectivamente en cuatro soluciones de recubrimiento (CHI, CHI/GA, CHI/N, CHI/N/GA) durante 60 s y se secaron al aire durante 30 min a temperatura ambiente.

Las muestras de carne se envasaron en una envasadora para sellarlas con una película impermeable al oxígeno, después de llenarlas con gases mezclados 80% O<sub>2</sub> y 20% CO<sub>2</sub>. Tras el envasado las muestras de carne se almacenaron en un frigorífico (2 ± 1 °C) por un tiempo de 20 días. Los paquetes se abrieron y las muestras se analizaron cada 5 días durante los 20 días de almacenamiento, y el recubrimiento de cada muestra fue eliminada de manera aséptica con un cuchillo antes del análisis. Se determinó el recuento total de microorganismo viables (TVC) como indicador de crecimiento microbiano en las muestras de carne de cerdo. Este recuento en placas de agar se registró como log UFC/g tras incubación a 37°C durante 48 ± 2h. Este ensayo durante el tiempo de almacenamiento (20 días), fue de 2.71 log UFC/g, lo que nos indica una carga bacteriana baja. El TVC se incrementó significativamente (p<0.05) a 6.83, 6.41, 5.76, 5.95 y 4.67 log UFC/g para CON, CHI, CHI/GA, CHI/N y CHI/N/GA respectivamente en el día 20. En este estudio todas las muestras fueron inferior a 7 log UFC/g después de 20 días de almacenamiento, lo que demostró que el 80% de O<sub>2</sub> y 20% de CO<sub>2</sub> MAP a 4°C de almacenamiento podría efectivamente mantener la seguridad de la carne de cerdo en términos de TVC. El TVC de la muestra no recubierta (CON) fue significativamente (p<0.05) mayor que el de otras cuatro muestras recubiertas. Esto sugiere que el recubrimiento de quitosano solo o en combinación con ácido gálico y/o nisina fue capaz de inhibir eficazmente el TVC en lomo de cerdo HO MAP. Las muestras de carne de cerdo CHI/GA y CHI/N, y la combinación de CHI/N/GA mostraron el TVC más bajo (P<0.05).

El TVC significativamente inferior (p<0.05) de las muestras recubiertas con CHI/N/GA sugiere que existe un efecto bactericida sinérgico de estos tres agentes sobre los microorganismos de los lomos de cerdo sometidos a almacenamiento HO MAP en frío.

La investigación de (Berti *et. al.*, 2019), tuvo como objetivo estudiar el potencial de un recubrimiento comestible que contiene natamicina y nisina para proteger un queso Gouda

### III. ANTECEDENTES

semiduro de la contaminación de la superficie durante la maduración y evaluar si el recubrimiento afecta la progresión normal de la maduración. Las formulaciones de los recubrimientos fueron las siguientes: la primera (CNANI y queso-CNANI) se basó en una suspensión acuosa que contenía agua, natamicina y nisina (% p/p). las piezas de quesos (250g) se sumergieron en esta formulación por 10s, se retiraron y se dejaron escurrir por 20 s. Se llevaron a una cámara de temperatura ( $10 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y humedad de ( $79 \pm 7\%$ ), los pedazos de queso fueron pesados antes y después de la inmersión y escurrido.

La segunda formulación (GNANI y queso-GNANI) se basó en almidón de tapioca gelatinizado y glicerol que contenía natamicina y nisina. Se mezclaron almidón, glicerol, agua, natamicina y nisina. La gelatinización del almidón se realizó a una velocidad de calentamiento constante de aproximadamente  $1.5^\circ\text{C}/\text{min}$  hasta alcanzar una temperatura final de  $82^\circ\text{C}$ . Los trozos de queso se sumergieron en esta formulación durante 10 s, se retiraron y se dejaron escurrir durante 20 s. Posteriormente se deshidrataron en una estufa de secado por convección por 2 h a una temperatura de  $45^\circ\text{C}$ . las muestras se rotaron y se secaron por 15 min más. La eficacia de los antimicrobianos natamicina y nisina contenidos en GNANI y CNANI, Se evaluó sobre los microorganismos presentes en la superficie e interior del queso Gouda durante la maduración en momentos seleccionados (1, 4, 8, 11, 16, 22, 28 y 36 días).

Los quesos fueron colocados en cajas Petri y se almacenaron a  $10^\circ\text{C}$  y a 79%HR simulando la maduración por un tiempo de 15 días. Un grupo de quesos recubiertos con GNANI y CNANI fueron inoculados con *Listeria innocua* y *S. cerevisiae* por encima de los quesos cubiertos en el octavo día de almacenamiento. Antes de su inoculación, los quesos cubiertos con CNANI y GNANI se analizaron a los 0, 4 y 8 días para detectar el desarrollo de levaduras y *Listeria spp.* Se evaluó el desarrollo de BAL y la presencia de mohos mediante observación visual en los quesos recubiertos con CNANI y GNANI, así como su capacidad de barrera frente a *L. innocua* y *S. cerevisiae*.

En cuanto a los lactobacillus hubo un rápido crecimiento hasta el día 8 de maduración, después el aumento fue más paulatino hasta alcanzar un valor de  $10^7$  CFU/g sin diferencias significativas en los quesos. En cuanto a los mohos bastó con una observación visual directa a los quesos en el último día de maduración, se observó un mayor desarrollo de mohos en la superficie con CNANI que en la superficie del queso recubierto con GNANI. La presencia conjunta de nisina y almidón gelificado en GNANI

mostró mayor actividad contra especie de listerias que la (CNANI), por el contrario, la natamicina contenida en el recubrimiento con almidón gelificado (GNANI) mostró mejores resultados contra *S. cerevisiae* que cuando se aplica sobre queso Gouda como suspensión acuosa (CNANI).

La investigación hecha por (Xiong *et. al.*,2020), tuvo como objeto desarrollar un recubrimiento comestible incorporando extracto de semilla de uva y nisina en la solución de quitosano-gelatina e investigar su efecto sobre la conservación de la carne de cerdo fresca durante su almacenamiento en frío a una temperatura de 4°C por un tiempo de 20 días. El recubrimiento se preparó disolviendo quitosano en ácido acético al 1.5% (v/v) para preparar una solución de quitosano (CHI) al 1% (p/v). La gelatina se remojó y se hinchó en agua destilada toda una noche para poder preparar una gelatina al 3% (p/v) solución (gel). Se preparó una solución madre de nisina (105 UI/mL) disolviendo nisina en HCl 0.02M. El polvo del extracto de semilla de uva (GSE) se disolvió en agua destilada para preparar una solución al 0.5% (p/v) solución (GSE). Se prepararon 5 soluciones diferentes, a lo que correspondía: CHI 1% de quitosano; CHI-GEL 1% de quitosano + 3% de gelatina; CHI-GEL-GSE 1% quitosano + 3% gelatina + 0,5% GSE; CHI-GEL-NIS 1% de quitosano + 3% de gelatina + 0.1% de nisina y CHI-GEL-GSE-NIS 1% quitosano + 3% gelatina + 0,5% GSE + 0,1% nisina. También se preparó un grupo control (CON). Las soluciones de recubrimiento de quitosano-gelatina se mezcló a 70°C por un tiempo de 10 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron NIS y/o GSE y se procedió a mezclar.

El recuento total viable (TVC) de microorganismos en la carne de cerdo fresca fue de 2.51 log UFC/g el día 0 así como los valores de TVC de toda la carne de cerdo recubierta y no recubierta. Después de 20 días de almacenamiento en frío, el TVC de microorganismos en la muestra control (CON) mostró el crecimiento más rápido durante el almacenamiento siendo este significativamente más alto ( $P < 0.05$ ) que las demás muestras desde el día 5. El valor de TVC de 7 log UFC/g se puede utilizar como medida de calidad en la carne de cerdo, si el TVC es superior a este valor los microorganismos pueden estropear la carne. Todas las muestras de este estudio estaban por debajo de este nivel después del almacenamiento por 20 días en frío. Sin embargo, es importante señalar que el TVC de la muestra CON fue de 6.30 log UFC/g el día 20, muy cerca del

### III. ANTECEDENTES

límite, probablemente la muestra se hubiera descompuesto. Todas las muestras de este estudio se encontraban por debajo de este límite después del almacenamiento de 20 días. Tomando esto en cuenta entonces se puede indicar que el envasado a solo a 4 °C es eficaz para evitar que la carne de cerdo se descomponga. Si se compara con la muestra control (CON) con la muestra recubierta con quitosano (CHI) esta inhibió de manera eficaz el crecimiento de microorganismos a partir del quinto día. La muestra recubierta de gelatina (CHI-GEL) fue significativamente inferior ( $P < 0.05$ ) a la del recubrimiento de quitosano (CHI) solo en los días 15 y 20 lo que nos muestra una menor actividad antimicrobiana en la muestra CHI-GEL.

Por otra parte, no se observó ninguna diferencia de TVC ( $P > 0.05$ ) entre la muestra recubierta de quitosano-gelatina (CHI-GEL), la muestra recubierta con extracto de semilla de uva (GSE) (0.5%) y/o nisina (500 UI/mL) y las muestras con recubrimiento incorporadas (CHI-GEL-GSE, CHI-GEL-NIS y CHI-GEL-GSE-NIS) en los días 15 y 20. lo que indica que la adición de GSE y/o nisina no mejoró aún más el efecto antimicrobiano del recubrimiento.

La investigación de (Freitas *et. al.*, 2020) tuvo como objetivo de desarrollar recubrimientos incorporadas con el péptido nisina Z en la matriz HPMC, para obtener un material novedoso que proporcione actividad antimicrobiana, con el fin de mejorar la conservación del queso mozzarella durante su almacenamiento.

Se calentó 150 mL de agua desionizada a 80°C. Se añadió 2% p/v de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y un 20% (en peso) de glicerol, se mezcló la dispersión polimérica en un agitador magnético a 700 rpm por un tiempo de 5 min. Se añadió nisina Z en concentraciones de 0, 5, 10, 15 y 20% (en peso), la solución se vertió en una placa de vidrio con bordes y se dejó 72h a una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ .

La concentración mínima inhibitoria (CIM) de la nisina Z fue más eficaz en la inhibición de crecimiento microbiano de *S. aureus* Grampositivo y *L. innocua* que de la bacteria Gramnegativa *S. entérica Choleraesuis*. Siendo así para *S aureus* 0.19 (mg. mL<sup>-1</sup>), para *L innocua* 0.19 (mg. mL<sup>-1</sup>) y para *S. entérica Choleraesuis* 2.00 (mg. mL<sup>-1</sup>). En la actividad antimicrobiana in vitro no hubo acción inhibitoria en presencia de *S. entérica Choleraesuis*, independientemente de la concentración de nisina Z añadida en la HPMC, los tratamientos evaluados no fueron capaces de inhibir *S. entérica Choleraesuis* debido

a la escasa acción de la nisina Z contra los microorganismos Gram negativos, además las concentraciones de nisina pueden no haber sido suficientes para inhibir a *S. entérica Choleraesuis*. Para *S. aureus* y *L. innocua* se mostraron una zona máxima de inhibición al 10% en peso de adición de nisina Z en HPMC.

El objetivo del estudio de (Martillanes *et. al.*, 2021), fue evaluar el efecto de un envase a base de quitosano con nisina y un extracto de salvado de arroz (RBE) y/o un tratamiento HPP sobre la eliminación de *L. monocytogenes* en un jamón ibérico curado en seco listo para el consumo. Este tratamiento se aplicó sobre lonchas de jamón ibérico curado en seco envasados a base de quitosano con nisina añadida (NCP), extracto de salvado de arroz (RBECP), o una mezcla de ambos (N + RBECP). Las muestras se almacenaron 36 h a 4°C antes de que se realizara el análisis. Los recubrimientos se prepararon disolviendo quitosano (2% p/v) en una solución de ácido cítrico al 2%. A esta solución se le añadió glicerol en una solución al 50% (p/p) de quitosano. La disolución se agitó en un baño ultrasónico hasta su solubilización. Se añadió 0.15g de nisina y/o 0.25 g de RBE/100 g de solución formadora de película, las soluciones se vertieron en placas Petri de poliestireno (50g c/u) y se dejaron secar a temperatura ambiente por un tiempo de 24 a 48h hasta la formación de una película.

Una vez optimizado el tratamiento de alta presión, se estudió el efecto multi barrera de la combinación de HPP y el recubrimiento activo. Para ello, las muestras inoculadas envasadas con los diferentes envases activos a base de quitosano o en envases tradicionales (muestras control) se sometieron al tratamiento HPP optimizado y se compararon con muestras no tratadas con HPP. En todos los casos en los cuales no se aplicó el tratamiento con HPP a las muestras, hubo un efecto significativo en la reducción del microorganismo en comparación con la muestra control. De manera similar, combinar HPP con envases activos a base de quitosano fue significativamente más eficaz que simplemente aplicar el envase de manera individual. La mayor inactivación de listeria monocytogenes se produjo cuando se trató a tiempo y presión de 8 min y 600 MPa. En estas condiciones hubo una reducción máxima de  $3.1 \pm 0.7$  log UFC/g en comparación con el control.

### III. ANTECEDENTES

La investigación de (Zhang *et al.*, 2022), tuvo como objeto de estudio evaluar los recubrimientos SA (alginato de sodio) enriquecidos con CEO-NPs (nanocapsulas de aceite esencial de canela) y nisina agregados por su efecto sobre la calidad de las rebanadas de carne de res durante 15 días de almacenamiento refrigerado. Para la preparación de los recubrimientos SA, se disolvió SA al 0.5% (p/v) en agua destilada en agitación constante a una temperatura de 75°C por un tiempo de 1.5 h. A continuación, se mezclaron las nanocapsulas de aceite esencial de canela (CEO-NPs) y la nisina en una solución de película para concentraciones finales de 2 g/L de CEO-NPs y 0.2 g/L de nisina en la solución de película SA.

Las muestras de la carne se dividieron en 5 grupos: carne sin recubrir (control), carne con recubrimiento comestible SA (SA), carne con SA más 2g/L de recubrimiento comestible CEO-NP (SA-2CEONP), carne con SA. más 0.2 g/L de recubrimiento comestible de nisina (SA-0.2nisina), y carne con SA más 1 g/L de CEO-NPs más 0.1 g/L de recubrimiento comestible de nisina (SA-1CEO-NPs-0.1nisina). Las muestras de la carne de res fueron recubiertas mediante inmersión en una dispersión de recubrimiento SA por un tiempo de 30 s, se secaron en parrillas por un tiempo de 5 min y posteriormente se volvieron a sumergir por 30s, después las muestras se sumergieron en una solución de CaCl<sub>2</sub> al 2% para formar los recubrimientos, estas muestras se empacaron en bolsas estériles y se almacenaron a 4 ± 1°C por un tiempo de 15 días. Cada tres días se realizaron el análisis microbiológico y sensorial para determinar los efectos de los recubrimientos comestibles. La determinación de las bacterias totales (TBC) se llevó a cabo en placas de agar PCA, la incubación se llevó a cabo a 37°C por 48 h. La evaluación sensorial de las muestras se llevó a cabo por 10 miembros capacitados del laboratorio de calidad y seguridad de productos animales (universidad agrícola de Sichuan, China). Los parámetros evaluados fueron color (0 a 20 puntos), olor (0 a 20), textura (0 a 30), calidad del líquido que se escapó de la carne (0 a 30) y aceptabilidad general (0 a 100). En el recuento de las bacterias totales (TBC) en la carne de vacuno durante el almacenamiento en frío, aumentó continuamente con el aumento del tiempo de almacenamiento, el grupo control tuvo la población más alta. El nivel inicial de microorganismos en todas las muestras de carne de vacuno era relativamente bajo, de 3 a 4 log UFC/g. Sin embargo, a los 9 días de almacenamiento, la TBC en el grupo control

### III. ANTECEDENTES

superó el límite estándar alcanzando 6.07 UFC/g, en el día 12 os TBC de los grupos SA, SA-0.2nisina y SA-2CEO-NP superó el límite estándar, alcanzando 7.1, 7.02 y 6.05 log UFC/g, respectivamente. El TBC en el grupo SA-1CEO-NPs-0.1nisin no superó el límite estándar al final del período de almacenamiento. Los TBC en el grupo SA y el grupo control no fueron significativamente diferentes. El recubrimiento comestible SA podría utilizarse como obstáculo a efectos externos, dificultando la contaminación por microorganismos aeróbicos El recubrimiento comestible SA preparado con nisina o CEO-NP inhibió significativamente el crecimiento de microbios y extendió la vida útil de la carne, aunque el recubrimiento SA con CEO-NP fue más efectivo. En la evaluación sensorial se observó que con el tiempo de almacenamiento las puntuaciones de color de todas las muestras de carne de vacuno disminuyeron especialmente en la muestra control, esta tuvo la puntuación más baja (9.14) en el día 15. Las puntuaciones de color de todas las muestras de carne de vacuno con tratamientos de recubrimiento disminuyeron ligeramente durante el almacenamiento, especialmente para las muestras de carne de vacuno recubiertas con SA-0.2 nisina y SA-1CEO-NPs-0.1 nisina. Estos resultados indican que los tratamientos de recubrimiento retardaron eficazmente los cambios de color en las muestras de carne de vacuno, y el color rojo se desvaneció más lentamente cuando las muestras de carne de vacuno fueron recubiertas con estos dos tratamientos. Las muestras de carne de vacuno recubiertas con SA-1CEO-NPs-0.1nisina obtuvieron la puntuación más alta de aceptabilidad del color (14.94) al final del periodo de almacenamiento. Las muestras de carne de res en el presente estudio no difirieron significativamente en olor hasta el día 6 de almacenamiento, sin embargo, después del día 9, las puntuaciones de olor de las muestras de control fueron más bajas que las de las muestras recubiertas. De los tratamientos de recubrimiento, las muestras de SA-1CEO-NPs-0.1nisina tuvieron la puntuación de olor más alta (15.27) en el día 15, lo que puede atribuirse a los efectos inhibidores de las CEO-NPs y la nisina sobre los microorganismos, mejorando así el olor de la carne.

En la investigación hecha por (Leyva, 2022). Se evaluó la actividad antimicrobiana Evaluar la actividad antimicrobiana de biopelículas de caseína y bacteriocina sobre *Listeria monocytogenes*. Se preparo una solución formadora de película (SFP), mezclando 3 g de grenetina y 97 mL de agua destilada en una placa calefactora con

### III. ANTECEDENTES

agitación con una temperatura de 40 a 50°C hasta su completa homogenización de manera simultánea, se preparó la formulación (F) en otra placa calefactora con agitación esta consistió en la mezcla de 2.5 % p/v de bacteriocina 25 y/o 50 % p/v de caseína, 25 y/o 50 % v/v de glicerol y agua destilada si la F lo requería para lograr el 10% p/v. Tanto la SFP y F se llevaron a una agitación media durante 30 min. Después de la dispersión completa, se incorporó la F a la SFP y se mezclaron durante 10 min a temperatura ambiente. El resultado de la mezcla se vertió en la misma cantidad sobre placas de vidrio para secar en un horno de convección forzada a 35°C durante 24 h. Cuando las películas se secaron se almacenaron en un desecador.

Las biopelículas de natamicina fueron nombradas de la siguiente manera: NA2525, NA2550, NA5025, NA5050 y las biopelículas de nisina fueron nombradas NI2525, NI2550, NI5025, NI5050, así mismo se preparó un control.

De manera general las películas de natamicina presentaron un diámetro mayor a las de nisina, La biopelícula NA2525 presentó el mayor diámetro (94.04 mm), mientras que la biopelícula NI5025 presentó el menor (66.90 mm). Existió diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) en el diámetro de la biopelícula NI5025 con respecto a todas las biopelículas preparadas incluyendo la biopelícula control. Las biopelículas preparadas con natamicina NA2525, NA5050, NA2550 y NA5025 no mostraron diferencia estadística ( $P \leq 0.05$ ) en el diámetro. Por otra parte, el análisis estadístico demuestra que el espesor es similar en las biopelículas preparadas con caseína y natamicina NA2525, NA5025, NA5050 y NA2550. La biopelícula de menor espesor fue NA2525 (0.165 mm) y la de mayor espesor fue NI5050 (0.312 mm). Las biopelículas de caseína y natamicina (NA2525, NA2550, NA5025 y NA5050) tienen un espesor que va de 0.165 a 0.225 mm. Las biopelículas que tuvieron un menor contenido de humedad fueron NI5025 (34.01 %), NI2525 (35.20 %), NA5025 (36.70 %) y NA2525 (39.57 %); todas por abajo del 50 % y sin diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre ellas. Por otro lado, las biopelículas restantes presentaron un contenido de humedad mayor al 50 % incluyendo la biopelícula control. En cuanto a la capacidad de retención de aceite (CRA) se observó que las biopelículas NI5025 y NA5025 con la misma concentración de caseína y glicerol como plastificante presentan la mayor CRA, 0.238 y 0.231 g/g respectivamente, pero sin diferencia estadística entre ellas. Solo estas dos biopelículas mostraron diferencia en CRA respecto

al control. La CRA de las biopelículas NA2525, NA2550, NA5050, NI2525, NI2550 y NI5050 fueron similar entre ellas con valores entre 0.144-0.195 g/g.

En cuanto a la actividad antimicrobiana las biopelículas preparadas con natamicina (NA2525, NA5025, NA2550 y NA5050) como las biopelículas con nisina (NI2525, NI5025) presentaron actividad bactericida. Los controles no presentaron crecimiento microbiano. Solo NI2525 y NI5025 presentaron halos de inhibición, por otro lado, las biopelículas con natamicina presentaron halos de inhibición en todos los tratamientos, pero el tratamiento NA2550 fue el que presentó el halo de inhibición de mayor tamaño (35.57 mm), seguido de NA5025 (33.01 mm) mientras que el tratamiento NI5025 presentó el halo de inhibición más pequeño (10.89 mm).

En el estudio hecho por (Belay *et. al.*, 2023), se tuvo como objetivo determinar los efectos inhibidores del recubrimiento de zeína incorporado con nisina sobre la carga microbiana de la superficie de manzanas "Granny Smith" durante el almacenamiento en condiciones de venta al por menor. La preparación de los recubrimientos se hizo disolviendo 2% de zeína en polvo y 15 mL de glicerol en 500 mL de etanol acuoso (95%) a 95°C. El recubrimiento de zeína con nisina se preparó mezclando 0.75g de nisina con 50g de zeína en polvo en etanol acuoso al 95% caliente (95°C) con una agitación constante por 30 min. Se dejó enfriar la solución a temperatura ambiente con agitación continua. Las frutas se clasificaron en tres categorías para los tres tratamientos: (a) control (sin recubrimiento), b (zeína) y c (recubrimiento de nisina-zeína). Utilizando el método de inmersión se aplicaron cantidades iguales sobre la superficie de las manzanas, para cada tratamiento las frutas se sumergieron en las soluciones de recubrimiento por un tiempo de 1 min. Las frutas recubiertas se dejaron secar al aire a temperatura ambiente (23°C). Se designó como control la manzana sin ningún recubrimiento. Todas las muestras se almacenaron a una temperatura de 15°C, el muestreo se llevó a cabo en los días 0, 7, 14 y 21.

Durante todo el periodo de almacenamiento hubo un aumento en el recuento de bacterias mesófilas aeróbicas en la fruta control, el recuento total de bacterias mesófilas aerobias en las manzanas de control aumentó de  $2.9 \pm 0.33$  log UFC cm<sup>-2</sup> el día 0 a  $3.7 \pm 0.06$  log UFC cm<sup>-2</sup> al final del almacenamiento (día 21). En cambio, en las muestras recubiertas con zeína y zeína-nisina, el recuento de bacterias mesófilas aerobias disminuyó

### III. ANTECEDENTES

significativamente en comparación con el control. Los efectos inhibidores de los recubrimientos sobre la superficie de la manzana fueron de una reducción  $\approx 2$  Log en el día 7. Al final del almacenamiento, el recuento total de bacterias mesófilas aerobias de  $2.4 \pm 0.37$  log UFC  $\text{cm}^{-2}$  y  $2.2 \pm 0.03$  log UFC  $\text{cm}^{-2}$  para las manzanas recubiertas con zeína y zeína-nisina fue significativamente inferior al control ( $3.7 \pm 0,06$  log UFC  $\text{cm}^{-2}$ ). En el recuento de mohos y levaduras se mostró un aumento gradual a lo largo del estudio para las muestras control, donde el recuento aumentó de  $2.5 \pm 0.19$  log UFC  $\text{cm}^{-2}$  el día 0 a  $\approx 3.9$  log UFC  $\text{cm}^{-2}$  al final del día 21. Este recuento fue significativamente menor en las muestras recubiertas observándose la mayor inhibición en las muestras de zeína-nisina desde el día 7 hasta el día 21 ( $p \leq 0.05$ ). Si se compara los resultados obtenidos para las muestras de zeína sola y zeína-nisina, el recuento de mohos y levaduras aumentó a  $\approx 3.0$  log UFC  $\text{cm}^{-2}$  y  $3.0$  log UFC  $\text{cm}^{-2}$  ( $p \leq 0.05$ ), respectivamente, al final del almacenamiento, esto evidencia que la eficacia inhibidora microbiana del recubrimiento de zeína se vio mejorada al incorporar la nisina.

En la investigación de (Girón, 2023) se tuvo como objetivo determinar características fisicoquímicas y compuestos fenólicos en biopelículas preparadas con caseína, plastificante y bacteriocina. Las biopelículas se prepararon con una base de 100 mL donde el 3 % en peso fue de gretina y 97 % de agua destilada (SFP), los componentes fueron mezclados en una placa térmica con agitación con velocidad media y un intervalo de temperatura de 40-45 °C durante 30 min. Independientemente se preparó una solución con la formulación (F) usando una base de 10 mL en la cual se mezclaron en diferentes proporciones caseína 25 y 50 % (p/v), glicerol 25 y 50 % (v/v), bacteriocina 0.5 % en peso y agua destilada. Después de la homogenización de ambas suspensiones SFP y F se mezclaron en un mismo recipiente hasta obtener una solución formadora de película con formulación SFPF que se homogeneizó con ayuda de una placa con agitación por 10 min a temperatura ambiente. Se obtuvo la mezcla SFPF la cual se vertió sobre placas de vidrio que se secaron en un horno de convección a 35°C durante 24 h.

Se obtuvieron valores muy variados en las dimensiones de las biopelículas, por una parte, existe una similitud para los tratamientos de natamicina donde el intervalo es entre 89.30 mm y 94.11 mm, valores cercanos en comparación con las biopelículas de nisina que van desde 66.90 mm hasta 83.05 mm. todas las biopelículas preparadas con natamicina

NA2525, NA5050, NA2550 y NA5025 no mostraron diferencia estadística ( $P \leq 0.05$ ) en el diámetro. En cuanto a las biopelículas de nisina, la biopelícula de mayor espesor fue NI5050 con 0.312 mm, mientras la de menor espesor fue NA2525 con 0.165 mm. El análisis estadístico demostró que el espesor fue similar en las biopelículas preparadas con caseína y natamicina NA5050 y NA2550. En cuanto a la capacidad de solubilidad en agua (CSA), se observó que la biopelícula NA2525 tuvo menor CSA 48.82 % en comparación con la biopelícula NA2550 con 67.57 % de capacidad. Todas las biopelículas con mayor proporción de glicerol, NI5050, NI2550, NA5050 y NA2550 la CSA aumentó progresivamente (62.13, 64.92, 65.66 y 67.57 % respectivamente). Así mismo estas biopelículas mostraron la misma CSA que la biopelícula control.

En cuanto a la determinación de fenoles totales, se observó que las biopelículas preparadas con nisina, NI2525, NI2550 y NI5050 no mostraron diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.05$ ) en la concentración de galato por L de muestra analizada (216.87, 227.94, y 205.0 mg/L respectivamente). Se observó que solo NI5025 con un valor de 232.04 mg/L fue ligeramente diferente al control (166.86 mg/L).

En cuanto a las biopelículas de natamicina los resultados quedaron de la siguiente manera, mostrando una relación en la composición de galato/L: NA2550 < NA5050  $\leq$  NA5025 y NA2525 (148.49, 263.41, 314.37 y 330.13 respectivamente). Solo las biopelículas NA5025 y NA2525 son las que presentan una cantidad mayor de galato/L comparadas con la biopelícula control. La biopelícula NA2550 (148.49 mg galato/L) no mostró menor concentración de EG/L comparada a la película control (166.86 mg galato/L).

### **3.1. Justificación**

La creciente población mundial, junto con la creciente demanda de alimentos frescos, seguros y nutritivos, ha hecho de la conservación de los alimentos un área de sumo interés. Los desafíos a nivel mundial asociados a garantizar la seguridad alimentaria, así como su sostenibilidad, ha hecho que el desarrollo de nuevas tecnologías de conservación de alimentos se haya convertido en el centro de atención dentro de la industria alimentaria. A medida que aumentan los esfuerzos por minimizar los impactos de los métodos de conservación tradicionales sobre el contenido nutricional, la calidad, seguridad y salud ambiental, en particular de aquellos métodos que dependen de materiales no biodegradables como los plásticos, se encuentran en el ojo público y político. El uso de plásticos en los envases de alimentos, a pesar de que su función sea prolongar la vida útil de los alimentos mediante la protección de barreras, crea preocupaciones a nivel mundial debido a su gran contribución a la contaminación plástica y a su poca degradación a largo plazo. Este problema ambiental en conjunto con la demanda de los consumidores por alternativas más seguras y ecológicas incita a un cambio sobre las técnicas de conservación innovadoras. Los recubrimientos comestibles surgen como una respuesta ante estas necesidades, estos nos ofrecen una solución viable y sostenible. Entre los diversos métodos de conservación de alimentos los recubrimientos comestibles han ido ganando reconocimiento, debido a su importante papel al extender la vida útil de los productos alimenticios. Aparte de la utilidad de los recubrimientos comestibles en cuanto a la conservación de los alimentos, su relevancia radica en que estos van de la mano con el concepto de sostenibilidad del medio ambiente. La caseína como material en los recubrimientos comestibles representa una buena opción por su bajo costo, obtención accesible, alto valor nutricional, no toxicidad, las propiedades que aporta a los recubrimientos, estas propiedades se pueden fomentar con plastificantes como el glicerol; la nisina es la bacteriocina con más investigaciones realizadas como conservante antimicrobiano en alimentos, es un aditivo considerado como seguro. En este trabajo se estudió la actividad antimicrobiana de la nisina incorporada a recubrimientos comestibles a base de caseína evaluando su efecto antimicrobiano en bacterias aerobias, bacterias coliformes, mohos y levaduras, esto con el objetivo de tener en cuenta su importancia como método de conservación en la industria alimentaria.

### **3.2. Hipótesis**

La incorporación de la nisina en la formulación de recubrimientos comestibles de caseína, tiene capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias aerobias en placa, bacterias coliformes, mohos y levaduras, cuando se emplea como recubrimiento comestible del queso de hebra (pasta hilada).

### **3.3. Objetivos**

#### **3.3.1. General**

Evaluar el efecto antimicrobiano (bacterias aerobias en placa, bacterias coliformes, mohos y levaduras) en queso de pasta de hebra (pasta hilada); empleando recubrimientos comestibles preparadas con caseína y nisina.

#### **3.3.2. Específicos**

- Reproducir la elaboración de biopelículas empleando nisina como antimicrobiano inmovilizado, en recubrimientos de caseína por el método de vaciado en placa.
- Determinar pH, T, densidad, acidez y prueba de alcohol en leche empleada como materia prima para la elaboración de queso de hebra (pasta hilada).
- Preparar queso de hebra (pasta hilada) por el método de fermentación enzimática.
- Determinar la actividad microbiana (aerobias en placa, bacterias coliformes totales, mohos y levaduras) en el queso de hebra.

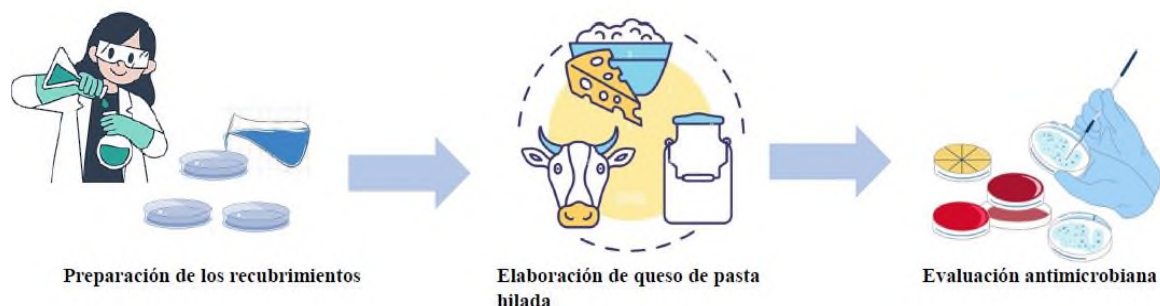
## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Reactivos y materia prima

Todos los aditivos empleados en la sección experimental fueron grado alimenticio. La caseína se adquirió de Glanbia Nutritionals, la grenetina y glicerina de Additius México y la nisina de Weiri Biotech China. Los reactivos para el análisis microbiológico: cuenta estándar de bacterias mesófilas, mohos y levaduras y coliformes totales fueron adquiridos de MCD LAB México, el agua utilizada fue agua destilada. Toda la leche empleada en esta investigación se adquirió en el Rancho ganadero Corriente Larga ubicado en la comunidad Santa Sofía perteneciente al municipio de Santa María Jacatepec Tuxtepec, Oaxaca con las coordenadas: Longitud -96.20992 y Latitud 17.86021.

### 4.2. Métodos

La metodología general se dividió en tres etapas (Figura 1): la primera consistió en la selección y preparación de los recubrimientos de caseína con nisina derivado del trabajo experimental realizado por Leyva-Hernández (2022). En la segunda etapa se realizó la preparación del queso de pasta hilada y la aplicación de los recubrimientos después de 36 h de conservación a temperatura de refrigeración (4°C) utilizando un refrigerador doméstico (MABE). En la tercera etapa se llevó a cabo la evaluación microbiológica de acuerdo a lo establecido por la NOM-243-SSA1-2010. La parte experimental se realizó durante los meses de septiembre a enero del año 2023 en el Taller de alimentos ubicado en la Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec.



**Figura 1.** Metodología general empleada en el desarrollo experimental

#### 4.2.1. Selección y preparación de recubrimientos de caseína/nisina

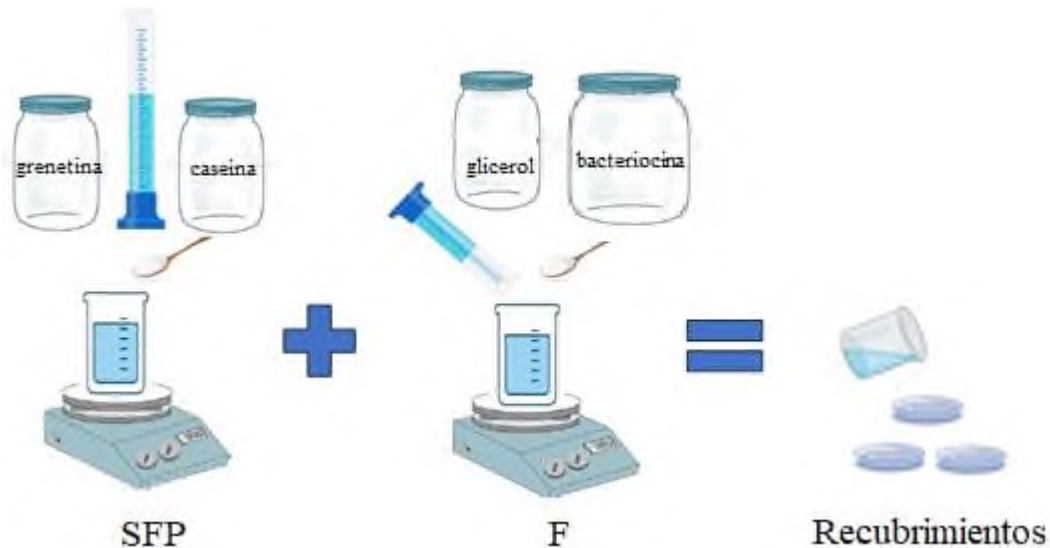
Se prepararon 4 lotes de recubrimientos diferentes con sus respectivos duplicados y blancos (sin nisina). Los recubrimientos se elaboraron de acuerdo a la metodología descrita por Leyva-Hernández (2022) y Girón-Campechano (2023) con algunas modificaciones. Se utilizó el método de vaciado en placa y las proporciones de cada formulación se indican en la tabla 4. Estas formulaciones se eligieron en función de los resultados obtenidos por Leyva-Hernández (2022) quien evaluó el diámetro del halo de inhibición sobre la bacteria patógena *Listeria monocytogenes*, en un tiempo de exposición de 24 h a 37 °C sobre Agar Muller-Hinton.

**Tabla 4.** Proporciones empleadas en la elaboración de las biopelículas, Leyva-Hernández (2022) y Girón-Campechano (2023).

Lote	Formulación	Caseína	Glicerol	Bacteriocina
Blancos	B2525	25	25	Sin bacteriocina
	B2550	25	50	Sin bacteriocina
	B5025	50	25	Sin bacteriocina
	B5050	50	50	Sin bacteriocina
I	Ni2525	25	25	Nisina
II	Ni2550	25	50	Nisina
III	Ni5025	50	25	Nisina
IV	Ni5050	50	50	Nisina

Se utilizó una solución formadora de biopelícula (SFP) siempre en la misma proporción mezclando 3 g de grenetina y 97 mL de agua destilada junto con la caseína (25 y/o 50 % p/v), la mezcla se colocó en un vaso de precipitado de 400 mL sobre una placa calefactora (Scorpion Scientific) con agitación controlada por un tiempo de 30 min y una temperatura de 35°C. La F se incorporó después de la homogenización completa de la SFP, la nisina (2.5 % p/v) se añadió junto con el glicerol (25 y/o 50 % v/v) y se dejó en agitación por un

tiempo de 10 min a una temperatura de 30 °C, el procedimiento se muestra en la Figura 2. La mezcla se vació en proporciones de 25 mL sobre placas de vidrio para deshidratarse en un horno de convección forzada (BINDER) a 35 °C durante 24 h. Después del secado, los recubrimientos se despegaron de las placas de vidrio de manera cuidadosa y se almacenaron en un desecador hasta su utilización. Tanto la preparación como el despegado de los recubrimientos se realizaron en una campana de extracción.



**Figura 2.** Esquema de preparación de los recubrimientos. Preparación de la solución formadora de película (SFP), formulación (F) y recubrimientos por el método vaciado en placas de vidrio.

#### 4.2.2. Pruebas de plataforma en leche fresca de bovino

Se evaluó la calidad de la materia prima empleando pruebas de laboratorio sugeridas por Chacón-Villalobos (2008). Se analizaron todos los lotes de leche antes de su utilización con el propósito de identificar las características químicas cualitativas y de esta forma tomar la decisión de su uso en el proceso de transformación. Las pruebas (Figura 3) se describen a continuación.

**A) Potencial de hidrógeno.** Se utilizó un potenciómetro (Thermo Scientific, Orion Star A211) calibrado, se añadieron 30 mL de la leche fresca en vasos de precipitado de 100 mL y se midió el pH de cada muestra, se enjuagó el electrodo con agua destilada entre

cada medición, posteriormente se registraron los datos. La lectura del pH se realizó por duplicado para cada lote de leche.



**Figura 3.** Pruebas de plataforma en leche fresca. A) potencial de hidrógeno, B) densidad, C) prueba de alcohol y D) acidez titulable.

**B) Densidad.** La determinación de la densidad se realizó utilizando un lactodensímetro con un termómetro a escala de 10 a 30°C y una escala de 1.015-1.040 g/mL, esta escala mide la profundidad a la que el lactodensímetro se hunde en la leche proporcionando así la densidad.

Se colocó de manera cuidadosa el lactodensímetro dentro de una probeta de 1000 mL que contenía la muestra de leche fresca. Se dejó flotar libremente por un minuto, una vez estable se realizó la lectura.

**C) Prueba de alcohol.** La evaluación consiste en mezclar en partes iguales (50/50) una porción de leche fresca por otra porción de  $C_2H_5OH$  al 72 % v/v. Si la proteína de la leche fresca presenta poca estabilidad pueden aparecer coágulos que serán más grandes entre más acidificada se encuentre la muestra de leche fresca. Por medio de esta prueba es posible establecer la estabilidad al calor que tienen las proteínas de la leche, propiedad que depende de las posibles fermentaciones generadas por los microorganismos Chacón-Villalobos (2008). Con ayuda de una pipeta volumétrica se obtiene 2 mL de leche y se coloca en tubos de ensayo, se agrega 2 mL de  $C_2H_5OH$  al 72%, se mezcló y se observó si había formación de grumos. Los resultados fueron reportados como positivo o negativo.

**D) Acidez titulable.** La acidez se determina por medio de un análisis volumétrico de titulación ácido-base empleando disoluciones patrón normalizadas. La base empleada fue NaOH 0.1N y como indicador fenolftaleína, esto con el objetivo de lograr el punto final de valoración. En vasos de precipitado de 100 mL se añadieron 10 mL de la leche fresca, se agregó a cada vaso 2 gotas de fenolftaleína, con ayuda de la bureta se añadió gota a gota la solución de NaOH 0.1 N hasta que el contenido del vaso quedara de color rosa pálido.

### **4.2.3. Preparación de queso de pasta hilada**

El queso se elaboró en el taller de alimentos de la Universidad del Papaloapan Campus Tuxtepec, la leche se adquirió entre los meses de septiembre y enero del año 2023. Se realizó una titulación ácido-base empleando NaOH 0.1 N con el objetivo de verificar el valor de acidez inicial de la leche. Se acidificó utilizando ácido acético comercial de grado alimenticio hasta llegar a un valor de acidez de 6. La coagulación enzimática de la leche se realizó empleando renina comercial Cuamix® de (CHR Hansen México) bajo las recomendaciones establecidas por el proveedor. Después de la coagulación se procedió a cortar la cuajada y desuerar. Se realizó una prueba de confirmación de estirado de la hebra en agua caliente (75 a 80°C) con una porción de queso, una vez finalizada la prueba de estirado se procedió a malaxar el lote completo de queso en el agua caliente. Finalmente, se realizó un choque térmico con agua fría y se le dio la forma característica de bola.

### **4.2.4. Actividad microbiológica**

Los 4 lotes de recubrimientos preparados, así como sus respectivos controles (Tabla 4) se utilizaron para realizar el método de recuento de bacterias aerobia en placa (NOM-092-SSA1-1994), coliformes totales (NOM-113-SSA1-1994), mohos y levaduras (NOM-111-SSA1-1994). Todo el equipo empleado se desinfectó antes del análisis con C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH 80 % y el material se esterilizó en autoclave vertical (GEO-LAB). Antes y después de sembrar las muestras se utilizó la luz UV de la campana de flujo laminar (PRENDO, CFL-102) por un periodo de 15 min para desinfectar la superficie de trabajo. Las muestras de quesos de hebra preparadas de acuerdo a la técnica descrita anteriormente se colocaron

en un recipiente de aluminio con el recubrimiento obtenido en la primera etapa. Finalmente, las muestras de quesos se almacenaron a temperatura de refrigeración por 36 h antes del análisis microbiológico.

### **4.2.4.1. Preparación de la muestra**

La preparación de las muestras se realizó siguiendo las indicaciones de la NOM-110-SSA1-1994 (preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico). Las muestras de quesos se homogenizaron en 90 mL de solución reguladora de fosfatos (pH 7.2) durante 1 min en una licuadora domestica (Oster) de 12 velocidades. La dilución obtenida se transfirió a un vaso de precipitado de 100 mL permitiendo que las partículas grandes sedimentaran. De la capa superior de la suspensión se transfirió una alícuota de 1 mL en tubos de ensayo conteniendo nueve veces el volumen del diluyente estéril evitando el contacto de la pipeta con el diluyente. A partir de esta dilución se realizaron las diluciones decimales consecutivas hasta una concentración  $10^{-5}$ .

### **4.2.4.2. Cuenta de bacterias aerobias en placa**

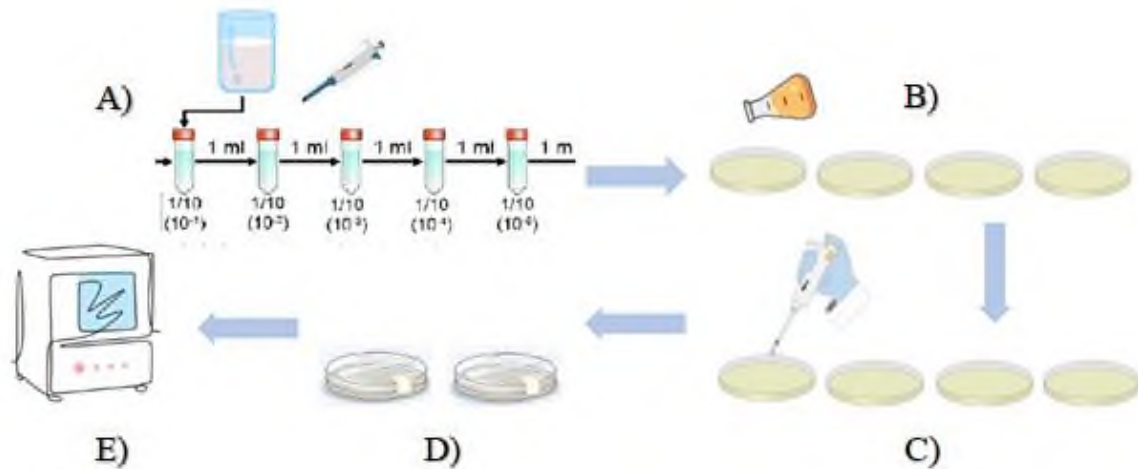
Se colocó en cajas Petri 1 mL de las diluciones preparadas por duplicado (Fig. 4A) utilizando pipetas volumétricas estériles, en placas de agar (Fig. 4B) para método estándar con 20 mL del medio preparado aproximadamente; manteniendo una temperatura de  $45 \pm 1^{\circ}\text{C}$  y haciendo movimientos oscilatorios sobre una superficie lisa hasta lograr la incorporación completa del inóculo (Fig. 4C) en el medio. Las cajas se dejaron solidificar sobre una superficie horizontal (Fig. 4D), se prepararon 2 cajas control con 20 mL. La incubación (Fig. 4E) se realizó en posición invertida al tiempo y temperatura requerida (Tabla 4). Después del periodo de incubación requerida se seleccionaron las cajas en donde se observó crecimiento de colonias y se procedió a hacer el conteo con ayuda de un contador de colonias (SCIENTIFIC, CVP-CM3), empleando la técnica descrita en la norma NOM-092-SSA1-1994 (anexo F). Las bacterias aerobias en placa que se cuantificaron en este trabajo de investigación se pueden resumir en la tabla 5.

**Tabla 5.** Temperatura y tiempo de incubación para crecimiento de bacterias aerobias en placa.

<b>Grupo bacteriano</b>	<b>Temperatura °C</b>	<b>Tiempo de incubación</b>
Termófilos aerobios	55 ± 2	48 ± 2 h
Mesófilos aerobios	35 ± 2	48 ± 2 h
Psicrotróficos	20 ± 2	3 - 5 días
Psicrofílicos	5 ± 2	7 - 10 días

**4.2.4.3. Cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.**

Se colocó en cajas Petri 1 mL de las diluciones preparadas por duplicado utilizando pipetas volumétricas estériles en placas de agar rojo violeta bilis con aproximadamente 20 mL del medio preparado manteniendo una temperatura de 45± 1°C haciendo movimientos oscilatorios sobre una superficie lisa hasta lograr la incorporación completa del inóculo en el medio. Las cajas se dejaron solidificar sobre una superficie horizontal, así mismo se prepararon 2 cajas control con 20 mL. La incubación se realizó en posición invertida (Figura 4) por un tiempo de 24± 2h a una temperatura de 35°C. Después del periodo de incubación requerido se seleccionaron las cajas en donde se observó crecimiento de colonias y se procedió a hacer el conteo con ayuda de un contador de colonias (SCIENTIFIC, CVP-CM3), tomando los criterios de la NOM-092-SSA1-1994 (anexo F) Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.



**Figura 4.** Proceso de siembra en medio de cultivo para conteo de microorganismos: A) diluciones, B) incorporación de medio, C) incorporación del inóculo, D) solidificación y E) incubación.

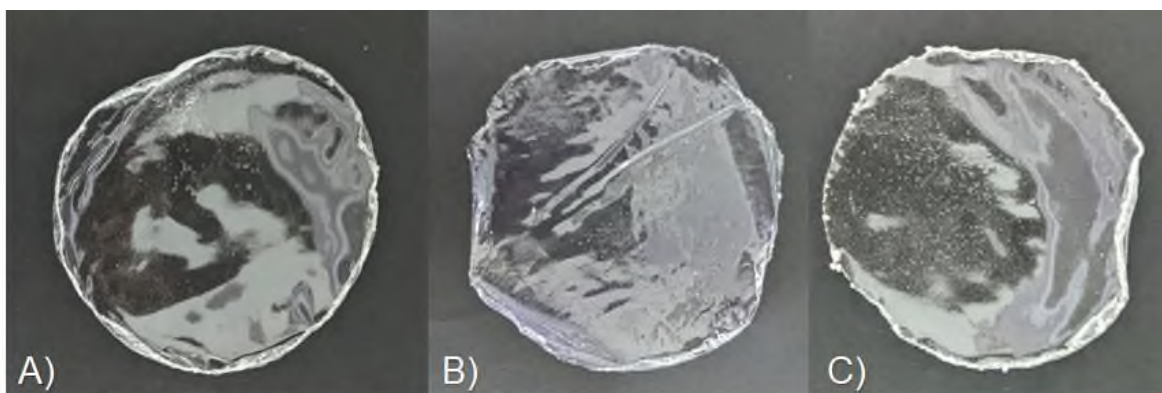
#### 4.2.4.4. Mohos y levaduras

Se colocó en cajas Petri 1 mL de las diluciones preparadas por duplicado utilizando pipetas volumétricas estériles en placas de agar papa - dextrosa con aproximadamente 20 mL del medio preparado manteniendo una temperatura de  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  haciendo movimientos oscilatorios sobre una superficie lisa hasta lograr la incorporación completa del inóculo en el medio. Las cajas se dejaron solidificar sobre una superficie horizontal, así mismo se prepararon 2 cajas control con 20 mL para verificar la esterilidad. La incubación se realizó en posición invertida (Figura 4) a una temperatura de  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . Después de 3 días se seleccionaron las cajas en donde se observó crecimiento de colonias y se procedió a hacer el conteo con ayuda de un contador de colonias (SCIENTIFIC, CVP-CM3), tomando los criterios de la NOM-092-SSA1-1994 (anexo F). Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

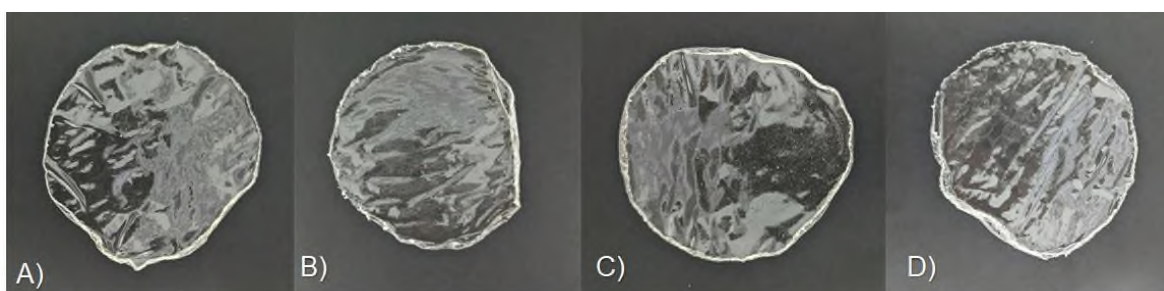
### 5.1. Preparación de biopelículas o recubrimientos

En la Figura 5, se observan las biopelículas blanco preparadas en esta investigación. Estas biopelículas se prepararon por triplicado y sin bacteriocina las cuales fueron almacenadas hasta su empleo como recubrimiento, bajo condiciones de oscuridad y ausencia de humedad.



**Figura 5.** Biopelículas blanco A, B y C.

Mientras que, las biopelículas con bacteriocinas se muestran en la Figura 6. Estas biopelículas fueron obtenidas mediante la metodología sugerida por Leyva-Hernández, (2022) y Girón-Campechano (2023).



**Figura 6.** Biopelículas con bacteriocina (Nisina): A) NI2525, B) NI2550, C) NI5025 y D) NI5050.

Debido a lo anterior, se presenta un resumen de los resultados obtenidos por dichos autores. Las biopelículas blanco y con nisina presentan ligera transparencia y espesor heterogéneo, las biopelículas enriquecidas con nisina presentaron un enrollamiento en los límites de las circunferencias dificultando su manipulación.

En cuanto al contenido de humedad de las biopelículas es variable sin importar la concentración de glicerol empleada en la formulación. La capacidad de retención de aceite (CRA) fue similar entre las biopelículas blanco y con nisina, los autores reportan ausencia de diferencia significativa entre estas.

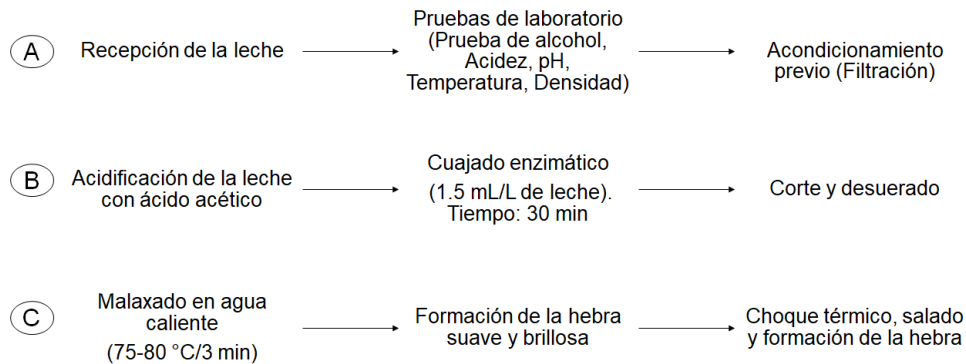
En el estudio realizado por (Girón Campechano, 2023) se obtuvieron biopelículas transparentes para el control y las preparadas con nisina presentaron ligera transparencia con una tendencia a color amarillo, el espesor fue heterogéneo y las biopelículas de (Leyva-Hernández, 2022) presentaron enrollamiento en los límites de su circunferencia limitando así su manipulación.

En cuanto a la capacidad de solubilidad en agua (CSA) hubo variabilidad en los tratamientos con nisina y biopelículas blanco, la presencia de caseína y la cantidad de plastificante puede afectar la CSA. En las biopelículas con mayor proporción de plastificante la CSA aumentó de manera significativa. En las propiedades de la morfología las biopelículas con nisina y las biopelículas control presentaron apariencias heterogéneas; en la determinación de fenoles totales las biopelículas blanco y las preparadas con nisina presentaron diferencia significativa, de acuerdo a los resultados reportados por los autores es posible predecir que la caseína es la responsable de esta variación.

Finalmente, en la actividad antimicrobiana a pesar de que se esperaba mayor actividad antimicrobiana ante *Listeria monocytogenes* (bacteria gram positiva) solo NI2525 Y NI5025 presentaron actividad bactericida mientras que las biopelículas blanco no presentaron crecimiento de la bacteria patógena durante el tiempo de investigación (Leyva-Hernández, 2022).

## 5.2. Elaboración de queso de hebra y pruebas de plataforma.

Para la elaboración del queso de hebra se presenta la metodología que se muestra en la Figura 8, resultado de esta investigación. En este proceso se requiere destreza y conocimiento para su elaboración. Existen puntos críticos de control que deben mencionarse: recepción de la leche (A), acidificación (B) y malaxado (C).



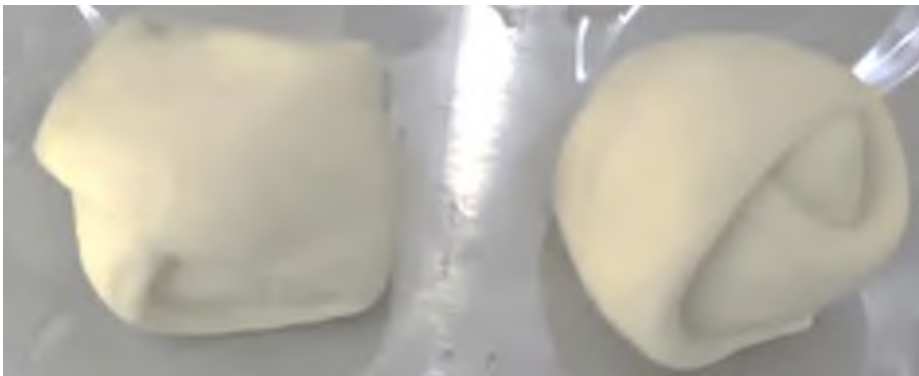
**Figura 7.** Proceso de elaboración del queso de hebra estandarizado.

El proceso de elaboración de queso se estandarizó en este trabajo de investigación, controlando las tres etapas críticas del proceso. Para la acidificación de la leche se utilizó ácido orgánico comercial y comestible para alcanzar una acidez de 6 °D. En la investigación de (Narayana y Palliyaguro., 2022) se obtuvo evidencia de la acidificación directa con ácido acético comercial y ácido cítrico empleado en la leche para la elaboración de queso mozzarella. Se mostró un mayor rendimiento quesero en comparación con la acidificación con un cultivo iniciador (*Streptococcus thermophilus*), esto es un buen indicativo para la reducción de tiempos en la elaboración de este tipo de quesos (tipo pasta filata); la capacidad fundible es una propiedad importante del queso, de manera particular cuando se utiliza en alimentos que se consumen después de calentarlos, el término fundible se ha utilizado para indicar el grado en el que el queso derretido fluye y se extiende al calentarlo. (Narayana y Palliyaguro., 2022), evaluaron esta propiedad, el queso acidificado con ácido acético y ácido cítrico fue el que mostró la mayor capacidad fundible en comparación con el queso acidificado con el cultivo iniciador.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La temperatura de estiramiento a la que se somete el queso influye en su estructura puesto que afecta sus componentes y sus interacciones entre los que incluyen los cambios en el estado físico de la grasa y las interacciones moleculares entre la caseína y la grasa.

Otro punto crítico en la elaboración del queso de hebra radica en el malaxado, en este paso se requiere alcanzar el amasado que confiera las características fisicoquímicas del queso; en este trabajo de investigación se utilizó un intervalo de temperatura entre los 75°C y 80°C. (Correia Goncalves y Cardarelli) determinaron en su investigación que los quesos elaborados y sometidos a una temperatura de entre 75 y 85°C, no afectaron la capacidad de fusión de los quesos ni el perfil de su textura, sin embargo, el tiempo de almacenamiento de refrigeración de los quesos promovió un aumento de la fusión y una disminución de la dureza. La Figura 8, muestra el queso obtenido en este trabajo de investigación. Por otro lado (Feng *et al.*, 2021) determinaron que los quesos estirados en agua caliente a una temperatura de 80 °C por un tiempo de 12 min y 90°C por un tiempo de entre 12 y 16 min presentaron un mayor contenido de retención de agua comparados con los quesos que se estiraron en agua a una temperatura de 60 y 70°C por un tiempo de 12 a 16 min, posiblemente esto se deba a la contracción de la matriz proteica de la cuajada lo cual dificultó la sinéresis a temperaturas altas.



**Figura 8.** Queso de pasta hilada, obtenido en este trabajo de investigación.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las pruebas de plataforma en la leche de vaca recién ordeñada nos permiten visualizar la condición en la que se encuentra la leche, son pruebas simples, rápidas y flexibles en pruebas de campo y así evitar contratiempos, entre estas pruebas se encuentra el pH, acidez, densidad y prueba de alcohol. En la Tabla 6, se muestran los resultados de las pruebas que fueron realizadas a la materia prima antes de la elaboración del queso.

**Tabla 6.** Parámetros de calidad en leche fresca

<b>Parámetro</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
pH	6.6	0.7	6.2	8.1
Acidez, °D	24.5	9.5	17.0	43
Temperatura, °C	25.9	1.8	22.8	27.5
Densidad, g/mL	1.026	0.001	1.025	1.027
Prueba de alcohol	Negativo			

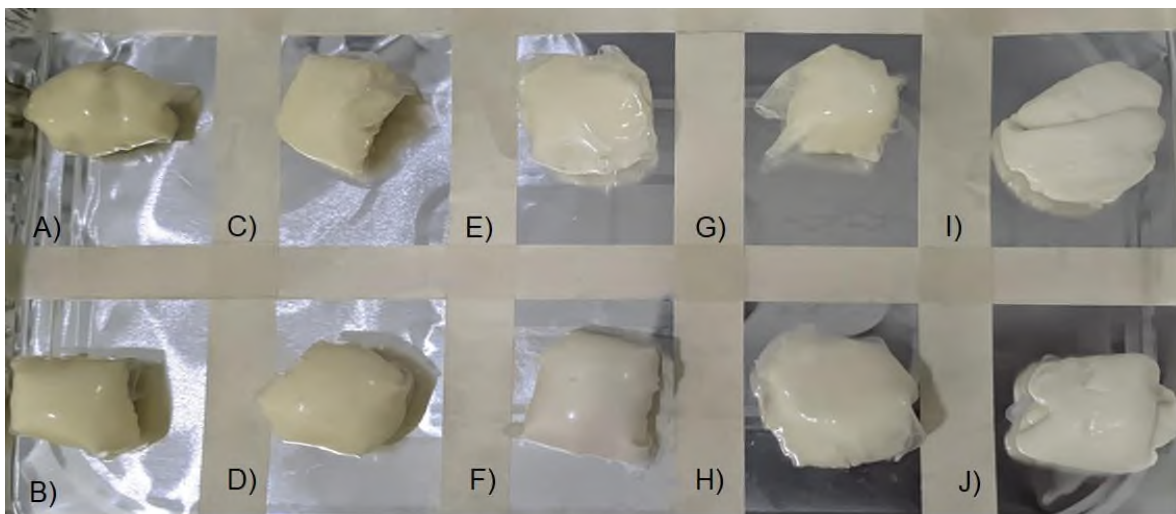
Tal y como se observa en la Tabla 6, las medidas del pH de las muestras de leche cruda de vaca presentaron un valor promedio de 6.6, valor similar al valor obtenido por (Álvarez Figueroa *et al.*, 2022) cuyo estudio de análisis fisicoquímicos en muestra de leche de vaca, obtuvieron resultados para el pH de 6.64 y un valor de 1.024g/mL para la densidad. En la investigación de (Ahmida *et al.*, 2021) obtuvieron un valor promedio en cuanto a densidad de 1.052 g/mL, con un valor de pH de 6.61; (Boudalia *et al.*, 2020) en la investigación de la caracterización de un queso tradicional “Bouhezza” elaborado con leche cruda de vaca obtuvieron un pH promedio de 6.48 con un valor mínimo de 6.00 y un valor máximo de 6.63, para la propiedad densidad, se obtuvo un valor promedio de 1.301 g/mL con un valor máximo de 1.042 g/mL y un valor mínimo de 1.024 g/mL.

En el estudio hecho por (Desye *et al.*, 2023) se analizaron muestras de leche de vacas a una temperatura promedio de 28.2 °C, dando como resultado un valor promedio de 1.027 g/ml para la densidad similar al estudio de (López Villafaña *et al.*, 2023) con muestras de leche de vaca para la elaboración de queso panela, obteniendo resultados de 1.028 g/mL. En cuanto a la prueba de alcohol, para esta investigación se reportan negativas, con un valor medio pH de 6.6.

### 5.3. Análisis microbiológico

Los recubrimientos comestibles que incorporan agentes antimicrobianos generalmente ayudan a prolongar la vida útil de los alimentos, además de ayudar a minimizar los riesgos de contraer enfermedades de transmisión alimentaria.

En este trabajo se evaluaron recubrimientos comestibles de caseína con nisina incorporada como antimicrobiano, contra bacterias aerobias en placa, bacterias coliformes totales, mohos y levaduras. En la Figura 9, se muestra la adecuación de los tratamientos experimentales que incluyen a los quesos que contienen nisina añadida (A-D), muestras blanco (sin nisina) (E-H) y muestras sin recubrimiento (I, J). Este procedimiento se utilizó en todos los grupos bacterianos estudiados en esta investigación.



**Figura 9.** Tratamientos experimentales del queso de pasta hilada con aplicación del recubrimiento: A) T1(NI2525), B) T2(NI2550), C) T3(NI5025), D) T4(NI5050). Blanco: E) B1(2525), F) B2(2550), G) B3(5025), H) B4(5050). Quesos sin recubrimiento: I), J).

Se evaluó la idoneidad de los recubrimientos comestibles seleccionados para actuar como barrera contra una contaminación microbiana externa, los resultados obtenidos para el recuento de bacterias termófilas se encuentran en la Tabla 7. Para evaluar la actividad de barrera de los recubrimientos fue necesario saber si los recubrimientos permitieron o no el paso de la contaminación a los quesos o si estos recubrimientos pudieron reducir o eliminar la contaminación que se produjo en los quesos durante su

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

almacenamiento. La supervivencia de bacterias termófilas (Anexo A) presentes en los quesos se puede observar en varios recubrimientos. Se evaluaron los quesos con los recubrimientos pertenecientes a las formulaciones que tuvieron nisina incorporada, al mismo tiempo se evaluaron quesos con recubrimientos blanco (sin nisina añadida) y quesos sin recubrimiento. En los quesos recubiertos, Tabla 7 (T1-T4), no se tuvo crecimiento microbiano. Sin embargo, en los blancos (B1-B4) se puede apreciar que, hubo crecimiento microbiano, presentando un valor mínimo estimado de 264 UFC/g para el recubrimiento B1(2525) y un valor máximo estimado de 484 UFC/g para el recubrimiento B3(5025) y al observar los quesos sin recubrimiento se puede apreciar que estos presentaron un mayor crecimiento microbiológico si se compara con los quesos recubiertos con las formulaciones seleccionados que no presentaron crecimiento y los recubrimientos blancos.

Los recubrimientos con nisina incorporada no permitieron el crecimiento de bacterias termófilas en los quesos, por lo tanto, son eficaces para actuar como barrera contra la contaminación de estos microorganismos, en las condiciones de estudio.

Se evaluó la idoneidad de los recubrimientos comestibles seleccionados, los resultados obtenidos para el recuento de bacterias mesófilas se muestran en la Tabla 8. La supervivencia de bacterias mesófilas presentes en los quesos se puede observar en varios recubrimientos. Se evaluaron los quesos con los recubrimientos pertenecientes a las formulaciones que tuvieron nisina incorporada, al mismo tiempo se evaluaron quesos con recubrimientos blanco (sin nisina añadida) y quesos sin recubrimiento (Anexo A).

**Tabla 7.** Recuento de bacterias aerobias (Termofílicos, 55 °C ± 2 °C) en queso de pasta hilada, empleando recubrimientos de caseína y nisina. Agar cuenta estándar

Tratamientos	Media*, UFC/g	Min*, UFC/g	Max*, UFC/g
	1:10	1:10	1:10
B1(2525)	26.4	26.4	26.4
B2(2550)	28.6	26.4	30.8
B3(5025)	46.2	44.0	48.4
B4(5050)	41.8	39.6	44.0
T1(NI2525)	0	0	0
T2(NI2550)	0	0	0
T3(NI5025)	0	0	0
T4(NI5050)	0	0	0
QSR	396.0	352.0	440.0

\*Valor estimado. Dilución -1. QSR: queso sin recubrimiento

En los quesos recubiertos con las formulaciones con nisina incorporada, se tuvo un valor máximo de 7600 UFC/g para T4(NI5050) y un valor mínimo de 1000 UFC/g para T1(NI2525), mientras que en los quesos recubiertos con los recubrimientos blanco se tuvo un valor máximo de 41000 UFC/g para B4(5050), y un valor mínimo de 1000 UFC/g para B1(2525). En los quesos sin recubrimiento se tienen valores mayores que en los quesos con recubrimientos añadidos con nisina y los recubrimientos blanco. Estos recuentos microbianos de mesófilos aerobios en los quesos con los recubrimientos añadidos con nisina no superan el límite máximo que establece la NOM-243-SSA1-2010 con un valor de 200,000 UFC/g o mL, aunque los quesos sin recubrir si superan este valor. Lo anterior permite visualizar que, los quesos sometidos a tratamiento con los recubrimientos enriquecidos con nisina presentaron efectividad antimicrobiana ante este grupo de bacterias y se este efecto se puede percibir de forma clara cuando los resultados se comparan con aquellos quesos donde no se utiliza recubrimiento (QSR).

**Tabla 8.** Recuento de bacterias aerobias (Mesófilos aerobios, 35 °C ± 2 °C) en queso de pasta hilada, empleando recubrimiento de caseína y nisina. Agar cuenta estándar.

Tratamientos	Media*, UFC/g	Min*, UFC/g	Max*, UFC/g
	1:1000	1:1000	1:1000
B1(2525)	1	1	1
B2(2550)	17.5	14	21
B3(5025)	6	1	11
B4(5050)	38.5	36	41
T1(NI2525)	1.5	1	2
T2(NI2550)	1	1	1
T3(NI5025)	1	1	1
T4(NI5050)	8	8.4	7.6
QSR	572	528	594

\*Valor estimado. Dilución -3. QSR: queso sin recubrimiento

En el estudio hecho por (Shaala *et al.*, 2020) en donde estudiaron nisina, lisozima, cultivo protector y natamicina para inhibir el crecimiento de bacterias mesófilas en queso blando durante un periodo de almacenamiento de 30 días, el análisis microbiológicos se llevó a cabo el día 1, 14 y 30. Los quesos tratados con nisina fueron los que presentaron un porcentaje de reducción de bacterias aerobias el primer día de análisis con 31.60% que luego se elevó en el día 14 con un 90.32% y por último en el día 30 con un 96.54%, presentando una valor promedio de 591 UFC/g con respecto al queso blanco en el primer día con un valor promedio de 864 UFC/g, en el día 14 con un valor promedio de 146 UFC/g con respecto al queso blanco con un valor promedio de 1509 UFC/g y por último en el día 30 presentando un valor promedio de 73 UFC/g con respecto al queso blanco con un valor promedio de 2109 UFC/g.

(Diblan *et al.*, 2023) realizaron un estudio comparando diferentes recubrimientos (LDPE/poliamida/LDPE+2% de antimicrobianos) sobre la calidad y estabilidad del queso Kasar, los antimicrobianos en estos recubrimientos fueron el sorbato de potasio (PS), nisina (N), quitosano (CTS) o zeolita sustituida por plata (AgZeo).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El recuento de bacterias mesófilas para los quesos a 5°C fue de 4,58 log UFC/g en el día 15 para la muestra inicial y el recubrimiento blanco, para el recubrimiento con PS fue de 4.53 UFC/g, para el recubrimiento N 5.68 UFC/g y para el recubrimiento AgZeo 5.59 UFC/g, para el día 45 los recuentos fueron de 6.20 UFC/g, 6.04 UFC/g, 6.04 UFC/g, 5.77 UFC/g y 6.04 UFC/g respectivamente. En el día 10 con 15°C los recuentos fueron de 5.60 UFC/g, 5.60 UFC/g, 6.01 UFC/g, 5.54 UFC/g y 5.63 UFC/g respectivamente, para el día 35 fueron de 6.23, 6.35, 5.94, 6.03 y 5.73 UFC/g finalmente a 25°C de almacenamiento de las muestras, los recuentos fueron de 7.53, 7.32, 7.45, 7.22 y 7.13 UFC/g para el día 2 y para el día 15 el recuento fue de 10.2, 9.96, 10.21, 10.12 y 10 UFC/g respectivamente. Por otro lado, el Anexo B se muestra el tratamiento experimental que pertenece al grupo de psicrotróficos que incluyen a los quesos que contienen nisina añadida, muestras blanco (sin nisina) y muestras sin recubrimiento. Al igual que en los tratamientos anteriores, se evaluó la idoneidad de los recubrimientos comestibles seleccionados, los resultados obtenidos para el recuento de bacterias psicrotróficas se encuentran en la Tabla 9.

Se puede observar que esta vez sí se tuvo crecimiento microbiano en los quesos recubiertos con los recubrimientos con nisina incorporada, mostrando que la formulación T4(NI5050) tuvo un crecimiento máximo de 748000 UFC/g y un valor mínimo en T1(NI5025) con 2000 UFC/g, se puede observar que los tratamientos de los quesos sin recubrir no presentaron tanto crecimiento si se compara con los tratamientos recubiertos con las formulaciones seleccionadas. Con estos resultados se puede decir que las bacterias psicrotróficas pueden resistir a la nisina como antimicrobiano añadida a los recubrimientos comestibles de caseína.

**Tabla 9.** Recuento de bacterias aerobias (Psicrotróficos,  $20 \pm 2$  °C) en queso de pasta hilada, empleando recubrimientos de caseína y nisina. Agar cuenta estándar.

Tratamientos	Media*, UFC/g	Min*, UFC/g	Max*, UFC/g
	1:1000	1:1000	1:1000
B1(2525)	2.5	3.5	5
B2(2550)	124	120	124
B3(5025)	16	14	18
B4(5050)	1	1	1
T1(NI2525)	3	2	4
T2(NI2550)	190	28	352
T3(NI5025)	26	24	28
T4(NI5050)	389	30	748
QSR	46	24	70

\*Valor estimado. Dilución -3. QSR: queso sin recubrimiento

En la investigación realizada por (Zhang *et al.*, 2024) se prepararon recubrimientos comestibles aplicados en quesos blandos a base de proteína de suero incorporando péptidos antimicrobianos derivados de la leche ( $\alpha$ 2-caseína151–181 y  $\alpha$ 2-caseína182–207 comparando sus propiedades con recubrimientos elaborados a base de suero y nisina durante 28 días de almacenamiento. Se observó que el recuento de bacterias psicrotróficas disminuyeron durante el almacenamiento en todas las muestras. Se apreció una mayor disminución en los recuentos en los quesos recubiertos en comparación con las muestras descubiertas. Los recuentos de bacterias psicrotróficas fueron de 4.15, 4.28, 3.92, 3.71 y 3.91 en el día 7 y posteriormente pasaron a valores de 4.24, 4.37, 3.51, 3.28 y 3.39 log UFC/g para el queso sin recubrimiento (UC), WPF (recubrimiento de proteína de suero pura), WPF/nisina,  $\alpha$ 2-caseína 151–181 y  $\alpha$ 2-caseína 182–207, respectivamente, el día 28.

En el Anexo C se muestra el tratamiento experimental que pertenece al grupo de psicrofílicos que incluyen a los quesos que contienen nisina añadida, muestras blanco (sin nisina) y muestras sin recubrimiento. Se evaluó la idoneidad de los recubrimientos

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

comestibles seleccionados, los resultados obtenidos para el recuento de bacterias psicrófilas se encuentran en la Tabla 10. En éstos se puede observar que en ningún tratamiento se tuvo crecimiento bacteriano, esto puede deberse a la temperatura de almacenamiento a la cual fueron sometidos dichos tratamientos, pocos microorganismos logran subsistir a dicha temperatura de refrigeración. Como se puede apreciar inclusive los quesos a los que no se le aplicaron recubrimientos no presentaron ningún crecimiento bacteriano. Este hecho demuestra por un lado que, la temperatura de refrigeración 5°C sigue siendo la barrera efectiva para detener el crecimiento microbiano y por otro lado, que los recubrimientos comestibles con antimicrobiano deben probarse a tiempo de almacenamiento prolongados para evidenciar el comportamiento microbiano y comprobar la ausencia de estos.

**Tabla 10.** Recuento de bacterias aerobias (Psicrófilas, 5 ± 2 °C) en queso de pasta hilada, empleando recubrimientos de caseína y nisina. Agar cuenta estándar.

Tratamientos	Media*, UFC/g	Min*, UFC/g	Max*, UFC/g
	1:1000	1:1000	1:1000
B1(2525)	0	0	0
B2(2550)	0	0	0
B3(5025)	0	0	0
B4(5050)	0	0	0
T1(NI2525)	0	0	0
T2(NI2550)	0	0	0
T3(NI5025)	0	0	0
T4(NI5050)	0	0	0
QSR	0	0	0

\*Valor estimado. Dilución -3. QSR: queso sin recubrimiento

En el Anexo C se muestra el tratamiento experimental que pertenece al grupo de mohos y levaduras que incluyen a los quesos que contienen nisina añadida, muestras blanco (sin nisina) y muestras sin recubrimiento. Se evaluó la eficacia de los recubrimientos comestibles seleccionados, los resultados obtenidos para el recuento de mohos y levaduras se encuentran en la Tabla 11.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El único tratamiento que no presentó crecimiento microbiano fue T1(NI2525), en los tratamientos de los blancos se obtuvo un crecimiento máximo de 242000 UFC/g y un crecimiento mínimo de 8000 UFC/g, los quesos sin recubrimiento presentaron un valor máximo de 286000 UFC/g y un valor mínimo de 264000 UFC/g, con estos resultados nos podemos dar una idea de que los recubrimientos con nisina incorporada no son tan idóneos para inhibir mohos y levaduras.

**Tabla 11.** Recuento de mohos y levaduras (3 a 5 días, 25°C) en queso de pasta hilada, empleando recubrimiento de caseína y nisina. Agar Papa Dextrosa.

Tratamientos	Media*, UFC/g	Min*, UFC/g	Max*, UFC/g
	1:1000	1:1000	1:1000
B1(2525)	242	220	242
B2(2550)	242	220	242
B3(5025)	198	198	220
B4(5050)	14	8	20
T1(NI2525)	0	0	0
T2(NI2550)	38	28	48
T3(NI5025)	128	80	176
T4(NI5050)	3.5	3	4
QSR	242	264	286

\*Valor estimado. Dilución -3. QSR: queso sin recubrimiento

La nisina generalmente es conocida por su actividad antibacteriana contra bacterias Gram negativas, pero tiene poco efecto contra bacterias Gram positivas, mohos y levaduras (Setiarto *et al.*, 2023). La NOM-243-SSA1-2010 especifica que el límite máximo permisible de mohos y levaduras que puede haber en los quesos es 500 UFC/g o mL.

(Diblan *et al.*, 2023) realizaron un estudio comparando diferentes recubrimientos (LDPE/poliamida/LDPE+2% de antimicrobianos) sobre la calidad y estabilidad del queso Kasar, los antimicrobianos en estos recubrimientos fueron el sorbato de potasio (PS), nisina (N), quitosano (CTS) o zeolita sustituida por plata (AgZeo).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El recuento de mohos y levaduras en todos los recubrimientos tendieron a incrementar con el aumento de la temperatura y el tiempo. De manera general los recubrimientos controlaron los mohos y levaduras en comparación con los quesos a los que no se les añadió antimicrobianos. El recuento más alto lo tuvo la muestra con recubrimiento blanco al final del almacenamiento a 5°C y los recubrimientos AgZeo y CTS inhibieron de manera eficaz durante el período de almacenamiento. El resto de recubrimientos no pudieron controlar de manera eficaz el crecimiento de mohos y levaduras.

En la investigación hecha por (Kalinteri *et al.*, 2013) se estudió el efecto de la nisina y natamicina sobre la vida útil del queso Galotery, en los tratamientos de quesos a los que no se le añadieron nisina, en un inicio (en el día 0) la población fue de 7.2 log ufc/g con una vida útil de 14 a 15 días, los quesos enriquecidos con nisina con una concentración de 100 UI/ g tuvieron un crecimiento de 7.0 log UFC/g con una vida útil de 18 a 19 días, los quesos enriquecidos con nisina a una concentración de 200 UI/ g tuvieron una vida útil de 18 a 19 días también, estos tuvieron un crecimiento de 6.9 log UFC/g.

Por otra parte, los quesos añadidos en conjunto con nisina y natamicina fueron los que presentaron menor cantidad de crecimiento de mohos y levaduras. (Mei *et al.*, 2015) en su investigación evaluaron la efectividad de recubrimiento comestible en quesos por 25 días a base de quitosano, almidón de castaña y glicerol junto con combinaciones de sustancias antimicrobiana como: extracto de fruto de *cornus officinalis* (cofe), aceite esencial de aguja de pino (pneo) y nisina. Después de 15 días de almacenamiento se evidenció el crecimiento de mohos y levaduras en los recubrimientos WCSC-COAT (solución de quitosano), WCSC-NIS-COAT (solución de quitosano-nisina) y NO-COAT (sin solución de recubrimiento) en el queso Bod Ijong. Por lo contrario, las muestras de quesos con los recubrimientos de WCSC-COFE-COAT (solución de quitosano con extracto de fruto *cornus officinalis*), WCSC-PNEO-COAT (solución de quitosano con aceite esencial de aguja de pino). La nisina tiene una eficacia muy mínima de inhibición en cuanto a mohos y levaduras por el contrario de los recubrimientos que contenían aceite esencial de aguja de pino (pneo) y extracto de fruto de *cornus officinalis* (cofe) que no mostraron crecimiento visible de levadura ni moho durante todo el período de almacenamiento. Estos dos compuestos contienen concentraciones altas de compuestos

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

fenólicos (terpenoides). Estos compuestos fenólicos son un gran grupo de compuestos antimicrobianos activos contra bacterias grampositivas, mohos y levaduras.

En la investigación realizada por (Zhang *et al.*, 2024) se prepararon recubrimientos comestibles aplicados en quesos blandos a base de proteína de suero incorporando péptidos antimicrobianos derivados de la leche ( $\alpha$ 2-caseína151–181 y  $\alpha$ 2-caseína182–207) comparando sus propiedades con recubrimientos elaborados a base de suero y nisina durante 28 días de almacenamiento. En el recuento de mohos y levaduras en el queso sin recubrir fue menor a 1 UFC/g al inicio del almacenamiento, pero después de 14 días empezó a incrementar alcanzando un valor de 3.99 UFC/g hasta el día 28. Para los recubrimientos  $\alpha$ 2-caseína151–181 y  $\alpha$ 2-caseína182–207 no se presentó crecimiento al inicio, ni a los 14 días, ni en el día 28 para  $\alpha$ 2-caseína 151-181, tampoco hubo crecimiento a 14 días si no hasta el día 28 que se presentó un crecimiento de 1.24 UFC/g en el recubrimiento  $\alpha$ 2-caseína182–207. En el recubrimiento a base de suero con nisina hubo crecimiento a partir del día 14 con un valor de 1.27 UFC/g hasta llegar al día 28 con 3.86 UFC/g.

Finalmente, en el Anexo E se muestra el tratamiento experimental que pertenece al grupo de bacterias coliformes que incluyen a los quesos que contienen nisina añadida, muestras blanco (sin nisina) y muestras sin recubrimiento. Se evaluó la efectividad de los recubrimientos comestibles seleccionados, los resultados obtenidos para el recuento de bacterias coliformes se encuentran en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Recuento de coliformes totales en placa (24 h  $\pm$  2 h, 35°C) en queso de pasta hilada, empleando recubrimiento de caseína y nisina. Agar rojo violeta bilis lactosa.

Tratamientos	Media*, UFC/g	Min*, UFC/g	Max*, UFC/g
	1:1000	1:1000	1:1000
B1(2525)	0	0	0
B2(2550)	0	0	0
B3(5025)	0	0	0
B4(5050)	90	90	92
T1(NI2525)	0	0	0
T2(NI2550)	29.5	8	51
T3(NI5025)	0	0	0
T4(NI5050)	6	3	9
QSR	486	484	748

\*Valor estimado. Dilución -3. QSR: queso sin recubrimiento

Todos los tratamientos sin nisina añadida a excepción B4 (NI5050) no presentaron crecimiento de bacterias coliformes, y en los recubrimientos que contienen nisina añadida, T2(NI2550) con un promedio de 29500 UFC/g y T4(NI5050) con un promedio de 6000 UFC/g, solo estos dos tratamientos presentaron crecimiento, sobrepasando el límite máximo de <100 UFC/g en quesos que indica la NOM-243-SSA1-2010. Para los quesos que no fueron recubiertos se puede visualizar que estos presentaron un crecimiento mayor que los quesos recubiertos por lo tratamientos blanco y los quesos recubiertos por las formulaciones seleccionadas, solo dos tratamientos (T1 Y T2) inhibieron de manera eficaz el crecimiento de bacterias coliformes.

**VI. CONCLUSIONES**

- La metodología de vaciado en placa para la elaboración de recubrimientos comestibles fue un método replicable en este trabajo.
- La variable para la leche fresca que presentó mayor dificultad en su control, fue la acidez.
- Los recubrimientos mostraron mayor eficacia en la inhibición de las bacterias termófilas y bacterias mesófilas.
- Los cuatro tratamientos probados fueron eficientes en la inhibición de bacterias termofílicas, mientras que para las bacterias mesofílicas fueron T1, T2 y T3.
- Los recubrimientos no mostraron eficiencia en la inhibición de bacterias psicrotróficas, de acuerdo a las condiciones de estudio.
- No se presentó crecimiento de bacterias psicrófilas, en las condiciones de estudio.
- El T1 fue el más eficiente en la inhibición de mohos y levaduras, de acuerdo a las condiciones de estudio.
- Los tratamientos T1, T3 mostraron eficiencia en la inhibición de coliformes totales.

**6.1. Perspectivas**

- Realizar pruebas microbiológicas con otros grupos bacterianos, empleando los recubrimientos preparados con caseína/nisina.
- Realizar pruebas microbiológicas con bacterias patógenas, empleando los recubrimientos preparados con caseína/nisina.
- Realizar evaluación sensorial en los quesos con los recubrimientos empleados en los experimentos.
- Realizar análisis químico proximal en los quesos propuestos en este estudio.
- Probar otras condiciones para recubrir o empacar el queso, de modo que sea posible la fácil manipulación del producto lácteo.

## VII. REFERENCIAS

1. Abedini, A., Salimi, M., Mazaheri, Y., Sadighara, P., Alizadeh Sani, M., Assadpour, E., Jafari, S.M. (2023). Assessment of cheese frauds, and relevant detection methods: A systematic review 19; 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100825>
2. Ahmida, N., Shaboum, S., Ahmida, M. (2021). Comparative Study on The Physiochemical and Nutritional Properties of Fresh Milk Samples Collected from Farms Animals in Benghazi City, Libya. *Journal of Pure & Applied Sciences*, 20(2), 49–53. <https://sebhau.edu.ly/journal/index.php/jopas/article/view/1086>
3. Aleksanyan, K. (2023). Polysaccharides for Biodegradable Packaging Materials: Past, Present, and Future (Brief Review) 15(2); 1-19. <https://doi.org/10.3390/polym15020451>
4. Álvarez-Figueroa, M.L., Pineda Castro, M.L., Chacón Villalobos, A., Cubero Castillo., E. (2022). Physicochemical and sensory characteristics of whole, skimmed and lactose-free goat and bovine milks 33(2); 1-20. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v33n2/2215-3608-am-33-02-00016.pdf>
5. Aljohani, A., Hejin Mahmoud., A., Bakr Shori., A. (2023). Bacteriocins as promising antimicrobial peptides, definition, classification, and their potential applications in cheeses 43; 1-10. <https://doi.org/10.1590/fst.118021>
6. Amazará, E., Tarazona, G., Quintero, Y., Vacca, Y., Vacca, D. (2022). Recuento de los microorganismos aerobios mesófilos. [https://www.researchgate.net/publication/361449495\\_MICROBIOLOGIA\\_DE\\_ALIMENTOS\\_RECUESTO\\_DE\\_LOS\\_MICROORGANISMOS\\_AEROBIOS\\_MESOFILOS](https://www.researchgate.net/publication/361449495_MICROBIOLOGIA_DE_ALIMENTOS_RECUESTO_DE_LOS_MICROORGANISMOS_AEROBIOS_MESOFILOS)
7. Anjos, H.A, Castro, A.M., Dos Santos Neto., A.G., Duarte da Luz, J.R., Das Graças Almeida, M., Leite Neta, M.T., Narain, N., Pagani, A., Franceschi, E., Hernández Macedo, M.L., López A, J. (2023). Gelatin-based films incorporated with buriti oil (*Mauritia flexuosa* L.) as active packaging for artisanal cheese conservation 23; 101526. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101526>
8. Asadbeigi, S., Ahmadi, E., Goodarzib, M., Sagharichian, A. (2023). Analyzing and simulating heat transfer and designing a shell and tube heat exchanger for the pasteurization process of tomato paste: A CFD study 9; 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21593>
9. Aste, N., Del Pero, C., Leonforte, F. (2017). Active refrigeration technologies for food preservation in humanitarian context A review 22; 150-160. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2017.02.014>
10. Becker-Algeri, T., Castagnaro, D., Bortoli, K., Souza, C., Borracha, D.A., Badiale Furlong., E. (2016). Mycotoxins in bovine milk and dairy products: A review. *Journal of Food Science* 81(3); R544-R552. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13204>
11. Belay, Z., Mashele, T., Botes, W., Caleb, J. (2023). Effects of zein-nisin edible coating on physicochemical and microbial load of 'Granny Smith' apple after long term storage 21(1); 334-343. <https://doi.org/10.1080/19476337.2023.2199833>
12. Berk, Z. (2018). Chapter 19 – Refrigeration Chilling and freezing. 439-461. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812018-7.00019-1>

13. Berti, S., Ollé Resa, C., Basanta, F., Gerschenson, L. (2019). Edible coatings on Gouda cheese as a barrier against external contamination during ripening 31; 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100447>.
14. Bhagya R, Y.J., McSweeney, P.L., Sheenan J, J., Cotter., P. (2018). Sequencing of the Cheese Microbiome and Its Relevance to Industry 9; 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01020>.
15. Bharti, B., Li, H., Zhaoyong, R., Rongshu, Z., Zhenye, Z. (2022). Recent advances in sterilization and disinfection technology: A review. 308. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136404>.
16. Biglia, A., Mesina, C., Comba, L., Ricauda Aimonino, D., Brugiapaglia, A. (2022). Quick-freezing based on a nitrogen reversed Brayton cryocooler prototype: Effects on the physicochemical characteristics of beef longissimus thoracis muscle. 82. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103208>.
17. Bilhar Karaziack, C., Vidal, C., Pasquini, C., Fernández Barbin, D., Hanada Viotto, W. (2024). Application of near-infrared hyperspectral imaging for determination of cheese chemical composition. 127. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.105994>.
18. Bittante, G., Amalfitano, N., Ferragina, A., Lombardi, A., Tagliapietra, F. (2023). Interrelationships among physical and chemical traits of cheese: Explanatory latent factors and clustering of 37 categories of cheeses 107(4); 1980-1992. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23538>.
19. Bittante, G., Patel, N., Cecchinato, A., Berzaghi, P. (2022). Invited review: A comprehensive review of visible and near-infrared spectroscopy for predicting the chemical composition of cheese 105(3); 1817-1836. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20640>.
20. Bisht, A., Kamble, M., Choudhary, P., Chaturvedi, K., Kohli, G., Juneja, V., Sehgal, S., Kumra Taneja, N. (2021). A surveillance of food borne disease outbreaks in India: 2009–2018 121; 1-38. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107630>.
21. Bolan, S., Sharma, S., Mukherjee, S., Zhou, P., Mandal, J., Srivastava, P., Hou, D., Edussuriya, R., Vithanage, M., Khanh Truong, V., Chapman, J., Xu, Q., Zhang, T., Bandara, P., Wijesekara, H., Rinklebe, J., Wang, H., Siddique, K., Kirkham, M.Bb., Bolan, N. (2024). The distribution, fate, and environmental impacts of food additive nanomaterials in soil and aquatic ecosystems 915; 2-21. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.170013>.
22. Boudalia, S., Boudebouz, A., Gueroi, Y., Bousbia, A., Benada, M., Leksir, C., Boukaabene, Z., Saihi, A. (2020). Characterization of traditional Algerian cheese “Bouhezza” prepared with raw cow, goat and sheep milks 4(2); 528-537. <https://www.scielo.br/j/cta/a/P5nk8q99PYZtv47XXKfxmTK/?lang=en&format=html>.
23. Bühler, A.J., Martín, N.H., Aburrido, K.J., Wiedmann, M. (2018). Evaluation of biopreservatives in Greek yogurt to inhibit yeast and mold spoilage and development of a yogurt spoilage predictive model 105(12); 10759-10774. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15082>.

24. Calín Sánchez, A., Lipán, L., Cano Lamadrid, M., Kharaghani, a., Masztalerz, K., Carbonell Barrachina, A., Figiel, A. (2020). Comparison of Traditional and Novel Drying Techniques and Its Effect on Quality of Fruits, Vegetables and Aromatic Herbs 9(9); 1-27. <https://doi.org/10.3390/foods9091261>.
25. Caro, I., Quinto, E.J., Fuentes, L., Alessandria, V., Cocolina, L.S., Redondo del Río, M.P., mayo, B., Flórez, A.B., Mateo, J. (2020). Characterization of Lactococcus strains isolated from artisanal Oaxaca cheese 122; 1-35. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109041>.
26. Castro Castillo, G., Martínez Castañeda, F.E., Martínez Campos, A.R., Espinoza Ortega, A. (2013). Caracterización del microbiota nativo del queso Oaxaca tradicional en tres fases de elaboración 33(2); 105-109. [https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1315-25562013000200004&script=sci\\_arttext](https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1315-25562013000200004&script=sci_arttext).
27. Chaudhari, A., Das, S., Dwivedi, A., Ishore Dubey, N. (2023). Application of chitosan and other biopolymers based edible coatings containing essential oils as green and innovative strategy for preservation of perishable food products: A review 253(8); 127688. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127688>.
28. Chakori, S., Richards, R., Smith, C., J Hudson, N., Abdul Aziz, A. (2022). Taking a whole-of-system approach to food packaging reduction 338. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.130632>.
29. Chang Teng, K., Song, X., Shen, L., Liu, N., Zhou, X., Cheng, L., Chen, J. (2023). Nisin and its application in oral diseases 105; 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105559>.
30. Chávez Martínez, A., Paredes, Montoya, P., Rentería Monterrubio, A. L., Corral Luna, A., Lechega Valles, R., Domínguez Viveros J., Sánchez Vega, R., Santellano Estrada, E. (2019). Microbial quality and prevalence of foodborne pathogens of cheeses commercialized at different retail points in Mexico 39(2); 703-710. <https://doi.org/10.1590/fst.30618>.
31. Cipolat Gotet, C., Cecchinato, A., maryanne, D., Marangón, A., Martin, B., Bittante, G. (2018). From cow to cheese: Novel phenotypes related to the sensory profile of model cheeses from individual cows 101(7); 5865-5877. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14342>.
32. Claeys, W.L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K., Herman, L. (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits 42; 188-201. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.045>.
33. Cruz Gil, M., Ortiz Rodríguez, L., Ramírez Vargas, T., Toledo González, K.K., Ramírez Moreno, E., Guillen Velasco, S. (2022). ¿Qué microorganismos se encuentran en chorizos comercializados en México? 10(20); 288-292. <https://repository.uaeh.edu.mx/revistas/index.php/ICSA/article/view/7270>.
34. Costa, M., Maciel C, L., Teixeira, J., Vicente, A., Cerqueira, M. (2018). Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges 107; 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.02.013>.
35. Concalves Correia., M., Cardarelli, H. R. (2020). <https://doi.org/10.1111/jfpp.14703>.
36. Cui, Y., Xiaojun, Q. (2024). CRISPR-Cas systems of lactic acid bacteria and applications in food science 71. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108323>.

37. Devi, L.S., K. Jaiswal, A., Jaiswal, S. (2024). Lipid incorporated biopolymer based edible films and coatings in food packaging: A review 8; 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2024.100720>.
38. Desye, B., Destaw, B., Eyachew, D., Adane, Birhan, T. (2023). Quality assessment of raw and pasteurized milk in Gondar city, Northwest Ethiopia: A laboratory-based cross-sectional study 9(3). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10020003/>
39. Di Renzo, T., Reale, A., Nazzaro, S., Siano, F., Addeo, F., Picariello, G. (2023). Shotgun proteomics for the identification of yeasts responsible for pink/red discoloration in commercial dairy products 169; 2-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112945>.
40. Diblan, S., Kaya, S. (2023). Shelf life modelling of kaşar cheese packaged with potassium sorbate, nisin, silver substituted zeolite, or chitosan incorporated active multilayer plastic films 140. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958694623000158>.
41. Diario oficial de la federación (SSA). (2010). NOM-243-SSA1-2010: Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba: SSA.
42. Dror, D.K. y Allen, L. (2014). Dairy product intake in children and adolescents in developed countries: trends, nutritional contribution, and a review of association with health outcomes 72(2); 68-81. <https://doi.org/10.1111/nure.12078>.
43. Dugat Bony, E., Garnier, L., Denonfoux, J., Ferreira, S., Sarthou., A.S., Bonnarmé, P., Irlinger, F. (2016). Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties 238(5); 265-273. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.026>.
44. Espinosa Mata, E., Mejía, L., Villacís E, J., Alban, J., Zapata, S. (2022). Detección y genotipado de *Listeria monocytogenes* en quesos blandos artesanales del Ecuador 54(1); 53-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2021.02.013>.
45. Fadiji, T., Miraei Ashtiani, S., Onwude, D., Li, Z., Linus Opara, U. (2021). Finite Element Method for Freezing and Thawing Industrial Food Processes 10(4); 1-23. <https://doi.org/10.3390/foods10040869>.
46. Fan, M., Rakotondrabe, T.F., Chen, G., Guo, M. (2023). Advances in microbial analysis: Based on volatile organic compounds of microorganisms in food 418. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135950>.
47. Farid, N., Waheed, A., Motwani, S. (2023). Synthetic and natural antimicrobials as a control against food borne pathogens: A review 9(6); 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17021>.
48. Fawzy, E., Salem Sebaei, A., Badry Mohamed, M. (2024). Food additives and flavourings: Analysis of EU RASFF Notifications from 2000 to 2022. 130. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106137>.
49. Feng, R., Lillevang, S., Ahrne, L. (2021). Effect of Water Temperature and Time during Heating on Mass Loss and Rheology of Cheese Curds 10(11). <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/11/2881>.
50. Figueroa Sepúlveda, K., Castillos Robles, N.Z., Martínez Girón, J. (2021). Aplicación de altas presiones y otras tecnologías en frutas como alternativa de tratamientos térmicos convencionales 19(2); 27-285. <https://doi.org/10.18684/bsaa.v19.n2.2021.1772>.

51. Freitas, P., Silva, R., Oliveira, T., Solares, R., Soares, N. (2020). Biodegradable Film Development by Nisin Z Addition into Hydroxypropylmethylcellulose Matrix for Mozzarella Cheese Preservation 9; 360-372. <https://www.iseki-food-ejournal.com/ojs/index.php/ejournal/article/view/810/294?acceptCookies=1>.
52. Fuentes, L., J.M., Quinto, E.J., Caro, I. (2015). Changes in quality of nonaged pasta filata Mexican cheese during refrigerated vacuum storage 98; 2833-2842. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8152>.
53. Fusco, V., Chieffi, D., De Angelis, M. (2022). Invited review: Fresh pasta filata cheeses: Composition, role, and evolution of the microbiota in their quality and safety 105(12); 9347-9366. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22254>.
54. Giagnoni, L., Saptarathi, D., Tondello, A., Zardinoni, G., De Noni, M., Franchin, C., Vanzin, A., Arrigoni, G., Masí, A., Stevanato, P., Cecchinato, A., Squartini, A., Spanu, C. (2023). The impact of milk storage temperatures on cheese quality and microbial communities at dairy processing plant scale 172; 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113101>.
55. Gobierno de México. Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera (10 de julio de 2019). Boletín de exportaciones. <https://www.gob.mx/siap/documentos/boletin-de-exportaciones-106883>.
56. González Córdoba, A.F., Yescas, C., Ortiz-Estrada, A.M., De la Rosa-Alcaraz, M., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Córdoba, B. (2016). Invited review: Artisanal Mexican cheeses 99(5); 3250-3262. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10103>.
57. Huang Ge, X., Huang, X., Zhou, L., Wang, Y. (2022). Essential oil-loaded antimicrobial and antioxidant zein/poly (lactic acid) film as active food packaging 34. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100977>.
58. Huang, D., Men, K., Li, D., Wen, T., Gong, Z., Sunden, B., Wu, Z. (2020). Application of ultrasound technology in the drying of food products 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104950>.
59. Juric, M., Maslov Bandić, L., Carullo, D., Jurić, S. (2024). Technological advancements in edible coatings: Emerging trends and applications in sustainable food preservation 58. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103835>.
60. Kallinteri, L., Kostoula, O., Savvaidis. (2013). Efficacy of nisin and/or natamycin to improve the shelf-life of Galotyri cheese 36(2). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.05.006>.
61. Korakhashvili, A. y Jeiranashvili, G. (2016). Food safety hazards in Georgian Tushuri Guda cheese 14(3); 212-216. <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2016.08.005>.
62. Koketso Ncube, L., Uchenna Ude, A., Koketso Ncube, E., Zulkifli, R., Nongwe Beas, I. (2021). An Overview of Plastic Waste Generation and Management in Food Packaging Industries 6(1); 1-25. <https://doi.org/10.3390/recycling6010012>.
63. Krahulcová, M., Cverenkárová, K., Olejníková, P., Micajová, B., Koreneková, J., Birosová, L. (2022). Characterization of Antibiotic Resistant Coliform Bacteria and Resistance Genes Isolated from Samples of Smoothie Drinks and Raw Milk 11(9); 1-16. <https://doi.org/10.3390/foods11091324>.

64. Kumar, A., Kumar, R., Subudhi, S. (2023). Numerical modeling of forced-air pre-cooling of fruits and vegetables: A review 145; 217-232. <https://doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2022.09.007>.
65. Lan, W., Wang, S., Zhang, Z., Liang, X., Liu, X., Zhang, J. (2021). Development of red apple pomace extract/chitosan-based films reinforced by TiO<sub>2</sub> nanoparticles as a multifunctional packaging material 168; 105-115. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.051>.
66. Lei, T. y Sun, D.W. (2019). Developments of nondestructive techniques for evaluating quality attributes of cheeses: A review 88; 527-542. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.013>.
67. Leite, A.C., A. Cerqueira, M., Michelin, M., Fuciños, P., Pastrana, L. (2023). Antiviral edible coatings and films: A strategy to ensure food safety 138; 551-563. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.06.038>.
68. López Polo, J., Muñoz Shugulí, C., Patiño Vidal, M., Patiño Vidal, C. (2024). Electrospun edible films and coatings: Development, functionality and food applications 143. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.104253>.
69. López, M., Calvo, T., Prieto, M., Múgica Vidal, R., Muro Fraguas, I., Ordoñez Álvarez, A. (2019). A Review on Non-thermal Atmospheric Plasma for Food Preservation: Mode of Action, Determinants of Effectiveness, and Applications 10; 1-21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00622>.
70. López, R.P., Mota, M.J., Delgadoillo, I., Saraiva, J.A. (2016). Pasteurization: Effect on Sensory Quality and Nutrient Composition 246-263. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00524-9>.
71. López Villafañá, B.P., Rojas González, S., Román, R. (2023). The evolution of antioxidative properties of protein-derived peptides of Mexican Panela goat and cow milk cheese during its shelf life 21(1); 57-63. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19476337.2022.2152100>.
72. Luiz da Conceição, L., Valenzuela Campana, M.J., Alves da Rocha, R., Lizandra Leal, N., Carvalho dos Anjos, V. (2018). Detection of Veterinary Antimicrobial Residues in Milk through Near-Infrared Absorption Spectroscopy. *Journal of Spectroscopy* Vol. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5152832>.
73. Martín H, N., Snyder, A., Wiedmann, M. (2022). Spoilage Mold in Dairy Products 4; 607-610. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.23017-5>.
74. Martín H, N., Trmčić, A., Hsieh, T.H., Boor, K., Wiedmann, M. (2016). The Evolving Role of Coliforms As Indicators of Unhygienic Processing Conditions in Dairy Foods 7; 1-8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01549>.
75. Martillanes, S., Pimienta Rocha, J., Llera Oyola, J., Victoria Gil, M., Ayuso Yuste, M.C., García Parra, J., Delgado Adámez, J. (2021). Control of *Listeria monocytogenes* in sliced dry-cured Iberian ham by high pressure processing in combination with an eco-friendly packaging based on chitosan, nisin and phytochemicals from rice bran 124; 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107933>.
76. Meletios Bimpizas, P., Santagata, R., Kaiser, S., Liu, Y., Lyu, Y. (2022). Additives in the food supply chain: Environmental assessment and circular economy implications 14; 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.indic.2022.100172>.

77. Mei, J., Guo, Q, Wu, Y., Li, Y. (2015). Evaluation of Chitosan-Starch-Based Edible Coating To Improve the Shelf Life of Bod Ljong Cheese 78(7); 1327-1334. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-402>.
78. Merivaara, A., Zini, J., Koivunotko, E., Valkonen, S., Korhonen, O., Fernández M, F., Yliperttula, M. (2021). Preservation of biomaterials and cells by freeze-drying: Change of paradigm 336; 480-498. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.06.042>.
79. McMahon, D.J. y Oberg, C.J. (2017). Chapter 40 - Pasta-Filata Cheeses 1041-1068. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00040-5>.
80. McSweeney, P.L., Ottogalli, G., Fox, P.F. (2017). Chapter 31 - Diversity and Classification of Cheese Varieties: An Overview 781-808. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00031-4>.
81. Modugno, C., Loupiac C., Bernard, A., Jossier, A., Neiers, f., Perrier-Cornet, J.M., Simonin, H. (2018). Effect of high pressure on the antimicrobial activity and secondary structure of the bacteriocin nisin 47; 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.01.006>.
82. Montel, M.C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes Paus, C., Vuitton A, D., Desmasures, N., Berthier, F. (2014). Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits 177; 136-154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.019>.
83. Mozzi, F. (2016). Lactic Acid Bacteria 501-508. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00414-1>.
84. Moura Alves, M., Esteves, A., Ciriaco, M., Silva, J.A., Saraiva, C. (2023). Antimicrobial and Antioxidant Edible Films and Coatings in the Shelf-Life Improvement of Chicken Meat 12(12). <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/12/2308>.
85. Mu, X., Fan, J., Shuai, W., Tomeh, M.A., Zeng, L., Sun, X., Zhao, X. (2024). Microfluidic formulation of food additives loaded nanoparticles for antioxidation 234. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113739>.
86. Murindangabo, Y.T, Kopecký, M., Perná, K., Nguyen, G., Konvalina, P., Kavková, M. (2023). Prominent use of lactic acid bacteria in soil-plant systems 189. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0929139323001531>.
87. Narayana, K., Palliyaguru, O. (2022). Combined Effect of Milk Source and Acidification Method of Cheese Milk on Properties of Mozzarella Cheese 10(8); 1603-1610. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v10i8.1603-1610.4689>.
88. Nardo, F. y Anfossi, L. (2020). Chapter Eight - Commercial biosensors for detection of food additives, contaminants, and pathogens 183-215. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818592-6.00008-6>.
89. Narancic Y O'Connor. (2018). Plastic waste as a global challenge: are biodegradable plastics the answer to the plastic waste problem? 165(2); 129-137. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000749>.
90. Naskar, A. y Sun Kim, K. (2021). Potential Novel Food-Related and Biomedical Applications of Nanomaterials Combined with Bacteriocins 13(1); 1-15. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010086>.

91. Ngamwonglumlert, L. y Devahastin, S. (2018). Microstructure and its relationship with quality and storage stability of dried foods 139-159. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100764-8.00008-3>.
92. Ning, J., Yang, M., Zhu, Q., Luo, X., Yue, X., (2024). Peptidomics comparison of endogenous peptides derived from parent proteins in bovine colostrum and mature milk 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115648>.
93. Nochebuena Pelcastre, X., Álvarez-Contreras, A.K., Hernández-Robles, M.F., Natividad-Bonifacio, I., Parada-Fabián, J.C., Quiñones-Ramírez, E.I., Vázquez-Quiñones, C.R., Vázquez Salinas, C. (2023). Development of a low pollution medium for the cultivation of lactic acid bacteria 9(12); 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22609>.
94. Norouzi, Z., Salimi, A., Halabian, R., Fahimi, H. (2018). Nisin, a potent bacteriocin and anti-bacterial peptide, attenuates expression of metastatic genes in colorectal cancer cell lines 123; 183-189. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.07.006>.
95. Ntakatsane, M., Xu, L., Wang, L., Meng, X., Sun, W., Bi, Y., Chen, P., Ren, D. (2021). Improved sensitive fluorescent/visible dual detection count plate for mold and yeast in food 128; 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108174>.
96. Obinwanne Okoye, C., Dong, K., Wang, Y., Gao, L., Xia, L., Wu, Y., Jiang, Y. (2022). Comparative genomics reveals the organic acid biosynthesis metabolic pathways among five lactic acid bacterial species isolated from fermented vegetables 70; 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.05.001>.
97. ÓSullivan, O. y Cotter, P.D. (2017). Chapter 12 - Microbiota of Raw Milk and Raw Milk Cheeses 301-316. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00012-0>.
98. Padilla Frías, K.A., Granados Conde, C., León Méndez, G., Arrieta Pineda, Y., Torrenegra Alarcón, M. (2018). Evaluación de la influencia de la temperatura en el proceso de secado 16(1); 107-117. [https://revistas.unipamplona.edu.co/ojs\\_viceinves/index.php/ALIMEN/article/view/3935/2152](https://revistas.unipamplona.edu.co/ojs_viceinves/index.php/ALIMEN/article/view/3935/2152)
99. Perín M, L., Pereira, J., Bersot S, L., Nerón A, L. (2019). Chapter 3 - The Microbiology of Raw Milk 45-64. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810530-6.00003-1>.
100. Pires, S., Redondo G, H., Pessoa, J., Jakobsen, L., Thomsen, S. (2024). Risk ranking of foodborne diseases in Denmark: Reflections on a national burden of disease study 158; 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110199>.
101. Puscaselu, R., Gutt, G., Amariei, S. (2020). The Use of Edible Films Based on Sodium Alginate in Meat Product Packaging: An Eco-Friendly Alternative to Conventional Plastic Materials 10(2); 1-18. <https://doi.org/10.3390/coatings10020166>.
102. Qian, Y.F., Yu, J. Y., Ping Yang, S. (2023). A mini-review on cold-adapted enzymes from psychrotrophic microorganisms in foods: Benefits and challenges 6; 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2023.100162>.
103. Raeisi, M., Tabaraei, A., Hashemi, M., Behnampour, N. (2016). Effect of sodium alginate coating incorporated with nisin, Cinnamomum zeylanicum, and rosemary essential oils on microbial quality of chicken meat and fate of *Listeria monocytogenes* during refrigeration 238(5); 139-145. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.042>.
104. Ramírez Rivera, E., Galván Herrera, M.E., González López, C., Tello Torres, M., Sánchez González, C.N., Guerrero Ortiz, C.A., Hernández Salinas, G., Cabal Prieto, A., Herrera

- Corredor, J.A. (2023). Novel Oaxaca cheese-based food products prepared by molecular cooking techniques: An insight into attributes, emotions, memories, and liking 32. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2023.100694>.
- 105.Rangel Ortega, S., Campos Múzquiz, L., Charles Rodríguez, A., Chávez González, M., Palomo Ligas, L., Contreras Esquivel, J., Solanilla Duque, J., Flores Gallegos, A., Rodríguez Herrera, R. (2023). Biological control of pathogens in artisanal cheeses 140; 105612. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105612>.
- 106.Ritota, M., Manzi, P. (2020). Natural Preservatives from Plant in Cheese Making 10(4); 1-16. <https://doi.org/10.3390/ani10040749>.
- 107.Roy, D., Aiqian, Y., Moughan, P.J., Sing, H. (2020). Composition, Structure, and Digestive Dynamics of Milk from Different Species A Review 7;1-17. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.577759>.
- 108.Rodríguez Huevo, M. E., Estrada Fernández, A.G., García Almendárez., B.E., Ludeña Urquiza, F., Campos Montiel, R.G., Pimentel González, D.J. (2014). Viability of *Lactobacillus plantarum* entrapped in double emulsion during Oaxaca cheese manufacture, melting and simulated intestinal conditions 59(2); 768-773. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.07.004>.
- 109.Ruiz, M.J., Coello, R., Padola, N.L., Etcheverría, A.I. (2017). Capacidad inhibidora de *Lactobacillus* spp. contra patógenos implicados en enfermedades transmitidas por alimentos 49(2); 174-177. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.10.005>.
- 110.Sadiq, F.A., Li, Y., Liu, T., Flint, S., Zhang, G., He, G. (2016). A RAPD based study revealing a previously unreported wide range of mesophilic and thermophilic spore formers associated with milk powders in China (217); 200-208. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.030>.
- 111.Sahaa, S., Majumder, R., De ruta, P., Hossain, S. (2024). Unveiling the significance of psychrotrophic bacteria in milk and milk product spoilage A review 2; 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100034>. Saravanakumar, A., Chen, W.H., Pradeshwaran, V. (2024). A review on green adsorbent from plastic waste-derived char for wastewater treatment: Production, aqueous contaminants adsorption, and applications. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2024.105437>.
- 112.Saleh Ibrahim, Y., Ramírez coronel, A.A., Kumar Sain, D., Haleem Al qaim, Z., Hassan Jawhar, Z., Mahmood Alabdali, A.Y., Jasim Ali, S.J., Althomali, R.H., Fakri Mustafa, Y., RomerocParra, R.M. (2023). Advances in nanomaterials-based chemiluminescence (bio)sensor for specific and sensitive determination of pathogenic bacteria 191. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108860>.
- 113.Salgado, C.A., Baglinière, F., Dantas Vanetti, M.C. (2020). Spoilage potential of a heat-stable lipase produced by *Serratia liquefaciens* isolated from cold raw milk 126; 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109289>.
- 114.Santiago López, L., Aguilar Toalá, J.E., Hernández-Mendoza, A., Vallejo Córdoba, B., Liceaga, A., Gonzales-Córdoba, A.F. (2018). Invited review: Bioactive compounds produced during cheese ripening and health effects associated with aged cheese consumption 101(5); 3742-3757. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13465>.
- 115.Sepúlveda R, D. y Esparza Chávez, A. (2016). Chapter 10 - Safety of Fermented Dairy Products 187-204. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800605-4.00010-4>.

116. Setiarto, R., Anshory, L., Wardana, A. (2022). Biosynthesis of nisin, antimicrobial mechanism and its applications as a food preservation: A review. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/1169/1/012105/meta>.
117. Shan Jin, S., Wang, Y., Zhao, X. (2022). Cold-adaptive mechanism of psychrophilic bacteria in food and its application 169. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105652>.
118. Shaala, E., Awad, S., Nazem, A. (2020). Application of Natural Antimicrobial Additives and Protective Culture to Control Aerobic Spore Forming Bacteria in Low Salt Soft Cheese 10(4): 609-616. [https://www.researchgate.net/publication/355452625\\_Application\\_of\\_Natural\\_Antimicrobial\\_Additives\\_and\\_Protective\\_Culture\\_to\\_Control\\_Aerobic\\_Spore\\_Forming\\_Bacteria\\_in\\_Low\\_Salt\\_Soft\\_Cheese](https://www.researchgate.net/publication/355452625_Application_of_Natural_Antimicrobial_Additives_and_Protective_Culture_to_Control_Aerobic_Spore_Forming_Bacteria_in_Low_Salt_Soft_Cheese).
119. Shikha Ojha, K., Kerry, J., Tiwari, B., O'Donnell, C. (2016). Freezing for Food Preservation 1-9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03108-5>.
120. Shivaee, A., Rajabi, S., Farahani, H., Fooladi, A. (2021). Effect of sub-lethal doses of nisin on *Staphylococcus aureus* toxin production and biofilm formation. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2021.03.018>.
121. Silva Costa., Meneses Silva, P., C Ribeiro., S. (2018). Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation 9; 1-15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>.
122. Silva, S., Couto Teixeira, J.A., Silva, C. (2023). Recent advances in the use of edible films and coatings with probiotic and bacteriocin-producing lactic acid bacteria 56; 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103196>.
123. Tavares, T., Ribeiro, A., Silva, C., Antunes, J., Felgueiras, H. (2024). Combinatory effect of nisin antimicrobial peptide with bioactive molecules: A review 95. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105246>.
124. Tominaga, T. (2019). Rapid detection of coliform bacteria using a lateral flow test strip assay 160; 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.03.013>.
125. Trmcic, A., Chauhan, K., Kent, D.J., aburrido, K.J., Wiedmann, M. (2016). Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection 99(8); 6105-6120. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11112>.
126. Tuany Hoffmann, G., Francisco Ronzoni, A., Lôndero da Silva, D., Leandro Bertoli, S., Krebs de Souza, C. (2021). Impact of household refrigeration parameters on postharvest quality of fresh food produce 306; 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110641>.
127. Valadez Carmona, L., Plazola Jacinto, C.P., Hernández Ortega, M., Hernández Navarro, M.D., Villarreal, F., Necochea Mondragón, H., Ortiz Moreno, A., Ceballos Reyes, G. (2017). Effects of microwaves, hot air and freeze-drying on the phenolic compounds, antioxidant capacity, enzyme activity and microstructure of cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) 41; 378-386. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.012>.
128. Verma Kumar, D., Thakur, M., Singh S., Tripathy, S., Kumar Gupta, A., Baranwal, D., R Patel, A., Shah, N., Lara Utama, G., Kareem Niamah, A., Chávez González, M.L., Flores

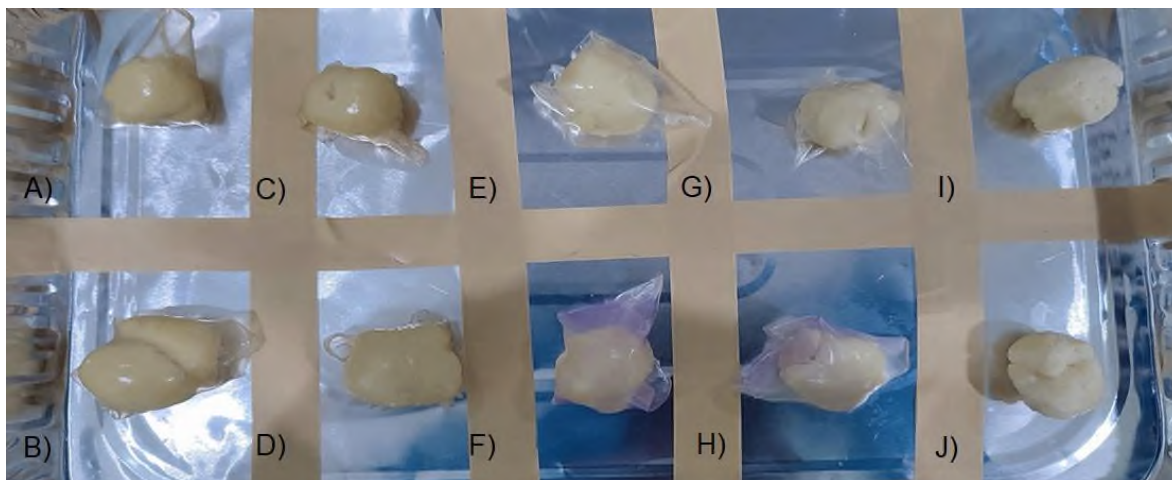
- Gallegos, C., Aguilar, C.E., Prakash Srivastav, P. (2022). Bacteriocins as antimicrobial and preservative agents in food: Biosynthesis, separation and application 46; 101594. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101594>.
- 129.Vithanage, N., Dissanayake, M., Bolge, G., Palomboc, E., Yeager, T., Datta, N. (2016). Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential 57; 80-90. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.02.042>.
- 130.Warner, D., Zhongxiang, C., Cao, Y. (2019). Effect of chitosan/nisin/gallic acid coating on preservation of pork loin in high oxygen modified atmosphere packaging 101; 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.02.013>.
- 131.Waghmare, R., Kumar, M., Yadav, R., Sonawane, S., Sharma, S., Gat, Y., Chandran, D., Muzaffar, H., Dey, A., Sarkar, T., Banwo, K., Alao, M., Balakrishnan, J., Suryawanshi, D., Lorenzo, J.M. (2023). Application of ultrasonication as pre-treatment for freeze drying: An innovative approach for the retention of nutraceutical quality in foods 404. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134571>.
- 132.Waghmare, R., Perumal, A., Moses, J.A., Anandharamakrishnan, C. (2021). Recent Developments in Freeze Drying of Foods 3; 82-99. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815781-7.00017-2>.
- 133.Wang, N., Jin, Y., He, G., Lei, Y. (2021). Development of multi-species biofilm formed by thermophilic bacteria on stainless steel immersed in skimmed milk 150. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110754>.
- 134.Wiwanitkit, V. (2018). Chapter 2 - Important Emerging and Reemerging Tropical Food-Borne Diseases 33-55. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811444-5.00003-8>.
- 135.Xiang, L. y Mohammed, F. (2016). A review on recent development in non-conventional food sterilization technologies 182; 33-45. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.02.026>.
- 136.Xiong, Y., Cheng, M., Dorothy Warner, R., Zhongxiang, F. (2020). Incorporating nisin and grape seed extract in chitosan-gelatine edible coating and its effect on cold storage of fresh pork 110; 1-30. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107018>.
- 137.Yaashikaa, P.R., Kamalesh, R., Senthil Kumar, P., Saravanan, S., Vijayasri, K., Rangasamy, G. (2023). Recent advances in edible coatings and their application in food packaging 173. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113366>.
- 138.Yang, H., Chen, Z., Wang, H., Danping, J., Wang, X., Wang, F., Xuejiang, C., Liu, J., Shen, Q. (2024). Uncovering the rheological properties basis for freeze drying treatment-induced improvement in the solubility of myofibrillar proteins 8; 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.crf.2023.100651>.
- 139.Yoon, Y., Lee, S., Hee Choi, K. (2016). Microbial benefits and risks of raw milk cheese 63; 201-215. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.013>.
- 140.Yuan, L., Sadiq, F., Burmølle, M., Wang, N., He, G. (2019). Insights into Psychrotrophic Bacteria in Raw Milk: A Review 82; 1148-1159. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-032>.
- 141.Zhang, W., Roy, S., Ezati, P., Yang, D., Rhim, J.W. (2023). Tannic acid: A green crosslinker for biopolymer-based food packaging films 136; 11-23. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.04.004>.

## VII. REFERENCIAS

- 142.Zhang, X., Balarabe, I., Cheng, H., Jin, T., Qian, M., Ali Arabi, S., Liu, D., Guo, M. (2021). Emerging chitosan-essential oil films and coatings for food preservation - A review of advances and applications 273; 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118616>.
- 143.Zhang, Y., Wei, J., Yuan, Y., Yue, T. (2019). Diversity and characterization of spoilage-associated psychrotrophs in food in cold chain 290; 86-95. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.026>.
- 144.Zhang, M., Luo, W., Yang, K., Cheng, L. (2022). Effects of Sodium Alginate Edible Coating with Cinnamon Essential Oil Nanocapsules and Nisin on Quality and Shelf Life of Beef Slices during Refrigeration 85(6); 896-905. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-380>.
- 145.Zhang, F., Zhao, Y., Wang, D., Yan, M., Zhang, J., Zhang, P., Ding, T., Lei, C., Chen, C. (2021). Current technologies for plastic waste treatment: A review (282); 1-101. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124523>.
- 146.Zhang, R., Wang, B., Zhang, F., Liu, Y. (2024). Milk-derived antimicrobial peptides incorporated whey protein film as active coating to improve microbial stability of refrigerated soft cheese 419. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160524001958?via%3Dihub>
- 147.Zheng, Y., Gracia, A., Hu, L. (2023). Predicting Foodborne Disease Outbreaks with Food Safety Certifications: Econometric and Machine Learning Analyses 86; 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2023.100136>.
- 148.Zhong, Y., Cavender, G., Zhao, Y. (2014). Investigation of different coating application methods on the performance of edible coatings on Mozzarella cheese 56(1); 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.006> .

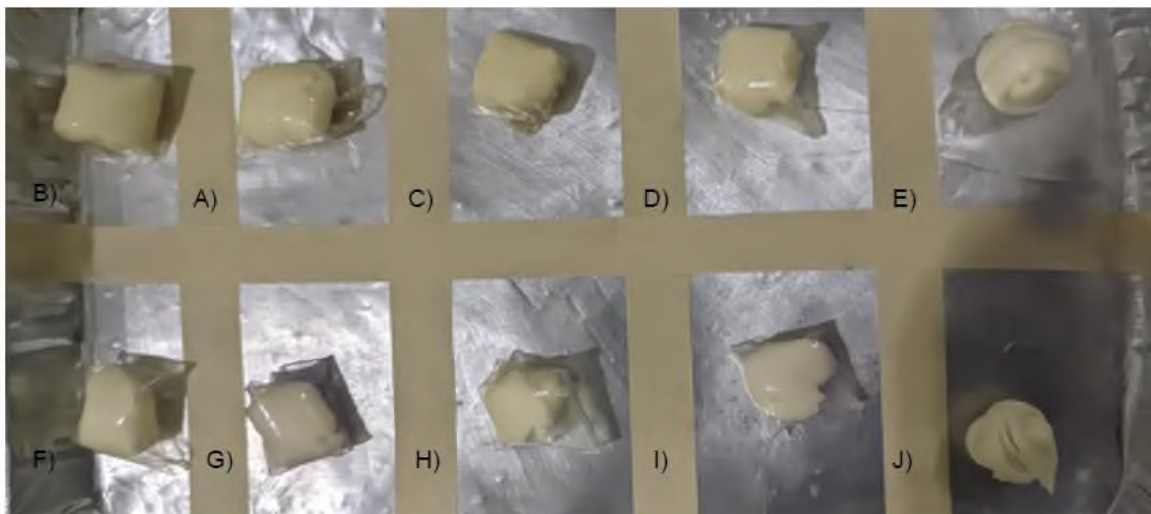
## VIII. ANEXOS

## Anexo A



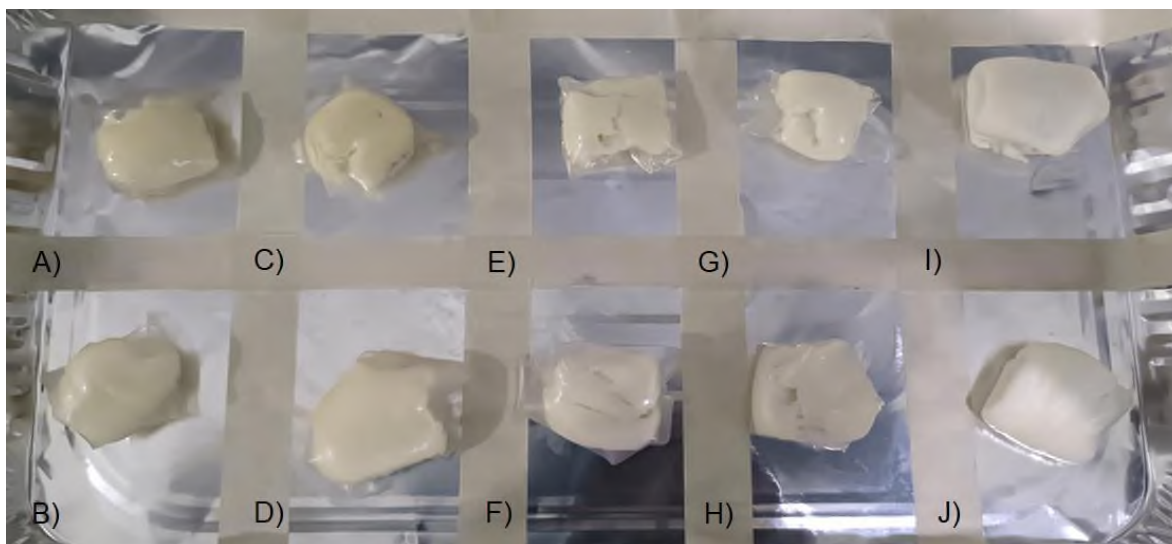
Tratamientos experimentales (termofílicos) del queso de pasta hilada con aplicación del recubrimiento: A) T1(NI2525), B) T2(2550), C) T3(5025), D) T4(NI5050). Blancos: E) B1(NI2525), F) B2(2550), G) B3(5025), H) B4(NI5050). Quesos sin recubrimiento: I)-J).

## Anexo B



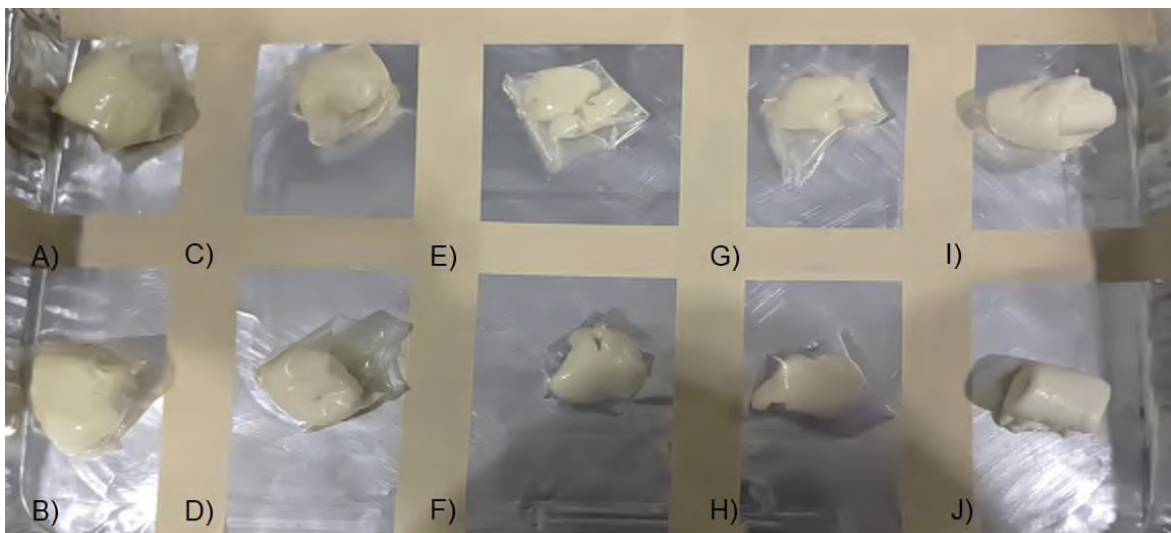
Tratamientos experimentales (psicrotróficos) del queso de pasta hilada con aplicación del recubrimiento: A) T1(NI2525), B) T2(2550), C) T3(5025), D) T4(NI5050). Blancos: F) B1(NI2525), G) B2(2550), H) B3(5025), I) B4(NI5050). Quesos sin recubrimiento: E)-J).

## Anexo C



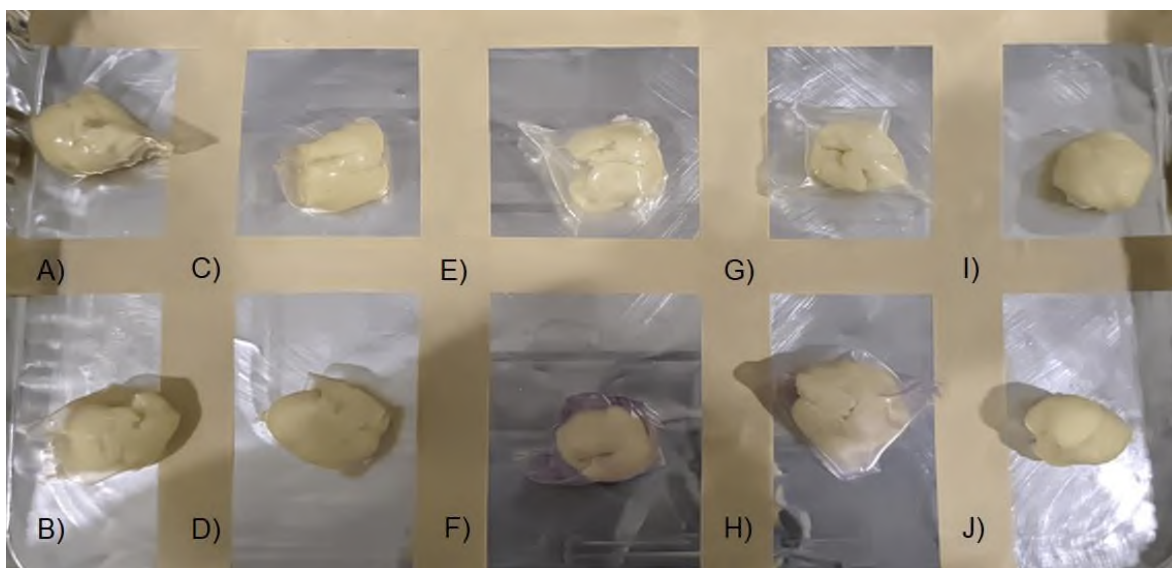
Tratamientos experimentales (psicrofílicos) del queso de pasta hilada con aplicación del recubrimiento: A) T1(NI2525), B) T2(2550), C) T3(5025), D) T4(NI5050). Blancos: E) B1(NI2525), F) B2(2550), G) B3(5025), H) B4(NI5050). Quesos sin recubrimiento: I)-J).

## Anexo D



Tratamientos experimentales (mohos y levaduras) del queso de pasta hilada con aplicación del recubrimiento: A) T1(NI2525), B) T2(2550), C) T3(5025), D) T4(NI5050). Blancos: E) B1(NI2525), F) B2(2550), G) B3(5025), H) B4(NI5050). Quesos sin recubrimiento: I)-J).

## Anexo E



Tratamientos experimentales (coliformes) del queso de pasta hilada con aplicación del recubrimiento: A) T1(NI2525), B) T2(2550), C) T3(5025), D) T4(NI5050). Blancos: E) B1(NI2525, F) B2(2550), G) B3(5025), H) B4(NI5050). Quesos sin recubrimiento: I)-J).

## Anexo F

## Conteo de microorganismos

- Seleccionar placas que tengan de 25 a 250 colonias.
- Cuando solo una dilución está en el intervalo apropiado, calcular la cuenta promedio por g o mL de dicha dilución.
- Si dos diluciones se encuentran en el intervalo adecuado, determinar la cuenta promedio por cada dilución antes de promediar la cuenta de las dos diluciones para obtener la cuenta en placa por g o mL.
- Si las placas cuentan con menos de 25 colonias, se cuentan las colonias presentes en la dilución, promediar el número de colonias y multiplicar por el factor de dilución.
- Si las placas cuentan con más de 250 colonias, se cuentan en porciones representativas, la mitad o una cuarta parte y se multiplica por el factor de dilución. Si solo puede contarse algunos cuadros (considerar que una placa posee 65 cuadros en 100 mm).