

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN
INDUSTRIAS ALIMENTARIAS



T E S I S

**“EFECTO DE LA INOCULACIÓN DEL CULTIVO PROTECTOR EN LA
INHIBICIÓN DE *Escherichia coli* EN LECHE FRESCA EN EL FUNDO LA
VICTORIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA 2019”**

Para optar el Título Profesional de:

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Presentado por el Bachiller:

GABRIELA SOFÍA VALERA VILLANUEVA

Asesor:

Ing. M. Cs. JIMY FRANK OBLITAS CRUZ

CAJAMARCA - PERÚ

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
Norte de la Universidad Peruana
Fundada por Ley 14015 del 13 de febrero de 1962
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
Secretaría Académica



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

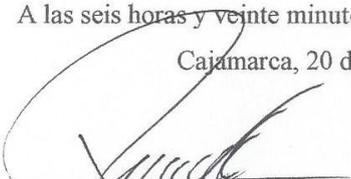
En Cajamarca, a los veinte días del mes de diciembre del Año dos mil diecinueve, se reunieron en el ambiente 2C – 211 de la Facultad de Ciencias Agrarias, los integrantes del Jurado designados por el Consejo de Facultad de Ciencias Agrarias, según Resolución de Consejo de Facultad N° 438-2019-FCA-UNC, Fecha 23 de Octubre del 2019, con el objeto de Evaluar la sustentación de la Tesis titulada: **“EFECTO DE LA INOCULACIÓN DE CULTIVO PROTECTOR, EN LA INHIBICIÓN DE *Escherichia coli*, EN LECHE FRESCA EN EL FUNDO LA VICTORIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA”**, para optar el Título Profesional de **INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**, de la Bachiller: **VALERA VILLANUEVA GABRIELA SOFÍA**.

A las cinco horas y cinco minutos y de acuerdo a lo estipulado en el Reglamento respectivo, el Presidente del Jurado dio por iniciado el acto. Después de la exposición del trabajo de Tesis, la formulación de preguntas y de la deliberación del Jurado, el Presidente anunció la aprobación por unanimidad con el calificativo de diecisiete (17)

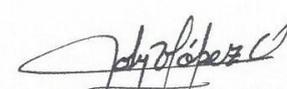
Por lo tanto, el graduando queda expedita para que se le expida el **Título Profesional** correspondiente.

A las seis horas y veinte minutos, el Presidente del Jurado dio por concluido el acto.

Cajamarca, 20 de diciembre de 2019.



Dr. Manuel Salomón Roncal Ordóñez
PRESIDENTE



Blgo. M. Sc. Jhon Víctor López Orbegoso
SECRETARIO



Ing. M. Sc. Jorge Ricardo De la Torre Araujo
VOCAL



Ing. M. Sc. Jimmy Frank Oblitas Cruz
ASESOR

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios por brindarme la oportunidad de haber llegado hasta este punto importante de mi formación académica.

A mi madre por ser el pilar más importante de mi vida y ser el principal motor para realizar todos los logros que he obtenido hasta el momento.

A mis abuelos que no se encuentran físicamente para ver este logro, pero son mis ángeles, que me acompañan y guían en todas las decisiones que tomo.

A mi familia por su apoyo constante y porque contribuyen en mi desarrollo personal y profesional.

AGRADECIMIENTO

A mi madre por su fuerza y aliento en todo el proceso para culminar este trabajo de investigación. Por enseñarme a no rendirme ante ningún obstáculo que se presentó en el proceso.

A mi tía Ruth por su apoyo constante, su guía y sus consejos durante todo el proceso de mi tesis.

Al Ing. Mg.Cs. Jimmy Oblitas por brindarme sus conocimientos profesionales, orientación, la guía y el asesoramiento durante la elaboración de esta investigación.

Al Doctor Marco Rivera quien me brindo las facilidades de laboratorio para realizar la parte experimental, así como también, por su tiempo y predisposición en apoyarme durante la realización del presente proyecto de investigación

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	iii
Agradecimiento	iv
Índice general	v
Índice de tablas	vii
Índice de figuras	viii
Resumen	ix
Abstract	x
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema	2
1.2. Objetivo general de la investigación	2
1.2.1. Objetivos específicos	2
1.3. Hipótesis	2
1.3.1. Hipótesis alternativa	2
1.3.2. Hipótesis nula	2
CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Antecedentes de la investigación.	3
2.2. Bases Teóricas	5
2.2.1. <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	5
2.2.2. Característica de <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	7
2.2.3. Propiedades	7
2.2.4. Actividad antagónica de <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	8
2.2.5. Mecanismos de acción:	9
2.2.6. <i>Escherichia coli</i>	10
2.2.7. Leche	14
2.2.8. Microorganismos indicadores de contaminación	10
2.2.9. Requisitos microbiológicos de la leche y productos lácteos	22
2.2.6. Metodo para determinación de carga bacteriana	23
CAPÍTULO III MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Ubicación geográfica del trabajo de investigación	24
3.2. Materiales	24
3.2.1. Materia prima:	24

3.2.2.Materiales de laboratorio	24
3.2.3.Equipos de laboratorio:	24
3.3. Métodos de análisis	25
3.3.1.Análisis fisicoquímico	25
3.3.2.Análisis Microbiológico	25
3.4. Metodología experimental	26
3.4.1.Tipo de la investigación	26
3.4.2.Identificación de Variables	26
3.4.3.Definiciones operacionales	26
3.4.4.Descripción de operaciones del proceso.	28
3.4.5.Parte experimental de la investigación	29
3.4.6.Esquema experimental	31
3.4.7.Unidad de análisis y muestra	33
3.4.8.Instrumentos de colecta de datos	33
3.4.9.Procedimiento de análisis de datos	33
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1. Determinación del efecto de la inoculación de cultivo protector en el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en leche fresca.	34
4.2. Comportamiento de <i>E coli</i> en la muestra control	37
4.3 Comportamiento de <i>E coli</i> en la muestra 1 (C1)	38
4.4. Comportamiento de <i>E. coli</i> en la muestra 2 (C2)	38
4.5. Comportamiento de <i>E. coli</i> en la muestra 3 (C 3)	39
4.6. Comportamiento de <i>E. coli</i> en las 4 muestras analizadas	40
CAPÍTULO VI:CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	44
CAPÍTULO VII:REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45
ANEXOS	51
GLOSARIO	459

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1 Bacteriocinas producida por <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	9
Tabla 2 Clasificación taxonómica de <i>Escherichia coli</i>	11
Tabla 3 Influencia de pH en multiplicación de bacterias	14
Tabla 4 Composición nutricional de la leche entera	17
Tabla 5 Especificaciones sanitarias microbiológicas para leche cruda	21
Tabla 6 Dimensiones e indicadores de las variables dependientes e independientes	26
Tabla 7 Esquema experimental de la investigación	32
Tabla 8 Instrumento de colecta de datos	33
Tabla 9 Evaluación del efecto de la inoculación de cultivo protector en el crecimiento de <i>E. coli</i> en leche fresca.....	34
Tabla 10 ANOVA: Análisis de varianza para UFC de <i>Escherichia coli</i>	41

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1 Diseño Placas Petrit Film	23
Figura 2 Diagrama de flujo para la evaluación <i>Escherichia coli</i> en leche cruda a distintas concentraciones de cultivo	27
Figura 3 Superficie de respuesta estimada para UFC de <i>Escherichia coli</i> en función de la concentración del cultivo y tiempo de conservación.....	36
Figura 4 Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en leche fresca en muestra control	37
Figura 5 Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en leche fresca en muestra 1 (C1)	38
Figura 6 Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en leche fresca en muestra 2 (C2)	38
Figura 7 Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en leche fresca en muestra 3 (C3)	39
Figura 8 Curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en las 4 muestras a temperatura de refrigeración.....	40
Figura 9 Diagrama de Pareto estandarizado para UFC	42
Figura 10 Grafica de efectos principales para UFC	43

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar el efecto de *Lactobacillus rhamnosus*, cultivo protector comercial, sobre la multiplicación de *Escherichia coli* en leche fresca proveniente del fundo la Victoria de la Universidad Nacional de Cajamarca. Se trabajó con 7 litros de leche por cada repetición realizada, de los cuales 4 litros fueron utilizados para la preparación del cultivo madre, 1 litro se utilizó para efectuar los análisis fisicoquímicos, para las 3 concentraciones de cultivo se hizo uso de 0.5 litros de leche fresca por cada concentración y finalmente 0.5 litros para el análisis de la muestra control. Las tres concentraciones utilizadas fueron de 0.00025 g, 0.0015 g y 0.003 g del cultivo protector *L. rhamnosus*. Se evaluó el pH y la temperatura antes de la inoculación; el efecto del inóculo sobre el crecimiento de *E. coli* se determinó mediante el recuento en placa de unidades formadoras de colonias (UFC), con la técnica de láminas petrifilm. Las muestras inoculadas y el control fueron almacenadas a temperatura de refrigeración (4-8°C) por el lapso de 24 horas, realizándose el recuento a las 0 horas, 8 horas y 24 horas. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el programa Statgraphics, el cual mediante un análisis de varianza (ANOVA) mostró que tanto la concentración de cultivo como el tiempo de conservación tienen un valor – P menor a 0.05, indicando que tienen un valor significativo sobre el crecimiento de UFC de *E. coli*. También se realizó un Diagrama de Pareto estandarizado para UFC, el cual mostró que a mayor concentración de cultivo protector existe una mayor inhibición de UFC de *E. coli*; con respecto al tiempo de conservación, mostró que a un mayor tiempo de conservación existe un mayor crecimiento de colonias de UFC de *Escherichia coli*.

Palabras Clave: *Lactobacillus rhamnosus*, *Escherichia coli*, Leche fresca de vaca, cultivo protector, concentraciones de cultivo

ABSTRACT

The objective of this research work was to determine the effect of *Lactobacillus rhamnosus* commercial protector on the multiplication of *Escherichia coli* in fresh milk from the Victoria estate of the National University of Cajamarca. They were used with 7 liters of milk for each repetition performed, of which 4 liters were used for the preparation of the mother culture, 1 liter was used to control the physicochemical analyzes, for the 3 culture concentrations, 0.5 liters were used of fresh milk for each concentration and finally 0.5 liters for the control sample analysis. The three concentrations used were 0.00025 g, 0.0015 g and 0.003 g of the *Lactobacillus rhamnosus* commercial protective crop. The pH and temperature were evaluated before inoculation; The effect of the inoculum on the growth of *Escherichia coli* was determined by plate count of colony forming units (CFU), with the Petrifilm sheet technique. The inoculated samples and the control were stored at a refrigeration temperature (4-8 ° C) for a period of 24 hours, counting at 0 hours, 8 hours and 24 hours. The results obtained were analyzed using the Statistical program, which by means of an analysis of variance (ANOVA) selected both the crop concentration and the conservation time have a P-value of less than 0.05, indicating that they have a significant value on the growth of CFU of *Escherichia coli*. A Standardized pareto diagram for CFU was also performed, which resulted in a higher concentration of protective culture there is a greater inhibition of CFU from *Escherichia coli*; with respect to the conservation time, select that a longer conservation time there is a greater growth of CFU colonies of *Escherichia coli*

Keywords: *Rhamnosus lactobacillus*, *Escherichia coli*, Fresh milk, protective crop, crop concentration

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La leche es un alimento completo y balanceado, necesario para suplir las demandas nutricionales de una población creciente. Está más cercano a lo ideal en términos nutricionales ya que posee todo tipo de nutrientes en diferentes proporciones (Calderón *et al* 2006). Sin embargo, también sirve como un buen medio para el crecimiento de muchos microorganismos, especialmente patógenos bacterianos (Mora, 2003). Por lo que, es necesario implementar un sistema de control de microorganismos para garantizar una leche con baja carga microbiana para la elaboración de productos lácteos de buena calidad, de tal manera que asegure al consumidor la entrega de productos inocuos.

La calidad de la leche cruda se establece mediante medidas higiénicas, saludables y composicionales. Según Alais (1985) puede considerarse desde dos aspectos esenciales la calidad química corresponde a su composición, características organolépticas, fisicoquímicas y valor nutritivo que deben encontrarse en un nivel favorable que permita conservar diferentes aptitudes que son importantes en el proceso y la calidad higiénica está relacionada con la carga y tipo de microorganismos, con la flora inocua y la flora productora de enzimas termo resistentes, estas últimas potencialmente causantes de accidentes de fabricación.

Otro aspecto importante en la producción de leche es que es una fuente de empleo desde su ordeño en el hato hasta la llegada al consumidor, lo cual estimula una firme competitividad no solo nacional sino internacional por la conquista de nuevos mercados (González *et al* 2010).

En relación a lo señalado anteriormente es necesario velar por una producción libre de microorganismos patógenos, por lo cual para este trabajo de investigación se plantea la utilización de cultivos protectores compuestos de cepas de *Lactobacillus rhamnosus* aplicados a la leche fresca, inmediatamente después del ordeño. El proceso está basado en un efecto competitivo contra los microorganismos en general, incluyendo patógenos, con la producción de metabolitos anti-microbianos como ácidos orgánicos y péptidos. Con la finalidad de buscar la inhibición de microorganismos tales como *Escherichia coli*.

1.1. Formulación del problema

¿Cuál es el efecto de la inoculación de cultivo protector en la inhibición de *Escherichia coli* en leche fresca en el fundo La Victoria de la Universidad Nacional de Cajamarca?

1.2. Objetivo general de la investigación

Determinar el efecto de la inoculación de cultivo protector en el crecimiento de *Escherichia coli* en leche fresca en el fundo La Victoria de la Universidad Nacional de Cajamarca.

1.2.1. Objetivos específicos

- Identificar la carga inicial de *Escherichia coli* contenida en la leche fresca de vaca proveniente del fundo la Victoria- Cajamarca.
- Determinar la manera en que influye las concentraciones de cultivo protector utilizadas en la inhibición de las unidades formadoras de colonias de *Escherichia coli* en leche fresca de vaca en condiciones de refrigeración

1.3. Hipótesis

1.3.1. Hipótesis alternativa

Al aumentar las concentraciones de cultivo protector *Lactobacillus rhamnosus* habrá una mayor inhibición de UFC de *Escherichia coli*

1.3.2. Hipótesis nula

Al aumentar las concentraciones de cultivo protector *Lactobacillus rhamnosus* no habrá una mayor inhibición de UFC de *Escherichia coli*

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes de la investigación.

Estudios en conservación natural de alimentos han permitido identificar cepas de cultivos capaces de ejercer efecto protector en los derivados lácteos, mediante la producción de antibióticos contra la flora contaminante. Además de colonizar el medio donde son añadidos, imparten un sabor agradable al paladar. Su aplicación se extiende a quesos madurados y frescos, yogurt, bebidas lácteas fermentadas e inclusive en las superficies de los quesos.

Los reportes de la investigación realizada por la empresa Tutteur Alimentos (2013) de un estudio realizado por Laura Robert, en el cual evaluaba la acción del cultivo *Lactobacillus rhamnosus* (LRB) en la calidad de leche cruda, analizando la presencia de bacterias mesófilas, indica que la investigación se ejecutó agregando el cultivo protector al silo de leche cruda conservada en frío durante dos días; haciendo el conteo de colonias a las 0, 24 y 48 horas después de adicionado el cultivo. La dosis usada en este estudio fue de 5 gr de cultivo protector en 10000 litro de leche. Los resultados obtenidos fueron positivos, haciendo la comparación con un silo control de leche fresca sin cultivo, debido a que hubo una reducción de bacterias aerobias mesófilas, pasando de una concentración de colonias de 5.7×10^6 a las 0 horas, 1.7×10^6 a las 8 horas y manteniendo esta última concentración de colonias a las 48 horas. Mientras que en el silo control se contabilizó 4.6×10^6 a las 0 horas, 6.7×10^6 a las 24 horas y 4.4×10^6 a las 48 horas.

Por otro lado Bernilla (2016) publicó un artículo en la revista Industria Alimentaria N°32 referido al efecto protector del cultivo *Lactobacillus rhamnosus* (LRB) en leche fresca contra bacterias psicrótrofas. Este estudio se realiza debido a que en los últimos años, en la industria se ha accedido a la posibilidad de refrigerar la leche en las diferentes etapas desde el ordeño hasta la industrialización, lo que ha conllevado a disminuir la cantidad de bacterias; sin embargo, la refrigeración contribuye al aumento de bacterias psicrótrofas, las cuales crecen a una temperatura de 4°C- 8°C por un periodo de tiempo de 2 a 10 días. En este estudio se evidencio que la aplicación de este cultivo en leche fresca refrigerada

fue efectivo; sin embargo solo se detectó una reducción de bacterias psicrótrofas, más no una eliminación completa de bacterias. Se realizó el análisis a las 0, 24 y 48 horas después de añadido el cultivo comparando con un tanque control de leche sin cultivo. Los resultados obtenidos en el tanque con cultivo fueron de 5.6×10^6 UFC a las 0 horas, 1.7×10^6 UFC a las 24 horas y 1.0×10^6 UFC a las 48 horas mientras que en el tanque control se contabilizó 3.9×10^6 UFC a las 0 horas, 5.8×10^6 UFC a las 24 horas y 3.1×10^6 UFC a las 48 horas.

Lima, D'amico y Montanholu (2017) realizaron un estudio sobre de inhibición de *Pseudomonas fluorescens* por *Lactobacillus rhamnosus* en leche refrigerada. Para lo cual aislaron e identificaron cepas de *P. fluorescens* de leche cruda refrigerada recolectadas de tanques de expansión de productores de leche en la región norte de Paraná- Brasil. Para la preparación de las muestras utilizaron tres concentraciones de *L. rhamnosus* inoculadas en 50 ml de leche estéril, las cuales fueron sometidas a 4 temperaturas por 72 horas para la pre activación del cultivo, luego se les añadió 150 ml de leche previamente inoculada con 10^6 UFC/ml de *P. fluorescens*, finalmente fueron almacenadas $10^\circ\text{C}/ 48$ horas. Se utilizó para la verificación del estudio, una muestra control con concentración inicial de 10^6 UFC/ml de *P. fluorescens*, los análisis se realizaron pasadas las 48, 72 y 96 horas. Como resultado obtuvieron la reducción de un ciclo logarítmico de *P. fluorescens* sin reducción de pH que fue obtenido de las muestras de leche que contenían 10^4 y 10^6 UFC/ml de *L. rhamnosus* pre activado a 21°C . El tiempo de almacenamiento contribuyo en la reducción de *P. fluorescens* sin influencia de pH.

Arias et al., (2013) probaron la eficiencia de las cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium animalis* para antagonizar los patógenos resistentes a antibióticos *Salmonella enteritidis* var *Thyphimurium* y *E. coli* O157:H7. Las tres cepas probióticas mostraron poseer un efecto antagónico contra las cepas patógenas *Salmonella Thyphimurium* y *E. coli* O157:H7 resistentes a antibióticos. En la prueba de "Well Diffusion", *L. acidophilus* y *L. Rhamnosus* presentaron reducciones estadísticamente semejantes entre ellas ($P > 0.05$) de 37-41 mm para *E. Coli* O157:H7 y de 32 – 41 mm para *Salmonella thyphimurium*, mientras que y *Bifidobacterium animalis* mostró reducciones menores ($P < 0.05$).

Durán et al. (2010) realizó un estudio acerca de la evaluación higiénico-sanitaria y acción antagonica de cepas de *Lactobacillus* comerciales frente a microorganismos patógenos (*Escherichia coli*) presentes en el queso de capa del municipio de Mompo en el departamento de Bolívar, Colombia dando como resultado que los quesos se encontraban contaminados con *E.coli*, además evidenciaron una manipulación higiénica deficiente durante la elaboración del producto, en cuanto a los resultados del efecto inhibitorio demostraron la sensibilidad de microorganismos patógenos (*E. coli*), frente a *Lactobacillus*. Las bacteriocinas ejercieron su poder antibiótico frente a microorganismos relacionados o presentes en su ambiente, disminuyendo la presencia de causantes del deterioro y/o de patógenos en los alimentos.

Risco (2015) realizó una investigación en la cual evaluaba el efecto de diferentes poblaciones de *Lactobacillus casei* var *Rhamnosus* sobre una población de *E. coli* ATCC 259922, inoculado en queso mantecoso. Para el estudio realizó tres muestras problema y una control, en la cual adicionó a los quesos mantecoso en la etapa del amasado, tres concentraciones iniciales de *Lactobacillus Casei* var. *Rhamnosus* (10^3 , 10^6 y 10^9 UFC/mL) sobre una población inicial de *Escherichia coli* ATCC 25922 (10^3 UFC/mL) en cada muestra problema, mientras que para el grupo control solo se inoculó una población inicial de *E. coli* ATCC 25922 de 10^3 UFC/mL para efectos de comparación. Cada muestra se almacenó a una temperatura que osciló entre 8 ± 2 °C por 15 días, realizándose análisis microbiológicos diariamente. Como resultado se obtuvo que la muestra a la cual se inoculó una concentración 10^9 UFC/mL de *L. Casei* var *Rhamnosus* ejerció un efecto bactericida sobre la población 10^3 UFC/mL de *E. Coli* puesto que redujo a dicha bacteria hasta una población de 10 UFC/g en el día 15 de la investigación.

2.2.Bases Teóricas

2.2.1. *Lactobacillus rhamnosus*

El cultivo utilizado se compone de una cepa seleccionada de *L. rhamnosus* que se aplica en productos de leche fermentada, así como también en quesos para producir ácido láctico. Estas bacterias poseen acción sobre microorganismos deteriorantes y patógenos, su acción se da gracias a la producción de compuestos con capacidad antimicrobiana, como ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, antibióticos y bacteriocinas (Todorov y Dicks, 2005).

L. rhamnosus es un componente principal de la población de *Lactobacillus* que habitan naturalmente el tracto gastrointestinal de humanos y animales (Mitsuoka, 1992). Por otro lado, Narayanan et al (2004) menciona que *L. rhamnosus* es un microorganismo perteneciente a grupo de las bacterias ácido lácticas, es una bacteria Gram (+), aerobia facultativa la cual produce ácido láctico L (+) y etanol, bajo condiciones de anaerobiosis. Durante mucho tiempo esta bacteria fue confundida con *L. casei* y *L. paracasei* debido a que sus procesos de fermentación son similares. Sin embargo, Ward Y Timmins (1999), usando Reacción de polimerasa en cadena (PCR) y DNA polimorfo aleatoriamente amplificado (RAPD), pudieron diferenciar estas bacterias, separando *L. Rhamnosus* como una especie distinta.

Por otra parte un estudio publicado por la empresa Clericci- Sacco (2016) hacen mención que las cepas de *L. rhamnosus* afectan el desarrollo de levaduras y mohos. Al añadirlo a la leche cruda, puede ayudar a controlar el crecimiento de hongos, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Alcaligenes*, *Listeria*, *Yersinia*, *Aeromonas* y *Alteromonas*, debido a que consumen los nutrientes que estos necesitan para su crecimiento. Esta capacidad depende de la cepa de la bacteria y del grado de contaminación de la leche o formulación del producto final.

Buzaine et al (2005) indica que las cepas de *L. rhamnosus* son unas de las más estudiadas, caracterizándose por ser – dentro de las bacterias ácido lácticas las más convenientes para prevenir enfermedades infecciosas. Estudios demuestran que en humanos es capaz de reforzar sus defensas, particularmente en sujetos con inmunosupresión leve. En efecto, varios ensayos clínicos realizados en adultos mayores han mostrado en forma reiterada que el consumo de productos con *L. rhamnosus* estimula la actividad citotóxica de las células NK (Natural-Killer), las cuales tienen como función la destrucción de células cancerígenas, mediante el ataque a su membrana plasmática causando catálisis.

2.2.2. Característica de *Lactobacillus rhamnosus*

Dentro de las características asociadas a esta bacteria, se encuentra que no posee actividad antimicrobiana contra otras bacterias ácido lácticas y posee una buena adhesión a las glicoproteínas del íleon humano y a los productos con fibra de la dieta (Todorov y Dicks, 2005). Por otro lado Mejía et al (2007) hace referencia a otra característica que

posee *L.rhamnosus* , es que se prolifera rápidamente cuando alcanza el intestino humano, debido a que coloniza rápidamente las mucosas inhibiendo el crecimiento de otros microorganismos que podrían resultar perjudiciales para la salud.

Esta bacteria es aerotolerante, posee excelente viabilidad en yogurt durante cuatro semanas de almacenamiento a 4°C y es útil en su producción, ya que es capaz de crecer durante la fermentación y además proporciona buenas propiedades organolépticas. (Todorov y Dicks, 2005)

Por otro lado, diversos estudios han demostrado actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aéreos*, *Bacillus sereus* y *Clostridium perfringens* in vitro; así como una actividad antilisteria cuando es aplicada como cultivo iniciador bioprotector de carne en embutidos secos, en etapas iniciales del proceso de maduración (Calderón *et al* 2006).

2.2.3. Propiedades

Según Clericci- Sacco (2016) Dentro de las propiedades que se le tribuyen a las cepas del cultivo protector se tiene:

- El cultivo desarrolla una débil acidez y aroma de la fermentación de citrato lenta
- Son capaces de sobrevivir durante la vida de anaquel del producto, sin importar condiciones de almacenamiento.
- No interfieren con el desarrollo normal de los cultivos que son utilizados en los procesos de elaboración de productos lácteos, por lo que no afectan las propiedades organolépticas
- Otorgan mejoras en el producto final y pueden sobrevivir a altas concentraciones en los quesos, sin interferir en el proceso de maduración.
- Se multiplican produciendo ácido láctico en menor cantidad a comparación de otros cultivos.

2.2.4. Actividad antagónica de *Lactobacillus rhamnosus*

- a) **Ácidos Orgánicos:** Debido a la fermentación de la lactosa se produce ácido láctico. Una vez sintetizado se liberan al medio extracelular donde valores bajos de pH, inhiben o retardan el crecimiento de microorganismos patógenos o alterantes como *E. Coli*, *Salmonella* spp, *S. aureus*, esporas de hongos y levaduras (Calderón *et al* 2006).
- b) **Peróxido de Hidrógeno y otros metabolitos.** Producen metabolitos del oxígeno como anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO \cdot) los cuales tienen un efecto antimicrobiano principalmente por la inactivación de enzimas como: gliceraldehído-3P- deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa o coenzima A, por la oxidación de los grupos sulfidrilo. La inhibición también puede ser causada por el aumento de la permeabilidad de las membranas debido a la peroxidación de los lípidos y a daños en el material genético (Mejía *et al* 2007).
- c) **Diacetilo:** Una vez que se sintetiza, en la vía de degradación del piruvato, se libera al medio extracelular donde además de formar algunos aromas de productos fermentados, tiene un efecto antimicrobiano contra bacterias, hongos y levaduras por la inactivación de enzimas (Risco, 2006).
- d) **Bacteriocinas:** Son péptidos sintetizados por algunas bacterias ácido lácticas y presentan un amplio potencial como conservadores para inhibir el crecimiento de otros microorganismos (Fernández, 2000)

En la tabla 1 se detallan las bacteriocinas producidas por el cultivo protector:

Tabla 1 Bacteriocinas producida por *Lactobacillus rhamnosus*

Bacteriocinas producidas por cultivos lácticos		
Clasificación	Descripción	Ejemplos
Clase I		
Bacteriocinas que contienen lantionina (Péptidos conformado por 19-38 aminoácidos)	Incluye tanto lantibióticos de péptidos simples como de dos péptidos; Se enlazan al lípido II evitando síntesis correcta de pared celular, o para insertare en membrana e iniciar formación de poros.	Péptidos simples: Nisina, mesacidina, lactinica 481; dos – péptidos: lactinina 3147, citolisina
Clase II		
No contienen lantionina (Péptidos conformado por 30-60 aminoácidos)	Clase heterogénea de pequeños péptidos; incluye el tipo de pediocina, dos péptidos cíclicos, péptidos lineales únicos sin pediocina. Inducen la permeabilización de la membrana y salida de moléculas	Clase IIa: Pediocina PA1, leucina A; clase IIb: lactacina F; clase IIc: enterocina AS48; reuteina 6; clase IID: lactococcina A , divergicina A
Bacteriolisinas		
Proteínas bacteriolíticas	Proteínas grandes lábiles al calor, a menudo hidrolasa de peptidoglucano. Actúan mediante lisis de pared celular	Lisostafina, enterolisina A

Fuente: Clericci Sacco (2016)

2.2.5. Mecanismos de acción:

Lactobacillus rhamnosus, fermentan hexosas hasta ácido láctico, ácido acético, etanol y ácido fórmico por vía Embdem Meyerhoff, bajo limitantes de glucosa. También puede fermentar pentosas hasta ácido láctico y ácido acético por vía fosfocetolasa. (Abee *et al* 1994)

Las bacteriocinas producidas por *L. rhamnosus* actúan sobre la membrana celular del microorganismo sensible, rompiendo la permeabilidad de la membrana citoplasmática, incrementando la permeabilidad de pequeños compuestos (K^+ , Na^+ , Cl^-), haciendo que las células no sean capaces de proteger el citoplasma del medio ambiente llevando a la inhibición celular. (Chikindas *et al* 1993)

Existen mecanismos de acción:

- Formación de poros: Los monómeros de bacteriocinas enlazados se insertan y polimerizan en la membrana citoplasmática para formar un poro con los residuos hidrofílicos en la cara interior y los hidrofóbicos en la cara exterior (Abee *et al* 1994)
- Efecto detergente: La bacteriocinas hacen más permeable a la membrana, aumentando la interacción en esta con el medio ambiente permitiendo la liberación de iones, enzimas y ATP (Chikindas *et al* 1993)

2.2.6. *Escherichia coli*

Según Pascual *et al* (2000) es huésped constante del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente. Por su especificidad está considerado como un buen índice de contaminación fecal.

Moreno *et al* (2007) hacen mención que se destruye a temperatura de pasteurización y a temperaturas de congelación. Por otro lado Pierson y Smoot (2001) señalan que este microorganismo se caracteriza por ser coliforme termotolerante (fermenta lactosa a 44.5°C) que produce indol a partir de triptófano y produce β -glucuronidasa, características que se usan para su identificación en laboratorio, generalmente en la etapa final del método “Numero más probable (NMP) o de otros métodos cuantitativos, incluyendo petrifilm.

Es un bacilo gramnegativo reaccionando negativamente a la tinción de gram, es el principal organismo anaerobio facultativo del sistema digestivo, móvil por flagelos peritricos, no forma esporas, la temperatura mínima para su crecimiento es de 2.5°C y la máxima de 45°C, puede sobrevivir a temperaturas de refrigeración y de congelación, el rango de pH en el cual se ha observado crecimiento es de 4.4 a 9.0. (Flores y Morey, 2016)

En su hábitat natural, vive en la parte baja de los intestinos de la mayor parte de mamíferos sanos y por ende en las aguas negras. En humanos, *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal de un neonato adhiriéndose a las mucosidades del intestino grueso en el plazo de 48 horas después de la primera comida (Moreno *et al*, 2007).

Según Pascual *et al*. (2000) describe la existencia de cinco diferentes grupos de *Escherichia coli*

- **Enteropatógenas (ECEP):** Los síntomas se inician entre las 17 y 72 horas que siguen a la ingestión del germen. Se manifiesta con dolor abdominal, vómitos, fiebre, diarrea acuosa con abundante moco, pero sin sangre.
- **Enterohemorrágicas (ECEH):** Se identifica como causa de colitis hemorrágica que, con frecuencia, se asocia con la ingestión de carne picada vacuna poco cocinada, principalmente, aunque pueden tenerse en cuenta otras carnes de abasto (cerdo, ovino y aves).
- **Enterotoxigénicas (ECET):** Se inician entre las 8 y 44 horas que siguen a la ingestión del producto contaminado con el germen. La enfermedad se manifiesta con una diarrea acuosa, no sanguinolenta, a veces con mucosidad.
- **Entero virulentas (EVEC):** Las enfermedades se dan a través de la transmisión de estas sepas por medio del agua de bebida, leche, ensaladas vegetales, queso de pasta blanda.
- **Entero invasivas (ECEI):** Los síntomas aparecen entre las 8 y 24 horas posteriores a su ingestión. Se manifiesta con escalofríos, malestar, dolor de cabeza, mialgia, fiebre y diarrea profusa sanguinolenta.

2.2.6.1. Taxonomía: Moreno *et al* (2007) indica que desde el punto de vista taxonómica la clasificación es la siguiente

Tabla 2 Clasificación taxonómica de *Escherichia coli*

Clasificación taxonómica de <i>Escherichia coli</i>	
Reino	bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>E.coli</i>
Nombre binominal	<i>Escherichia coli</i>

Fuente: Moreno *et al* (2007)

2.2.6.2. Influencia de los factores ambientales sobre el crecimiento de *E. coli*

El crecimiento bacteriano está influido notablemente por la naturaleza química y física de su ambiente. El conocimiento de estas influencias ambientales permite controlar el crecimiento microbiano.

Prescott *et al* (2004) indican que existen diversos factores que afectan el crecimiento de los microorganismos en los alimentos. Sus interacciones tienen un efecto significativo sinérgico o antagónico sobre el crecimiento. Estos efectos interactivos pueden ser importantes en los sistemas alimentarios, en los cuales el crecimiento bacteriano se ve favorecido o inhibido por los ingredientes, condiciones de almacenamiento o constituyentes alimentarios.

McMeekin *et al* (1993) afirman que entre los factores ambientales que pueden tener influencia sobre el crecimiento bacteriano destacan los siguientes: la temperatura, el pH, los solutos y la actividad de agua (*a_w*), la concentración de oxígeno, la presión y la radiación. Por otra parte Kris *et al* (1998) indican que en los procesos de elaboración de productos alimentarios, la temperatura, la actividad de agua y el pH son los factores ambientales claves que controlan el crecimiento bacteriano. Durante esta investigación dos factores que se controlaron fueron de la temperatura y el pH.

- a) **Temperatura:** La comisión internacional de especificaciones microbiológicas para alimentos (ICMSF) (1983) indica que la temperatura es uno de los factores ambientales que afectan a la viabilidad y el desarrollo microbiano. Todos los microorganismos tienen una temperatura mínima por debajo de la cual no se produce un crecimiento prolongado, así como una temperatura óptima en la cual el crecimiento es rápido, y una temperatura máxima por encima de la cual el crecimiento no es posible (Madigan *et al*, 1997).

Prescott *et al* (1999) hacen mención que el factor que tiene mayor influencia sobre el efecto de la temperatura en el crecimiento es la sensibilidad de las reacciones catalizadas por enzimas a determinadas temperaturas. En condiciones de baja temperatura, por cada incremento de 10° C se observa un aumento de velocidad de crecimiento, con lo cual el metabolismo en general es más activo a temperaturas altas,

y el microorganismo crece rápidamente. Mientras que Pascual *et al* (2000) indican que al someter a los microorganismos a altas temperaturas les ocasionan daños al desnaturalizar las enzimas, las proteínas transportadoras y otras proteínas

Santos (2007) hace mención que a temperatura de refrigeración (3-7°C) *E. Coli* generalmente sobrevive en los alimentos con una reducción de $10^{0.5}$ a $10^{1.5}$ durante un almacenamiento de 1-5 semanas. Por otro lado, Flores y Morey (2015) indican la temperatura mínima para su crecimiento es de 2.5°C y la máxima de 45°C-

b) pH; es una medida de la actividad de los iones de hidrógeno de una solución que se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones de hidrógeno (expresada en moles). Es decir, el cambio de una unidad de pH representa un cambio de 10 veces en la concentración de iones de hidrógeno (Madigan *et al* 1997).

Cada especie tiene un intervalo de pH óptimo para su crecimiento. Flores y Morey (2015) mencionan que el rango de pH en el cual se ha observado crecimiento de *E. coli* es de 4.4 a 9.0.

Según Prescott *et al* (2000) Variaciones intensas en el pH pueden dañar a los microorganismos alterando la membrana plasmática o inhibiendo la actividad de las enzimas y proteínas transportadoras, así como también, modifican la ionización de las moléculas de nutrientes, disminuyendo su disponibilidad para el organismo.

Heer (2007) indica que los microorganismos se multiplican en un amplio rango de pH, sin embargo, toleran mejor el medio ácido que el alcalino. Dentro de un mismo grupo de bacterias se pueden encontrar diferencias en cuanto al pH óptimo. Como se observa en la tabla 3:

Tabla 3 Influencia de pH en multiplicación de bacterias

Especie	Valor pH mínimo	Valor pH máximo
<i>Pseudomonas spp</i>	5.6	8.2
<i>Clostridium perfringens</i>	5.5	8.5
<i>Bacillus cereus</i>	5.0	8.8
<i>Campylobacter spp</i>	4.9	9.0
<i>Bacillus subtilis</i>	4.5	8.5
<i>Escherichia coli</i>	4.4	9.0
<i>Listeria monocytogenes</i>	4.4	9.4
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.2	9.3
<i>Salmonella spp</i>	4.0	8.2
<i>Lactobacillus spp</i>	3.4	7.2
<i>Saccharomyces spp</i>	2.1	9.0
<i>Aspergillus spp</i>	1.6	9.3

Fuente: Heer (2007)

2.2.7. Leche

La leche se define como el producto normal de la secreción de la glándula mamaria, de composición compleja, de color blanquecino y opaco, con pH cercano a la neutralidad, de sabor dulce y libre de calostro (Wattiaux 2011). Contiene diversos tipos de moléculas; sus principales constituyentes son agua, lípidos, azúcares y proteínas, en conjunto con otros elementos traza como minerales, vitaminas, hormonas y enzimas (Buñay y Peralta, 2015).

Según la norma CODEX STAN 206- (1999) define a la leche como el producto fresco del ordeño completo de una o varias vacas sanas, bien alimentadas y en reposo, exento de calostro y que cumpla con las características físicas, microbiológicas e higiénicas establecidas

2.2.7.1. Características de la leche

a) Características Organolépticas

Color; compuesto líquido, opaco, de color blanco marfil, coloración que se torna ligeramente azulada cuando se añade agua o se elimina la grasa. Es este componente es el que da aspecto amarillento a la superficie cuando la leche se deja un tiempo en reposo; los causantes son los pigmentos carotenoides que hay en los piensos con que se alimenta a los animales (Vargas 2006).

Las leches de retención o mastíticas presentan color gris amarillento y la presencia de color rosado puede ser el resultado de la presencia de sangre o crecimiento de ciertos microorganismos (Buñay y Peralta, 2015).

Sabor; es ligeramente dulce gracias a su contenido en lactosa. En ocasiones puede presentar cierto sabor salado por la alta concentración de cloruros que tiene la leche de vaca que se encuentra al final del periodo de lactancia o que sufren estados infecciosos de la ubre como por ejemplo en la mastitis; cuando el sabor es ácido se debe a que el porcentaje de acidez en el producto es superior a 0,2 - 0,3 % de ácido láctico (Benjamín, 2011).

Olor; la leche recién ordeñada no tiene un olor característico, sin embargo adquiere con facilidad el aroma del ambiente donde es obtenida o almacenada. (Carpio, 2001).

b) Características físicas

Densidad; oscila entre 1,029 a 1,033 g/cm³ a una temperatura de 15°C; su variación con la temperatura es 0.0002 g/cm³ por cada grado de temperatura, dicha variación depende de la combinación de las densidades de sus componentes, que son los siguientes: agua: 1,000 g/cm³, grasa: 0,931 g/cm³, proteínas: 1,346 g/ g/cm³, lactosa: 1,666 g/cm³, minerales: 5,500 g/cm³. The university Wisconsin-Madison (2013)

Celis y Juárez (2009) por su parte, afirman que la leche descremada está por encima de esos valores los valores mencionados, oscila alrededor de 1.036 g/cm³, mientras que una leche aguada tendrá valores menores de 1.028 g/cm.

pH ; la leche posee un pH ligeramente ácido su valor puede variar entre 6,6 y 6,8. Se pueden presentar alteraciones en estos valores producidos por: mala higiene de la

glándula mamaria, por el desarrollo de microorganismos, que desdoblan o convierten la lactosa en ácido láctico; o por la acción de microorganismos alcalinizantes. (Buñay y Peralta, 2015)

El valor del pH es representativo del estado de la leche y es más significativo que el valor de la acidez, sobre todo en lo que a estabilidad de la leche se refiere. Con el pH podemos tener una idea en ciertas sustancias, de su estado de “frescura”, su poder tampón. . En cambio, los valores de acidez son el resultado de varias reacciones que han modificado el estado original.

Diferentes muestras de leche pueden presentar el mismo pH y por ende la misma estabilidad frente a los tratamientos industriales dentro del mismo estado; sin embargo, mostrar una acidez sensiblemente diferente. Inversamente, leches con la misma acidez pueden tener diferente pH.. Así pues, estudiando conjuntamente la acidez y el pH es posible tener un conocimiento aproximado de la riqueza de ciertas sustancias, poder tampón, calidad microbiológica y conducta frente a algunos tratamientos. (López y Velo, 2016)

Por otro lado, el pH de la leche depende de la temperatura. Las variaciones de temperatura pueden producir muchos cambios en el sistema buffer de la leche, debido a la solubilidad del fosfato de calcio. (Alais 1985). El pH de la leche disminuye en promedio 0,01 unidades por cada aumento de 1 °C, a causa de la insolubilización del fosfato de calcio. Esta variación es muy importante considerando el estrecho rango de variación del pH de la leche (Negri, 2005)

Acidez; la leche fresca posee una acidez de 0,15 a 0,16%. , acidez menor al 0,15% puede ser debido a la mastitis, al aguado de la leche o bien por la alteración provocada con algún producto alcalinizante; una acidez superior al 0,16% es producida por la acción de contaminantes microbiológicos. (Celis y Juárez, 2009)

Viscosidad; la leche natural fresca tiene valores entre 1.7 a 2.2 centi poises, mientras que una leche descremada tiene una viscosidad de alrededor de 1.2 cp. Por otro lado, la viscosidad disminuye con el aumento de la temperatura hasta alrededor de los 70°C, por encima de esta temperatura aumenta su valor. (Celis y Juárez 2009)

2.2.7.2. Componentes de la leche

La leche entera está constituida por alrededor del 88% de agua y contiene en promedio 12% de sólidos totales (Jenkins y McGwire 2006). Se le han identificado más de 100 diferentes componentes que resultan relevantes para la nutrición humana, tal es el caso de las vitaminas (D, A, B12), los minerales (Ca, K y P), las proteínas (caseína) y otros factores benéficos para la salud (ácidos grasos omega 3 y 6) (Miller *et al*, 2007)

Existen varios factores que influyen la composición de la leche (Tabla 4), tales como, la genética, la raza, la etapa de lactancia, el número de parto, la dieta, el estado nutricional de la vaca y la época de parto (Wattiaux, 2011). Sin embargo, Fox (2002) menciona que dicha condición se neutraliza al juntar diferentes leches en el tanque de recibo o de transporte, y durante el proceso de homogenización.

Tabla 4 Composición nutricional de la leche entera

Componente	Porcentaje
Agua, %	88.30
Proteína, %	3.20
Grasa, %	3.20
Cenizas, %	0.70
Carbohidratos, %	4.50
Energía, kcal/100 g	60.00
Colesterol, mg/100 g	10.00
Ácidos grasos, % total	
Saturados	64.90
Monoinsaturados	28.30
Poliinsaturados	6.80

Fuente: Jenkins y McGuire(2006)

- a) **Agua;** la leche contiene entre 86 y 90% de agua, el resto está integrado por sólidos disueltos o sólidos totales. Es el agua el disolvente de los compuestos solubles como son las vitaminas hidrosolubles, la lactosa y los minerales (Wattiaux, 2011).

García, Montiel, y Borderas (2014) señalan que el agua no es un componente nutricional, pero determina las características fisicoquímicas de la leche y sus derivados; y es un factor clave en el crecimiento microbiano, palatabilidad, tiempo de vital útil de leche y derivados y punto de congelación de la leche.

- b) **Grasa;** el contenido total de grasa puede variar 3 y 6 % como resultado de cambios en la dieta, raza del animal y el estado de lactancia, pero su contenido normalmente puede suele estar entre 3,5 % y 4,7 % (Benjamín, 2011).
- c) **Lactosa;** según Wattiaux (2011) de todos los componentes de la leche, la lactosa es el que se encuentra en mayor porcentaje del aproximadamente del 4.7 al 5.2%. La lactosa es un carbohidrato disacárido, conocido como el “azúcar” de la leche, y se halla libre en suspensión.
- d) **Proteínas;** en base a lo escrito por García et al (2014) la composición proteica tiene un papel importante en la industria láctea, debido a que interviene sobre el rendimiento y los procesos tecnológicos de la leche; las proteínas lácteas se las categorizan en tres grupos: las proteínas del lactosuero, las caseínas, las proteínas de la membrana del glóbulo graso.

Por otro lado Benjamín (2011) menciona que el porcentaje proteico en leche varía entre 3 y 4 % y se clasifican en tres categorías principales diferenciadas por su composición química y propiedades físicas: la caseína, que compone el 78 % de las proteínas de la leche son poco insolubles en agua; las seroproteínas (proteínas del suero de la leche), que representan el 20% restante, se las considera proteínas solubles por ejemplo las albúminas globulinas y las proteínas de la membrana del glóbulo graso representan sólo un 2 % del total del contenido proteico .

- e) **Minerales y Vitamina;** la leche contiene vitaminas como la A, D, E, K, B1, B2, B6, B12, C, carotenos, nicotinamida, biotina, ácido fólico. Influye la época del año, tiempo atmosférico, ambiente y la alimentación; este último factor repercute especialmente en los carotenos y en la vitamina A como consecuencia de la abundante ingestión de carotenos cuando la base de la alimentación son forrajes frescos. (Buñay y Peralta 2015).

En cuanto a minerales la leche contiene sodio, potasio, magnesio, calcio, manganeso, hierro, cobalto, cobre, fósforo, fluoruros, yoduros. Además, se reconoce la presencia de otros minerales en menor cantidad como el aluminio, molibdeno y plata. (Benjamín 2011)

2.2.7.3. Calidad de la leche cruda

Villoch (2010) indica que los requisitos de calidad e inocuidad de la leche se expresan en indicadores físico-químicos, organolépticos, higiénico-sanitarios y la ausencia de peligros bacterianos que permitan obtener derivados lácteos sin riesgo de causar daño al consumidor.

Por otro lado Méndez y Ávila (2007) señalan que la calidad de la leche comercial es uno de los pilares fundamentales en la industria láctea, depende directamente de las características del producto original. Por lo tanto, un alto porcentaje la calidad del producto que llega al consumidor, se debe al control sobre la leche cruda en el establo (Magariños 2000).

a) Calidad higiénica

La calidad higiénica hace referencia a todas aquellas prácticas de manejo en el establo que lleva consigo el control de la mastitis (Urdaneta 2005).

Los factores que interceden con la calidad higiénica, son las actividades del hombre en el proceso, la raza, el estado de salud de las vacas, la época del año, el estado de lactancia, la presencia de medicamentos, las prácticas de alimentación y de manejo. (Magariños 2000).

Méndez y Ávila (2007) señalan que producir leche con buena calidad higiénica resulta sumamente complejo ya que el producto a manejar es extremadamente delicado a la manipulación durante su recolección.

b) Calidad sanitaria de la leche

Según Celis y Juárez (2009) indican que para lograr una buena calidad sanitaria es imprescindible el adecuado control de la mastitis subclínica, así como mantener el ganado libre de brucelosis y tuberculosis.

El conteo de células somáticas es el método mayormente utilizado para el diagnóstico de mastitis subclínica. Se recomienda llevar a cabo como mínimo una vez al mes. Es importante realizar un seguimiento de los valores de células somáticas y no basarse en

análisis puntuales, ya que factores ambientales, nutricionales y de manejo, pueden hacer variar los resultados de estos análisis.

c) Calidad microbiológica de la leche

La leche de una ubre sana, antes de ser ordeñada no contiene microorganismos. La carga microbiana es el resultado de una microflora proveniente del medio exterior por la inadecuada manipulación o por una multiplicación dependiendo de la velocidad de crecimiento de los microorganismos, de la temperatura y del tiempo. (Ortiz y Rodríguez 2015)

Existen múltiples fuentes de contaminación, donde la ubre en condiciones normales puede aportar hasta 1000 microorganismos/ml; sin embargo, cuando la leche es mezclada con alguna proveniente de una ubre con mastitis el recuento puede aumentar hasta 1000000 UFC/ml (Moreno *et al* 2007)

Ortiz (2015) señala que las bacterias que se encuentran en la parte terminal interna del pezón dan lugar a la flora original de la leche cruda, por esta razón, es considerada como un “producto vivo” debido a la cantidad de microorganismos que posee. La microflora láctea tiene importancia a nivel social, tecnológico y económico ya que está involucrada en: la conservación de la leche (fluida, cruda o pasteurizada) determinando su vida de anaquel, la generación o transmisión de enfermedades a los consumidores, la impartición de las características sensoriales deseables en los productos derivados, transformación de la leche en derivados, con diferente grado y tipo de fermentación (leches fermentadas y quesos).

Ortiz y Rodríguez (2015) señalan que la contaminación ambiental durante el ordeño permite que microorganismos de la piel de los pezones, manos del ordeñador, pezoneras, equipos de ordeño, baldes y todo el entorno del ordeño, lleguen a la leche. Esta es una fuente de contaminación importante y variable, ya que aporta microorganismos con diferentes propiedades microbiológicas.

Para Méndez y Ávila (2007) la leche de buena calidad tiene buena apariencia, se encuentra libre de adulteraciones y alcanza determinados estándares en el recuento de células somáticas (RCS) y recuento bacteriano.

2.2.8. Microorganismos indicadores de contaminación

La calidad microbiológica de la leche es fundamental porque influye en su conservación y tiempo de vida útil, sobre todo, porque los microorganismos presentes en ella, pueden ser causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's).

Los microorganismos indicadores tales como *Escherichia coli* tipo I y los estreptococos, coliformes fecales son indicadores del manejo no higiénico de alimentos, con la posible presencia de patógenos. Se utilizan para determinar la calidad microbiológica de los alimentos y del agua. (Lanchipa y Sosa 2003)

Los microorganismos patógenos son los que producen infecciones o intoxicaciones transmisibles por lo alimentos como por ejemplo las especies de los géneros *Salmonella*, el *Clostridium botulinum* y el *Staphylococcus aureus*. (Celiz y Juarez, 2009)

2.2.9. Requisitos microbiológicos de la leche y productos lácteos.

Decreto Supremo N°007-2017-MINAGRI.NTP.2002.001. Requisitos para leche cruda, especificaciones técnicas, sanitarias en calidad higiénica y salud.

Tabla 5 Especificaciones sanitarias microbiológicas para leche cruda

Especificaciones Sanitaria Microbiológicas para leche cruda								
Agente Microbiano	Unidad	Categoría	Clase	N	C	Limite por ml		
						Min	Max	
Aerobios mesófilos UFC/ml	UFC/ml	3	3	5	1	5x10 ⁵	10 ⁶	
Coliformes UFC/ml	UFC/ml	4	3	5	3	10 ²	10 ³	

Fuente: Decreto Supremo N° 007-2017-MINAGRI

2.2.10. Método para determinación de carga bacteriana

Los métodos utilizados para la identificación de carga bacteriana son procedimientos que permiten, cultivar, identificar y cuantificar el grado de contaminación de las muestras en evaluación, en este contexto se propone el uso de placas petrifilm para esta investigación, como método para el conteo de colonias de *E. Coli*

a) Placas Petrifilm

El uso de las placas petrifilm, es un método para llevar a cabo pruebas microbiológicas rápidas, avalado por la AOAC International (Association of Official Analytical Chemists) para el recuento de bacterias, la principal ventaja de este método es que no requiere la preparación previa de medios de cultivo, lo que reduce tiempo, sin embargo no con esto reduciendo su efectividad y la confiabilidad de los resultados que se obtienen. (3M, 2006)

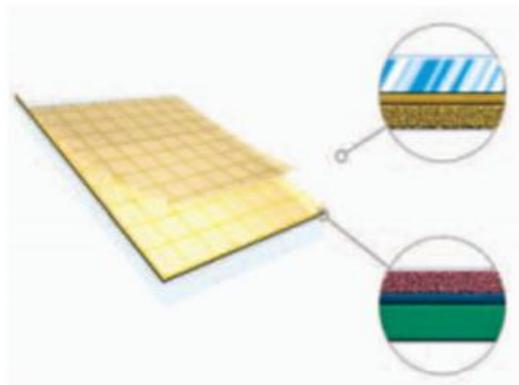
La mayoría de las *E. Coli* (cerca del 97%) produce beta-glucuronidasa, la que a su vez produce un precipitado azul asociado con la colonia. La película superior atrapa el gas producido por la lactosa que fermenta *E. Coli* y Coliformes. Cerca del 95% de *E. Coli* produce gas, representado por colonias entre azules y rojo –azules asociadas al gas atrapado, mientras que los coliformes son colonias rojas asociadas con burbujas de gas. (3M, 2006)

Estas placas se incuban por 24+/- 2 horas a 35°C para cuantificar *E. Coli* en carne, aves y mariscos y 48+/- 2 horas a 35°C para contabilizarlas en lácteos. Las placas Petrifilm para *E. Coli* y coliformes pueden ser usadas para la enumeración de estos organismos en alimentos diversos así como para el monitoreo ambiental y superficial en áreas de procesamiento y manipuladores (3M, 2006)

2.2.10.1.1. Composición de placas Petri film para detección de *E. Coli*

De acuerdo a la guía de interpretación brindada por la empresa 3M (2006) la placa petrifilm para recuento de *E. Coli* y coliformes está compuesta por una lámina de papel con una cuadrícula impresa recubierta de propileno conteniendo nutrientes del medio VRBG, el indicador 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucoronido (BCIG) y un agente gelificante soluble en agua fría (El área donde se desarrollaran los microorganismos está definida por una película intermedia de espuma). Se complementa en la parte superior con otra lamina de polipropileno que contiene gel soluble en agua fría y tricloruro de trifetil tetrazolio (TTC) como indicador.

También, tienen incorporado indicadores de pH que colorean las colonias para facilitar su identificación, así como una cuadrícula para hacer el recuento de las UFC. Al sembrar en placas petrifilm se requiere ajustar el pH de la muestra entre 6.5 y 7.2 ya que el tinte que colorea las colonias reacciona de forma óptima a pH neutro (3M, 2006).



Film superior

Film de plástico cubierto con un adhesivo, un indicador y un gel soluble en agua fría

Film inferior

Papel cuadriculado cubierto con un plástico, adhesivo, nutrientes de métodos estándar, gel soluble en agua fría.

Figura 1: Diseño Placas Petrit Film

Fuente: 3M,2006

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación geográfica del trabajo de investigación

La presente investigación se llevó a cabo como primera fase en el establecimiento fundo la Victoria- Cajamarca y para realizar los análisis microbiológicos en el laboratorio de Microbiología del departamento de Ciencias biológicas perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca

3.2. Materiales

3.2.1. Materia prima: Leche de vaca , Cultivo *Lactobacillus rhamnosus*

3.2.2. Materiales de laboratorio

- a) **De protección**, mandil, guantes látex, gorro, mascarilla.
- b) **De vidrio**, frascos de vidrio estériles de 600ml, beakers, placas Petri, vasos de precipitado de 100 ml, pipetas de 1cc, tubos de tapa rosca,
- c) **Otros materiales**, jeringas estériles de 20cc y 10 cc, alcohol 90%, agua destilada, ron de quemar, solución buffer para calibración de pH 4.6 y 6.8, mesa de acero inoxidable, laminas petrifilm, aplicador laminas petrifilm, fósforos, mechero bunsen, gradillas, útiles de escritorio, papel toalla, cucharon, ollas de acero.

3.2.3. Equipos de laboratorio:

- a) **Óptico**, cámara fotográfica.
- b) **De esterilización y asepsia**, autoclave, mechero bunsen.
- c) **Otros equipos**, potenciómetro, termómetro digital, incubadora, refrigeradora, balanza analítica, memoria USB, laptop.

3.3.Métodos de análisis

3.3.1. Análisis fisicoquímico

- **pH:** La medición del pH se realizó, haciendo uso de un potenciómetro, a cada una de las muestras al momento de la recepción de la leche, a las 8 y 24 horas después de adicionarle las respectivas dosis de cultivo. La medida se realizó según el método descrito por la norma AOAC 947.05, 1990. El procedimiento del método se detalla a continuación:
 1. Calibrar el potenciómetro haciendo uso de solución buffer pH 4 y 6.86
 2. Se toma una muestra de 25 ml en un matraz erlenmeyer
 3. Introducir los electrodos del potenciómetro previamente calibrado en el vaso con la muestra de leche.
 4. Finalmente encender el potenciómetro y realizar la lectura de la muestra, el proceso se efectúa por triplicado

- **Temperatura**

Se registró la temperatura en la que se encontraba la leche, haciendo uso del termómetro digital. La toma de temperatura se realizó antes de la incorporación del cultivo, así como también pasadas las 8 y 24 horas después de haber incorporado el cultivo

3.3.2. Análisis Microbiológico

El análisis microbiológico se realizó haciendo uso de las placas petrifilm para *E. coli*. Se realizaron 3 diluciones por muestra, para cada dilución se sembró por duplicado, realizando el conteo de colonias pasadas las 48 horas de incubación a 35 °C. Todo el proceso descrito anteriormente se realizó por triplicado, el número de UFC de *E.coli* se contabilizó mediante un promedio. Obteniendo de esta manera 54 placas por repetición y 162 placas en toda la investigación.

3.4. Metodología experimental

3.4.1. Tipo de la investigación

La investigación es de tipo experimental

3.4.2. Identificación de Variables

a) Variable independiente

- Concentraciones de cultivo protector *Lactobacillus rhamnosus*: 0.00025gr, 0.0015gr, 0.003gr
- Tiempo: 8 y 24 horas.

d) Variable dependiente

- Unidades formadoras de colonias de *Escherichia coli* en leche fresca.

3.4.3. Definiciones operacionales

En la tabla 6 se tiene las dimensiones e indicadores de las variables independientes y dependientes.

Tabla 6 Dimensiones e indicadores de las variables dependientes e independientes

Variables	Dimensión	Indicadores
Variable Independiente	Concentraciones de cultivo	C1:0.00025g
		C2:0.0015g
		C3: 0.003g
	Tiempo	8 y 24 Horas
Variable Dependiente	Análisis Microbiológico	UFC de <i>E.coli</i> por ml de leche

Diagrama de flujo para la evaluación de *Escherichia coli* en leche cruda a distintas concentraciones de cultivo

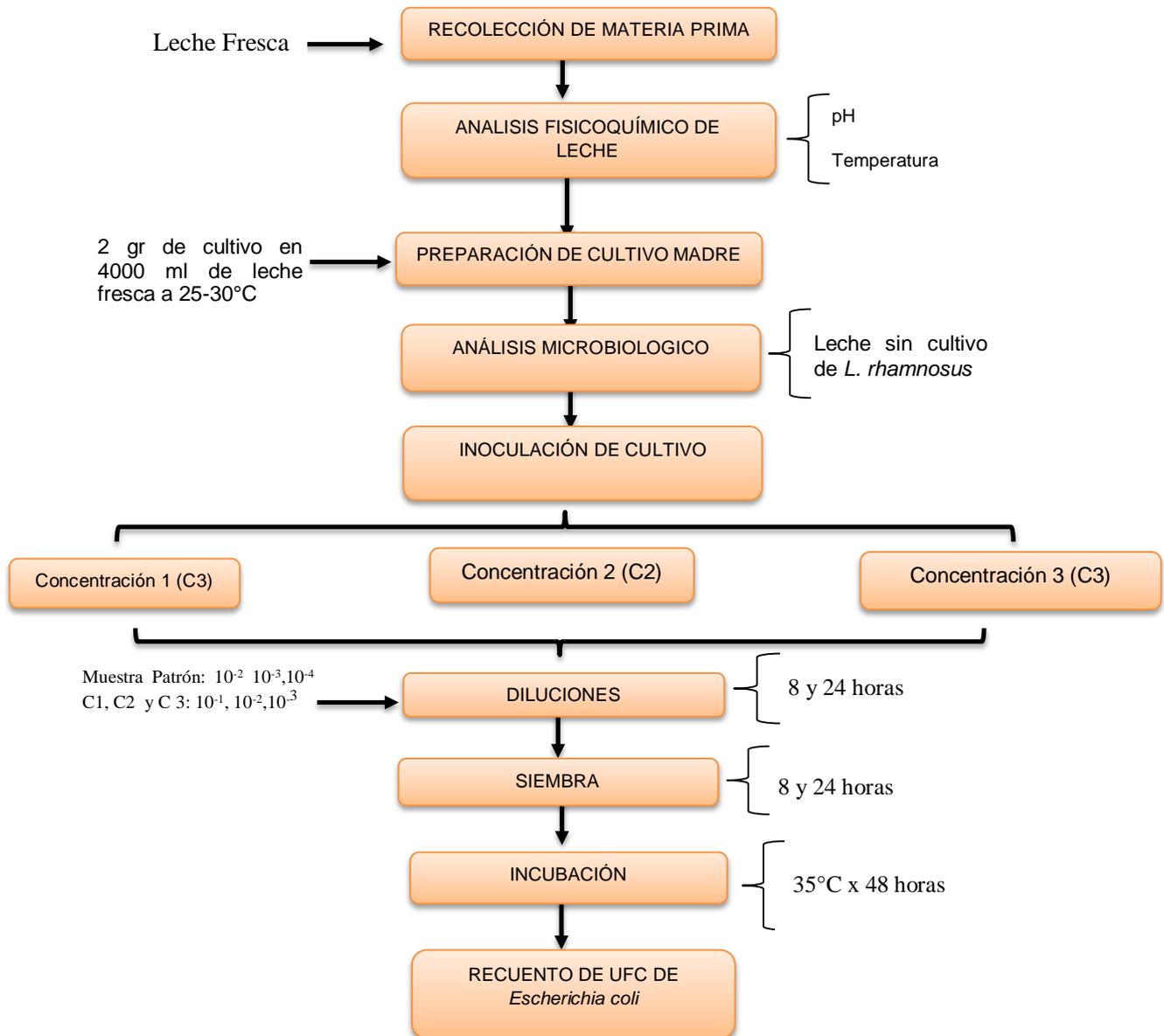


Figura 2 Diagrama de flujo para la evaluación *Escherichia coli* en leche cruda a distintas concentraciones de cultivo

3.4.4. Descripción de operaciones del proceso.

- e) **Recolección de Materia prima:** Se recepcionó un total 7 litros de leche fresca obtenidas de vacas pertenecientes al fundo la Victoria de la Universidad Nacional de Cajamarca.
- f) **Análisis de muestras:** Después de recepcionada la leche se realizó la medición de pH, así como también la medición de la temperatura en la que se encuentra la leche para poder realizar la preparación del cultivo madre.
- g) **Preparación de cultivo madre:** Se adiciono el cultivo protector a 4000ml de leche fresca recién ordeñada y se agitó por 5 minutos. Para ello fue necesario que la leche se encontrará en un rango de temperatura entre 25- 30°C para una mayor producción de compuestos con capacidad inhibitoria de *Lactobacillus rhamnosus* (Sarika, Aishwarya y Lipton, 2010)
- h) **Análisis microbiológico:** Una vez que la leche se transportó al laboratorio, se realizó una primera siembra en las placas petrifilm, con la finalidad de determinar la carga inicial de *E. coli* presente en la leche fresca. Para ello se realizaron cuatro diluciones haciendo uso de solución salina fisiológica, la siembra se realizó por duplicado de las tres últimas diluciones. Seguidamente se incubo a 35° por 48 horas
- i) **Inoculación de cultivo:** Se realizó la inoculación de las concentraciones de cultivo a cada muestra de leche semana. Cada concentración de cultivo se trabajó en base a 500ml de leche. Una vez inoculados los cultivos, se agitó la muestra por 5 minutos y se almacenó a temperatura de refrigeración. Los tiempos en los que se realizaron los controles fueron pasada las 8 y 24 horas. Para determinar el crecimiento de *E. coli* y variación de pH.
- j) **Diluciones:** Transcurridas las 8 horas y 24 horas se realizaron diluciones a cada muestra para hacer la siembra en láminas petrifilm. Se realizaron tres diluciones para la muestra que contenía el cultivo *L. rhamnosus* y cuatro diluciones para la muestra sin cultivo. Las diluciones se elaboraron haciendo uso de solución salina fisiológica al 0.9%.

- k) Siembra:** Se hizo la siembra por duplicado de todas las diluciones pertenecientes a la muestra con cultivo, para la muestra control se realizó la siembra de las tres últimas diluciones.
- l) Incubación:** Las láminas previamente rotuladas fueron incubadas a una temperatura de 35°C por 48 horas.
- m) Recuento de *Escherichia coli*:** Se realizó la técnica de cuantificación de *E. coli* siguiendo las instrucciones del manual de las láminas petrifilm. Se contabilizaron las colonias de color rojo y rojo-azuladas, en algunos casos con producción de gas a su alrededor.

3.4.5. Parte experimental de la investigación

La parte experimental de la investigación del efecto de la inoculación de cultivo protector en la inhibición de *Escherichia coli* de leche fresca se realizó durante 4 semanas. Durante la primera semana se realizaron pruebas preliminares con la finalidad de definir tiempos y temperaturas a las cuales se someterían las muestras, y las tres semanas restantes se realizaron las pruebas definitivas con las temperaturas, tiempos y concentraciones seleccionadas.

Se trabajó con 4 muestras por semana, con 3 concentraciones distintas de cultivo protector y una muestra sin cultivo. Todo el proceso se realizó por triplicado en el lapso de 3 semanas. Los valores obtenidos en la investigación se expresan mediante un promedio, debido se tenía la misma tendencia en los resultados. Para la dosificación del cultivo se tomó como valor de referencia investigaciones realizadas por otros investigadores.

a) Pruebas Pre eliminares:

- Para las prueba pre eliminares, se siguió el proceso descrito en el flujograma, sometiendo a las 4 muestras a temperaturas de 8°, 20° y 35 °, de la cuales una fue la muestra control y la 3 restantes fueron las muestras con concentraciones de cultivo protector de 0.00025gr, 0.0015gr, 0.003gr, respectivamente por cada temperatura trabajada.

- Las muestras fueron analizadas pasadas las 8 horas, 24 horas y 48 horas, realizándose el mismo proceso descrito en el flujograma.
- Al finalizar el proceso, finalmente se seleccionó la temperatura y tiempos adecuados para realizar las pruebas definitivas, siendo los tiempos de 8 y 24 horas a una temperatura de 8°C los más convenientes para la investigación, tomando en cuenta el rápido crecimiento bacteriano.

b) Pruebas definitivas:

- **Recepción de Leche Fresca:**

Se recolectaron 7 litros de leche fresca recién ordeñada semanales, proveniente del fundo la Victoria de la Universidad Nacional de Cajamarca.

- **Análisis fisicoquímico:**

Inmediatamente recepcionada la leche, se realizó la medición de pH haciendo uso de un potenciómetro previamente calibrado, tomando como referencia para la aceptación de muestra los valores de pH establecidos de 6.6 – 6.8 máximos especificados por la Norma Técnica Peruana para leche cruda. También se registró la temperatura para realizar la inoculación del cultivo protector.

- **Adición del cultivo protector:**

Se midió 4000ml de leche fresca en un recipiente previamente esterilizado, para poder realizar la preparación del cultivo madre. La leche se debe encontrar entre 25 y 30°C para un mejor desarrollo del cultivo. Seguidamente se disolvió el sobre que contenía 2 gr de cultivo liofilizado y se agitó por 5 minutos, se cerró herméticamente el recipiente y se reservó.

c) Trabajo de Laboratorio:

Las muestras serán transportadas al laboratorio en donde se procede con el análisis microbiológico.

- **Acondicionamiento de las muestras:**

Se midieron 2000 ml de leche repartiendo 500ml en 4 frascos esterilizados.

- **Inoculación del cultivo madre:**

- Para la primera concentración se inoculó 0.5 ml de cultivo madre en 500ml de leche
- Para la segunda concentración de inoculó 3ml de cultivo madre en 500 ml de leche
- Para la tercera concentración se inoculó 6 ml de cultivo madre en 500 ml de leche

Una vez adicionados los cultivos, se agitó la muestra por 5 minutos y se almacenó a temperatura de refrigeración, para un conteo más eficiente de colonias de *E. coli*. El tiempo en el que se realizaron los controles fueron pasadas las 8 y 24 horas. Para determinar el crecimiento de *E. coli* y variación de pH. Paralelamente a las muestras con el cultivo se realizaron los análisis para la muestra control.

- **Preparación de diluciones**

Se preparó 3 diluciones para cada muestra con cultivo, y 4 diluciones para la muestra sin cultivo, debido al rápido crecimiento de colonias de *E. coli*. Las diluciones se prepararon haciendo uso de solución salina fisiológica

- **Siembra y cuantificación de muestra en láminas petrifilm para *Escherichia coli***

Una vez que se obtuvieron las diluciones, se realizó la siembra por duplicado para cada dilución que contenía el cultivo, mientras que para la muestra patrón se realizó la siembra por duplicado de las 3 últimas diluciones.

Se realizó la técnica de cuantificación de *E. coli* utilizando placas petrifilm 3M procediendo de la siguiente manera:

1. Se colocó la placa Petri film en una superficie plana, y se levantó el film superior para la inoculación de 1 ml muestra, evitando que se introdujera burbujas de aire.
2. Se esparció con el aplicador la muestra a lo largo de la placa petri film por un minuto.
3. Se incubó las placas Petri film en posición cara arriba, a 35°C por 48hrs.
4. Posteriormente se contabilizo todas las colonias que tenían un color rojo a rojo azulado y producción de gas a su alrededor, el cual indica la presencia de *E. Coli*.
5. Se realizó las anotaciones respectivas, y promediando los resultados para obtener la cantidad aproximada de colonias por muestra analizada.

3.4.6. Esquema experimental

En la tabla 7 se muestra el esquema experimental que se siguió en la investigación.

Tabla 7 Esquema experimental de la investigación

Etapas	Trabajo de campo			Trabajo de laboratorio						Seguimiento (horas)	
	Recolección de materia prima	Análisis fisicoquímico de leche	Preparación de cultivo madre	Análisis microbiológico	Inoculación de cultivo	Diluciones	Siembra	Incubación	Recuento de Escherichia Coli	0	24
Metodología Experimental	→	→	→	→	Control – 0gr →	→ ^{10⁻²} → ^{10⁻³} → ^{10⁻⁴}	→	→	→	→ ○	
					C1- 0.00025gr →	→ ^{10⁻¹} → ^{10⁻²} → ^{10⁻³}					
					C3 – 0.00 3 gr →	→ ^{10⁻¹} → ^{10⁻²} → ^{10⁻³}					
					C2 – 0.0015 gr →	→ ^{10⁻¹} → ^{10⁻²} → ^{10⁻²}					
Controles	Peso	pH Temperatura	Peso Temperatura	Escherichia Coli				T: 35°C	Escherichia Coli	Temperatura Escherichia Coli	

3.4.7. Unidad de análisis y muestra

- a) **Unidad de análisis:** Es la leche fresca recién ordeñada.
- b) **Muestra:** Se seleccionaron 21 litros de leche fresca de vaca

3.4.8. Instrumentos de colecta de datos

En la tabla 8 se muestra los instrumentos utilizados para la medición de variables utilizadas en la trabajo de investigación.

Tabla 8 Instrumento de colecta de datos

Variable	Instrumento de recolección de datos
Peso en gramos	Toma de datos de una Balanza Analítica
Ph	Toma de datos de un potenciómetro
Temperatura (C°)	Toma de datos de un termómetro digital
Numero de Colonias de <i>Escherichia Coli</i>	Toma de datos de láminas petrifilm para <i>Escherichia coli</i>
Tiempo (horas)	Toma de datos de un reloj digital

3.4.9. Procedimiento de análisis de datos

Para ejecución del análisis estadístico se realizó el Diseño de Superficie de respuesta, haciendo uso de programa informático STATGRAPHICS Centurión y un ANOVA;

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación del efecto de la inoculación de cultivo protector en el crecimiento de *Escherichia coli* en leche fresca.

Para el presente análisis, se realizaron muestreos al momento de la recepción de leche, así como también pasadas las 8 y 24 horas luego de adicionar el cultivo. En la tabla 9 se observa las concentraciones aplicadas a las 4 muestras, las cuales fueron almacenadas a temperatura de refrigeración. También se observan los tiempos de conservación y UFC de *E. coli* contabilizadas en el análisis microbiológico.

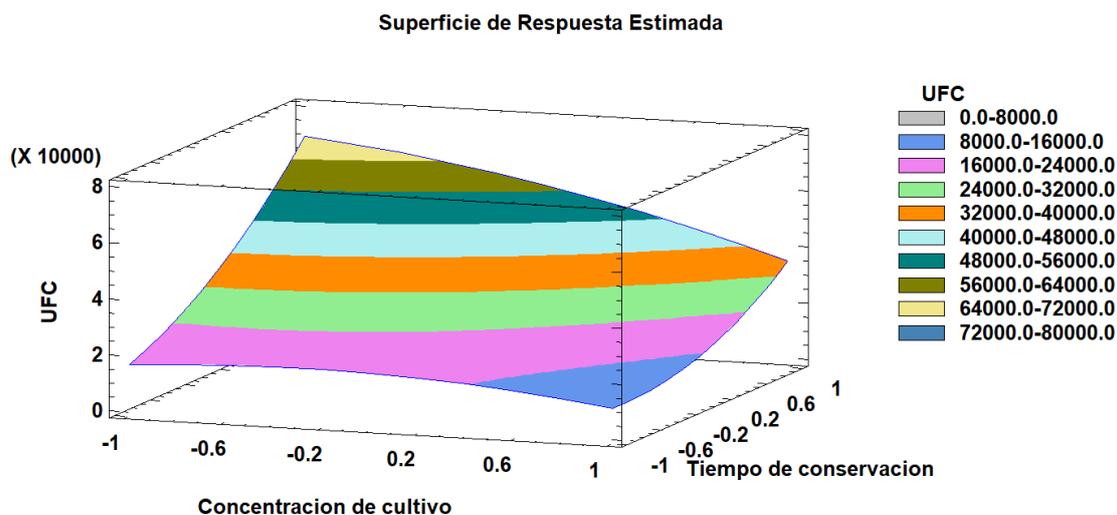
Tabla 9. Evaluación del efecto de la inoculación de cultivo protector en el crecimiento de *E. coli* en leche fresca

Muestra	Concentración de cultivo	Tiempo de conservación (horas)	T° (°C)	Ph	Lámina 1	Lámina 2	Lámina 3	Promedio de UFC/ml
M. Patrón	Sin cultivo	0	24 °C	6.95	15300	16600	14000	15000
		8	13.2°C	6.7	25850	61600	35000	41000
		24	7.4°C	6.65	24750	111800	59000	65000
M 1 (1/2 litro de leche)	0.00025gr	0	24 °C	6.95	15300	16600	14000	15000
		8	13.2°C	6.6	22850	24350	30500	36000
		24	7.4°C	6.5	18280	113000	61000	64000
M 2 (1/2 litro de leche)	0.003 gr	0	24 °C	6.95	15300	16600	14000	15000
		8	13.2°C	6.5	22565	33750	13000	23000
		24	7.4°C	6.45	16400	102400	44500	54000
M 3 (1/2 litro de leche)	0.0015gr	0	24 °C	6.95	13300	16600	14000	15000
		8	13.2°C	6.48	11600	15400	5000	11000
		24	7.4°C	6.42	13030	63400	31500	36000

Se observa que a mayor concentración de cultivo *Lactobacillus rhamnosus* existe un menor crecimiento de colonias de *E. coli*. Los valores obtenidos comparados con los reportados por otros autores en estudios realizados con bacterias aerobias mesófitas y psicrótrofas difieren en la proporción en la que el cultivo muestra inhibición ante las bacterias analizadas. En los estudios reportados tiene una mayor inhibición ante bacterias aerobias mesófilas y bacterias psicrotrófas. Los resultados reportados por Bernilla (2016) y por la empresa Tutteur alimentos (2013) muestran que la carga microbiana disminuyó aproximadamente en un 70 % comparando con su concentración inicial, en ambos casos. Mientras que para este estudio, las poblaciones de *E. coli* aumentaron en todas las muestras con respecto a su concentración inicial; sin embargo se observa que las muestras con cultivo *L. rhamnosus*, a diferencia de la muestra control, tienden a un menor crecimiento de colonias de *E. coli*

Por otro lado se puede observar que no existe una variación significativa de pH, resultados similares han sido obtenidos en el estudio realizado por Lima, D'amico y Montanholu (2017) donde señalan que existió una reducción de un ciclo logarítmico de *P. fluorescens* sin variación significativa de pH. De la misma manera Calderón et al (2011) demostró en su investigación, que el pH analizado en muestras de yogurt con cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* adicionado, se mantenían constantes. Hernandez (1975) hace referencia que a temperaturas comprendidas entre 4° y 10° C se retarda la actividad metabólica de las bacterias, en consecuencia la disminución de pH no varía de manera acelerada comparando con una muestra almacenada a temperatura ambiente que sí tendría una variación brusca debido al desarrollo de bacterias

Figura 3 Superficie de respuesta estimada para UFC de *Escherichia coli* en función de la concentración del cultivo y tiempo de conservación



Leyenda:

Concentración de cultivo	
Sin cultivo	-1
0.00025gr	-0.33333
0.0015gr	0.333333
0.003gr	1
Tiempo	
0 horas	-1
8 horas	0
24 horas	1

En la figura 3 se muestra la superficie de respuesta estimada para UFC de *E. coli* en función al tiempo de conservación y a la concentración de cultivo

El grafico de superficie de respuesta nos muestra la cantidad de UFC de *E. coli* inicial con la cual llego la leche fresca, así como también la relación entre el crecimiento de UFC de *E. coli* con la concentración y el tiempo de conservación de todas las muestras. Tomando en cuenta que para la concentración de cultivo -1 representa la muestra sin cultivo de cultivo y 1 la cantidad máxima de cultivo adicionada, que fue 0.003gr. En cuanto al tiempo -1 representa 0 horas y 1 representa las 24 horas.

4.2. Comportamiento de *Escherichia coli* en la muestra control

En la figura 4 se muestra un gráfico donde se analiza el crecimiento de colonias de *E. coli* en la muestra sin cultivo, con respecto a tiempo de conservación en refrigeración. Se realiza el análisis a las 0, 8 y 24 horas.

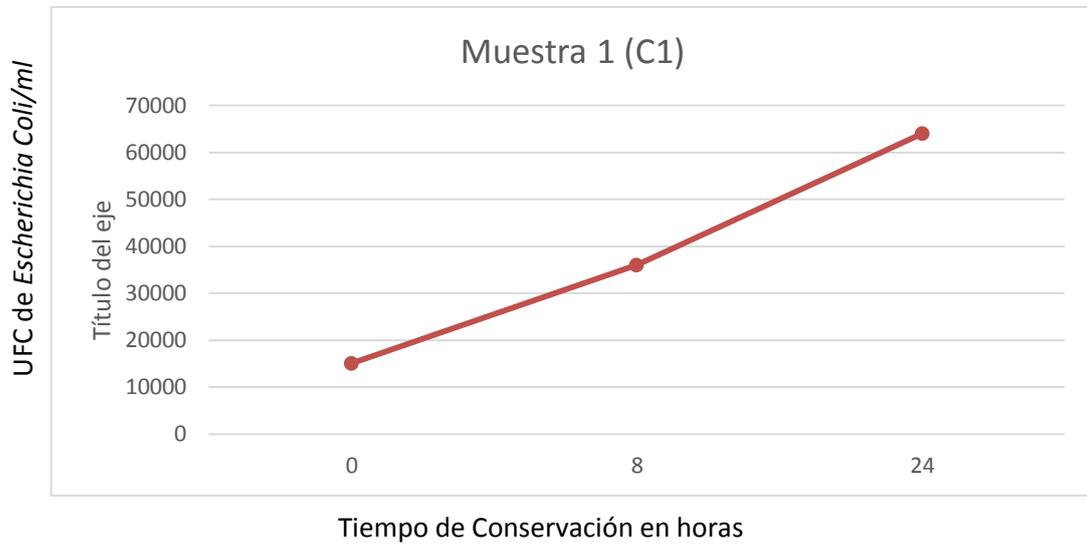
Figura 4 Curva de crecimiento de *Escherichia coli* en leche fresca en muestra patrón



Se observa que la muestra sin cultivo almacenada a temperatura de refrigeración tuvo un crecimiento continuo. Se contabilizó un aproximado de 15000 UFC/ ml al momento de la recepción de la leche, transcurridas las 24 horas la muestra alcanza una población promedio final de 65000 UFC/ml aumentando más de 4.3 veces su población inicial

4.3. Comportamiento de *E. coli* en la muestra 1 (C1)

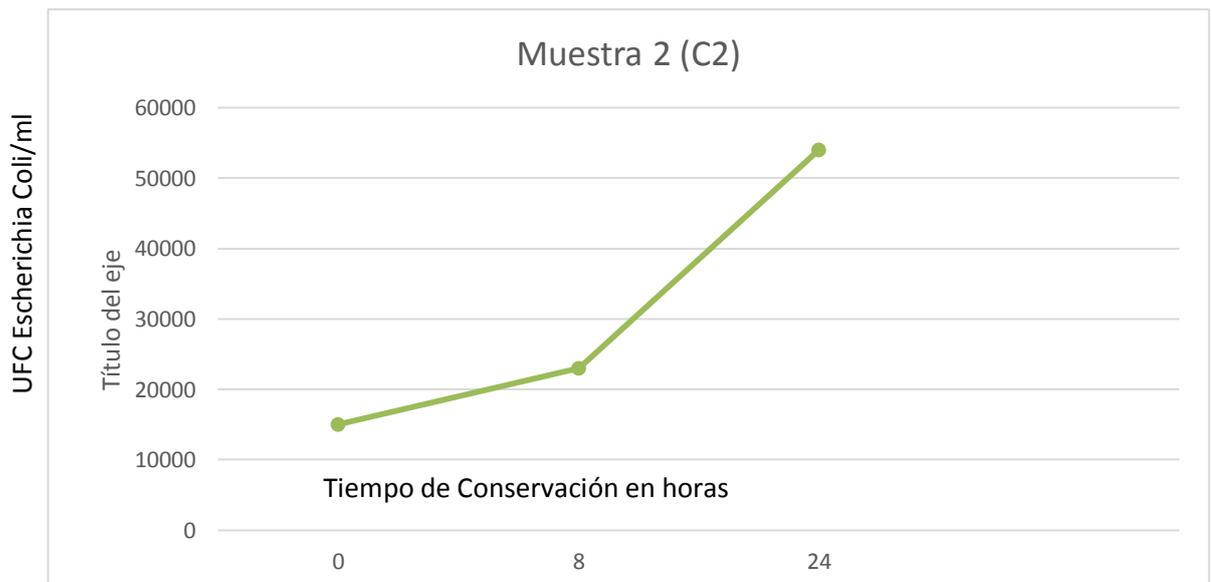
Figura 5 Curva de crecimiento de *Escherichia coli* en leche fresca en muestra 1 (C1)



En la figura 5 se muestra la curva de crecimiento de *Escherichia coli* en la muestra 1, en la cual se inoculo 0.00025 gr de cultivo *Lactobacillus rhamnosus*. La muestra 1 alcanzo una población promedio final de 64000 UFC/ml aumentando 4.2 veces su población inicial 15000UFC/ml

4.4. Comportamiento de *E. coli* en la muestra 2 (C2)

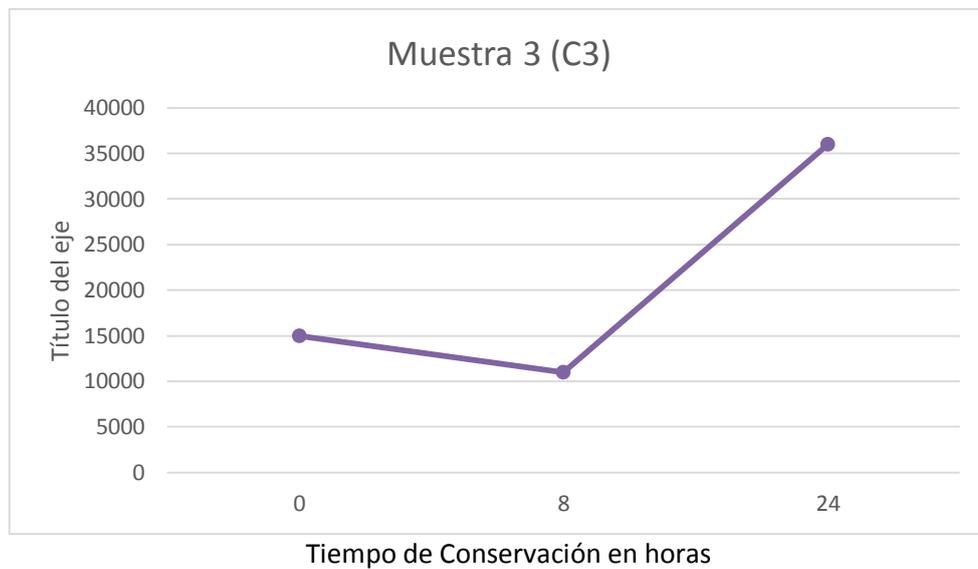
Figura 6 Curva de crecimiento de *Escherichia coli* en leche fresca en muestra 2 (C2)



En la figura 6 se muestra la curva de crecimiento de *Escherichia coli* para la muestra 2 en la cual se inoculo 0.003 gr de cultivo *Lactobacillus rhamnosus*. Se observa el crecimiento aproximado de 54000 UFC/ml de *Escherichia coli* aumentando 3.6 veces su población inicial 15000 UFC/ml

4.5.Comportamiento de *E. Coli* en la muestra 3 (C 3)

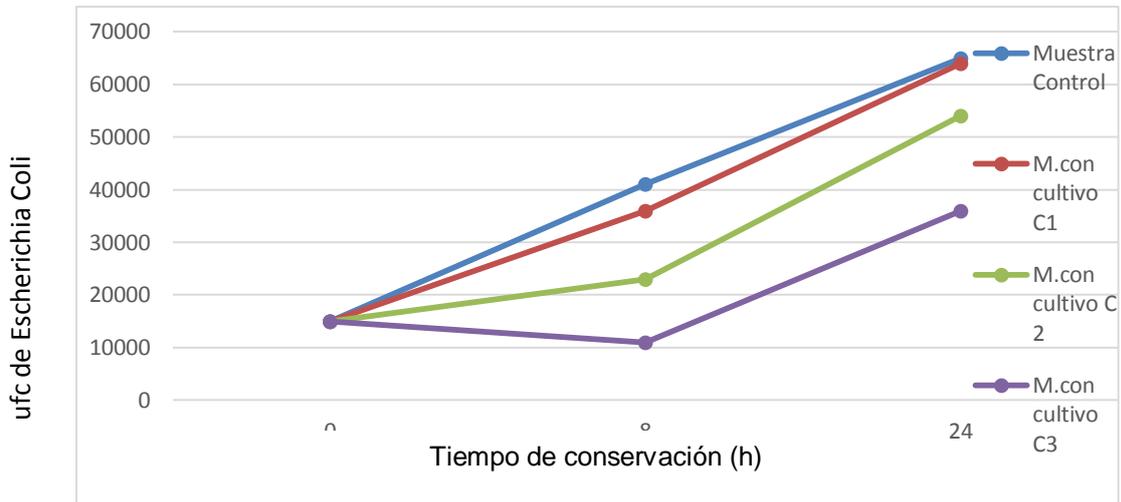
Figura 7 Curva de crecimiento de *Escherichia coli* en leche fresca en muestra 3 (C3)



En la figura 7 se muestra en comportamiento de colonias de *E. coli* para la muestra 4 en la cual se inocularon 0.0015 gr de cultivo *L. rhamnosus*. Se observa que transcurridas las primeras 8 horas, luego de adicionado el cultivo, la muestra tiende a un descenso de colonias de *E. coli*, sin embargo transcurridas las 24 horas, se registró una población promedio final de 36000 aumentando 2.4 veces su población inicial 15000 UFC/ml.

4.6. Comportamiento de *E. coli* en las 4 muestras analizadas

Figura 8 Curva de crecimiento de *Escherichia coli* en las 4 muestras a temperatura de refrigeración



En la figura 8 se observa que tanto la muestra control como las M1 (0.00025gr de cultivo) y la M2 (0.0015gr de cultivo) tiene aumento de colonias de *E. coli* en las primeras 8 horas. Por el contrario la M3 (0.003gr de cultivo) tuvo un descenso de UFC durante las primeras 8 horas.

Los resultados analizados en esta investigación son similares a los expuestos por Risco (2015) en su investigación del efecto bactericida de *L. rhamnonsus* sobre una población de *E. coli* inoculado en queso mantecoso, en la cual trabajó con 4 muestras, una muestra patrón y 3 muestra con concentraciones de 10^3 , 10^6 y 10^9 UFC/ml de cultivo *L. rhamnonsus* demostró que obtuvo un efecto inhibitorio leve en muestras trabajadas con concentración de 10^3 y 10^6 UFC/ml, se observó un aumento aproximado de 3 y 1.4 ciclos logarítmicos desde su población inicial comparando con su muestra patrón que aumento 4 ciclos logarítmicos desde su población inicial. Al respecto Mejía (2007), indican que aparentemente, a bajas concentraciones el efecto es inhibitorio afectando tan sólo un cierto número de células. En la presente investigación se observó una inhibición parcial de UFC más no una reducción de colonias de *E. coli*.

Tabla 10 ANOVA: Análisis de varianza para UFC de *Escherichia coli*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Concentracion de cultivo	6.70158E8	1	6.70158E8	28.58	0.0018
B:Tiempo de conservación	3.13973E9	1	3.13973E9	133.88	0.0000
AA	5.16136E7	1	5.16136E7	2.20	0.1885
AB	2.36575E8	1	2.36575E8	10.09	0.0192
BB	1.4954E8	1	1.4954E8	6.38	0.0450
Error total	1.40709E8	6	2.34516E7		
Total (corr.)	4.38832E9	11			

R-cuadrada = 96.7935 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 94.1215 porciento

Error estándar del est. = 4842.68

Error absoluto medio = 2982.52

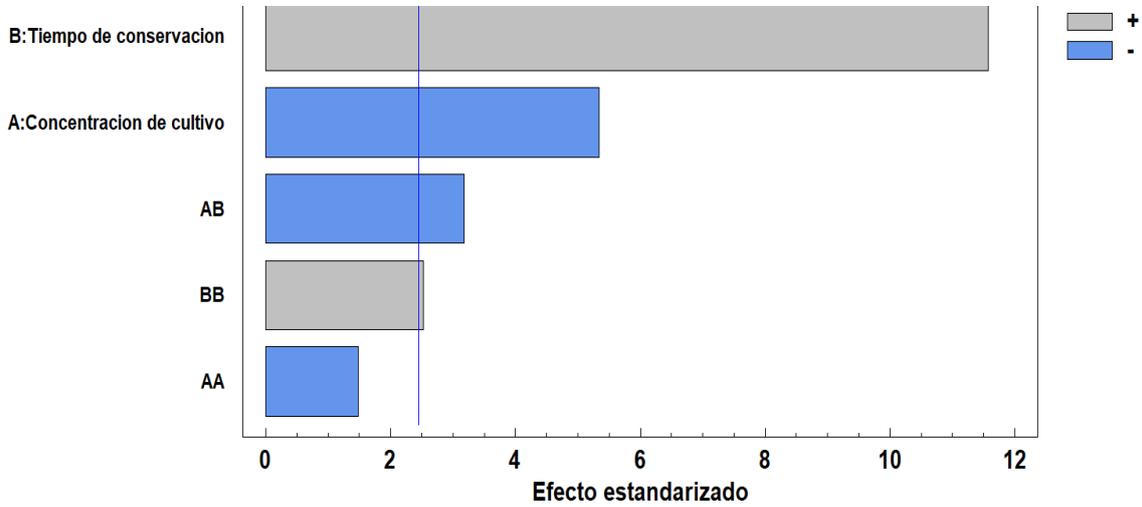
Estadístico Durbin-Watson = 1.00313 (P=0.0008)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.496181

En la tabla 10 se puede observar el análisis de varianza para las unidades formadoras de colonias (UFC) de *E. coli*, en la cual se muestra que tanto la concentración de cultivo como el tiempo de conservación tienen un valor – P menor a 0.05, indicando que tienen un valor significativo sobre el crecimiento de UFC de *E. coli* con un nivel de confianza del 95%. Esto demuestra el efecto bactericida de *L. rhamnonsus* frente *E. coli*.

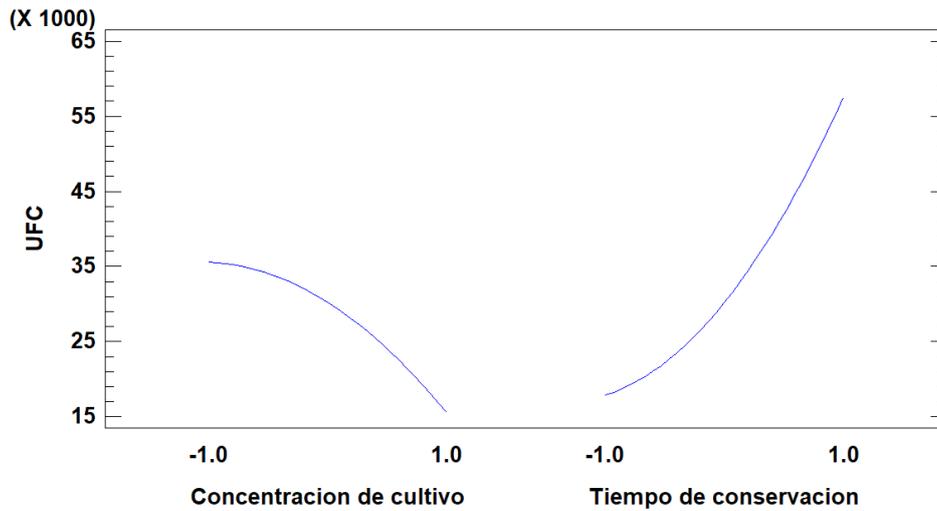
Afirmando lo descrito por Gonzales et al (2003) donde menciona que bacteriocinas emitidas por *L. rhamnonsus* por lo general, actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácido nucleicos.

Figura 9 Diagrama de Pareto estandarizado para UFC



En la figura 9 se observa el diagrama de Pareto estandarizado para UFC de *E. coli*, donde se presenta el efecto de los dos factores evaluados en orden decreciente, así como las tendencias positivas y negativas sobre la respuesta evaluada. Cao *et al.* (2011) indican que el diagrama de Pareto se compone de barras con una longitud proporcional al valor absoluto de los efectos estimados, dividido por el error estándar. Cualquier barra que se extiende más allá de la línea vertical, que representa el nivel de significación seleccionado (5 %), es estadísticamente significativa. Por lo tanto el tiempo de conservación y la concentración de cultivo protector tienen un efecto significativo sobre el crecimiento de UFC de *E. coli*. Considerando que el tiempo de conservación tiene una tendencia positiva, y la concentración, una tendencia negativa.

Figura 10 Grafica de efectos principales para UFC



Leyenda:

Concentración de cultivo	
Sin cultivo	-1
0.00025gr	-0.33333
0.0015gr	0.333333
0.003gr	1
Tiempo	
0 horas	-1
8 horas	0
24 horas	1

En la figura 10 se observa la gráfica de efectos principales para UFC de *E. coli*, en la cual se relaciona el crecimiento de unidades formadoras de colonia de *E. coli* con la concentración de cultivo protector *L. rhamnonsus* y con el tiempo de conservación

En la gráfica de efectos principales para UFC (Figura 10) se muestra que la concentración de cultivo tiene una tendencia negativa con respecto a las UFC de *E. coli*, es decir a mayor concentración de cultivo de *L. rhamnonsus* existe un menor crecimiento de colonias de *E. coli*. Por el contrario, el tiempo de conservación tendrá una tendencia positiva, debido a que mientras mayor sea el tiempo de conservación de la muestra habrá un mayor crecimiento de unidades formadoras de colonias de *E. coli*.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Se determinó que el cultivo *Lactobacillus rhamnosus* tiene un efecto bactericida sobre las UFC de *Escherichia coli* presentes en leche fresca.
- Las tres muestras que contenían concentraciones de cultivo *Lactobacillus rhamnosus* mostraron inhibición de UFC de *Escherichia coli*, proporcional a la cantidad de cultivo adicionada. Siendo la muestra con 0.003 gr de *L. rhamnosus*, la que obtuvo menor crecimiento UFC de *Escherichia coli* a comparación de las muestras restantes.
- Se recomienda comparar los efectos de *Lactobacillus rhamnosus* con los de otros cultivos que causen inhibición de *Escherichia coli* con la finalidad de evaluar cual tiene mayor efecto bactericida.
- Realizar el mismo trabajo de investigación aplicado a leche proveniente de vacas criollas, con la finalidad de evaluar si existe diferencia alguna en el desarrollo *Lactobacillus rhamnosus* de acuerdo a composición de la leche y a su proveniencia.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALAIS, C (1985). Ciencia de la leche: Principios de Técnica lechera (en línea).Barcelona-España Edit. Reverté. 884p. Consultado el 01 de agosto del 2019. Disponible en <https://es.scribd.com/document/354903801/Alais-Charles-Ciencia-De-La-Leche-Principios-De-Tecnica-Lechera-pdf>
- Abee T, Rombout F. (1994) Mode of action on nisis Z against *Listeria monocytogenes* Sott A gown at high and low temperatures. Revista Applied and Environmental microbiology. N° 66; 15-17. Consultado 03 de Septiembre del 2019. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92408/>
- Arias,B, Reyes, M; ; Navaroo,L; Solis,B; Mazquez,M; Sanchez, G; Snell, R; Zuñiga R (2013) Antagonistic effect of probiotic strains against two pathogens: *Salmonella Typhimurium* and *E. coli O157:H7* resistant to antibiotics (en línea) . Guadalajara-Mexico, Revista e-Gnosis N°11; 1-16. Consultado 03 de Septiembre del 2019. Disponible en <https://rei.iteso.mx/bitstream/handle/11117/3993/Art%c3%adculo%20revista%20e-Gnosis.pdf?sequence=2>.
- Begazo, C, Dillma Aleixon (2014) Tratamientos para la conservación de la leche – cloruro de sodio y estandarización de sales – separación por sedimentación (tesis pregrado), Arequipa-Perú. Universidad Nacional De San Agustín De Arequipa 158p
- Bernilla, J (2016) Cultivos lácticos Protectores(en línea). Lima, Peru Revista Industria Alimentaria N°32; 26-46.Consultado 15 de a Julio 2018. Disponible en https://issuu.com/revistaindustriaalimentaria/docs/revista_32/46
- Benjamín, F. (2011). Libro blanco sobre la leche y los productos lácteos. Primera Edición: Generalidades de la leche y los productos lácteos. (en línea) D.F. México: Canilec. 157p.Consultado 16 de Julio del 2019 .Disponible en https://www.uv.mx/personal/pcervantes/files/2012/05/libro_blanco_de_la_leche.pdf
- Buñay C , Peralta K (2015) “Determinación del recuento de aerobios mesófilos en leche cruda que ingresa a industrias lacto Ochoa - Fernández cia. Ltda” (tesis pregrado) – Cuenca – Ecuador. Universidad de cuenca 101p
- Calderón A, García F, Martínez G.(2006) Indicadores de calidad de leches crudas en diferentes regiones de Colombia. Revista MVZ Córdoba.; 11(1):725-737
- Caldero O, Padilla C, Chaves C, Villalobos L y Arias M (2007). Evaluacion del cultivo probiotico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probioticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia Coli O157:H7*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonellas enteritidis*.(En línea). Costa rica, Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET). Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Informe N°57.Consutado 04 de Septiembre del 2019.

Disponible en http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222007000100007

Cao, W; Zhang, C; Ji, H; Hao, J. (2011) Optimization of peptic hydrolysis parameters for the production of angiotensin I-converting enzyme inhibitory hydrolysate from *Aceteschinensis* through Plackett–Burman and response surface methodological approaches(en línea) Zhanjiang-hina. Journal of the Science of Food and Agriculture N°92; 42-48. Consultado 02 de Septiembre del 2019- Disponible en <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jsfa.4538>

Carpio L (2011) Factores asociados a la adulteración comercial de leches y yogures en Guayaquil.(tesis pregrado). Guayaquil. Ecuador. Universidad de Guayaquil. 124p

Celis, M., y Juárez, D. (2009). Seminario de Procesos Fundamentales Fisico- Químicos y Microbiológicos Especialización y Maestría en Medio Ambiente Laboratorio de Química: Microbiología de la Leche.(en línea) Buenos Aires- Argentina. Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional. 180p. Consultado el 13 de Mayo de 2019. Disponible en http://www.edutecne.utn.edu.ar/sem_fi_qui_microb_09/microbiologia_leche.pdf.

Chikindas M, Garcia M, Driessen A, Ledebøer A, Nissen J, Nes I, Abee T, Koning (1993) Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAS1.0 forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. Revista Applied and Environmental Microbiology . Consultado 06 de Septiembre del 2019. Disponible en <https://aem.asm.org/content/59/11/3577.long>

Clerici- Sacco (2016) Protectives cultures in the food industry.: 4 PROTECTION SPECIAL PROTECTIVE CULTURES SACCO.(diapositivas). Roma, Italia. 60 diapositivas, color.

CODEX STAN 206-1999 Leche y Productos lácteos: Segunda Edición. Norma general del codex para el uso de términos lecheros. Roma, Italia 265p

Durán, M.; Montero, P.; Flórez, W.; Franco de la Hoz, V. & Coneo R. (2010). Evaluación Higiénico-Sanitaria y Acción Antagónica de Cepas de lactobacilos comerciales frente a Microorganismos patógenos (*Escherichia coli*) presentes en el queso de capa del municipio de mompox. Grupo de Investigación Nutrición, Salud y Calidad Alimentaria (NUSCA), Programa Ingeniería de Alimentos, Facultad de Ingeniería, Universidad de Cartagena. Cartagena-Colombia. Revista científica, FCV-LUZ, 10(3). 312-317pp

Flores, A. y Morey. I , (2016). Relación entre la condición higiénica sanitaria y la calidad microbiológica en jugos de frutas surtidos de dos mercados de la ciudad de Iquitos, 2015”.Tesis pregrado. Iquitos-Peru . Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. 119p

Fox, P, 2002. Milk Encyclopedia of Dairy Sciences: Milk (en línea). Primera Edición. Fuquay, J. W., P. F.Fox y H. Roginski (eds.). Elsevier Science & Technology. Oxford. Gran Bretaña. pp: 1806-1812.Consultado 24 de Julio del 2019. Disponible en

https://books.google.com.pe/books?id=dXE0ZfUnCKwC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

- García, C., Montiel, R y Borderas, T.(2014). Grasa Y Proteína De La Leche De Vaca: Componentes, Síntesis Y Modificación (en línea) .63 (:85-105- .Coyoacan-Mexico. Revista Archivos de zootecnia, Consultado 25 de Abril de 2019 .Disponible en: http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/19_10_27_3153REVISIONGrasaGarcia.pdf
- Gonzales, G.; B. Molina & R. Coca. 2010. Calidad de la leche cruda. Primer foro sobre ganadería lechera de la zona alta de Veracruz. Memorias (en línea). Veracruz-Venezuela. 10p .Consultado 01 de agosto del 2019. Disponible en https://www.uv.mx/apps/agronomia/foro_lechero/Bienvenida_files/CALIDADDEL ALECHECRUDA.pdf
- Gonzales M, Gomez M, Zacarias J (2003). Bacteriocinas de probioticos (en línea) Revista Salud Publica y Nutricion Vol 4, N°2. Consultado 5 de Setiembre del 2019. Disponible en http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/115/risco_th.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Jenkins, T y McGuire. M 2006. Major advances in nutrition: impact on milk composition. Journal of Dairy Science 89(4): 1302-1310. Consultado 24 de julio del 2019. Disponible en [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(06\)72198-1/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(06)72198-1/fulltext)
- Heer. E. 2007. Catedra de Tecnología de la leche. Microbiología de la leche. Memorias (en línea). Universidad Nacional del Litoral. Santa fe , Argentina. 19 p. Consultado 16 de Mayo del 2019. Disponible en https://biologiaaplicada.com/_files/200000124-b17c3b277f/MICROBIOLOGIA%20DE%20LA%20LECHE%202007%20Dr%20Ger%20C3%B3nimo%20E%20Heer.pdf
- Hernandez J (1975). La refrigeración de la leche (en línea). Ministerio de agricultura. Madris España . 28 p . Consultado 20 de Noviembre del 2019. Disponible en https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1975_04-05.pdf
- ICMSF(1998). Microbiología de los Alimentos: Características de los patógenos microbianos- Zaragoza, España. 606p. Acribia 606p.
- Lanchipa, L Sosa Y, (2003). Evaluación de la carga microbiana patógena en la elaboración del queso fresco en el distrito de Tacna.(tesis pregrado). Tacna- Perú. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann 30p
- Lopez. A y Velo, L (2016). La leche, composición y características: Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural.(en línea)Sevilla, España Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. 34p . Consultado 24de Julio del 2019. Disponible en <file:///C:/Users/BigBang/Downloads/La%20leche,%20composicion%20y%20caracteristicas.pdf>

- Krist, K, Ross,T. y McMeekin T(1998). Final optical density and growth rate; effects of temperature and NaCl differ from acidity. Turin- Italia .Internacional Journal of Food Microbiology 43:195-203.. Consultado 30 de Julio de 2019. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816059800110X?via%3Dihub>
- Magariños,H (2000) Libro de calidad de leche: Producción higiénica de la leche cruda. Valdivia-Chile. Producción y Servicios Incorporados S.A 104p
- Madigan, M, Martinko, J. M. y Parker, J. (1997). Brock Biology of Microorganisms. Nueva York. EE.UU Ed. Prentice Hall International, 8: 149 – 177. Consultado 30 de Julio del 2019. Disponible en [https://www.scrip.org/\(S\(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2044446](https://www.scrip.org/(S(czeh2tfqyw2orz553k1w0r45))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2044446)
- McMeekin, T, Olley,J., Ross,T y Ratkowsky, D (1993). Predictive Microbiology: Theory and Application (en línea). Belgrade, Serbia. Institute of Meat Hygiene and Technology,p. 57-66. Consultado 30 de Julio del 2019. Disponible en [file:///C:/Users/USER/Downloads/39-Manuscript-249-1-10-20180221%20\(2\).pdf](file:///C:/Users/USER/Downloads/39-Manuscript-249-1-10-20180221%20(2).pdf)
- Mejía R (2007) Obtención de cepas de Lactobacillus: Caracterización IN-VITRO como potencial probióticas”. Revista Científica. Vol. 17,. p. 178-185.
- Mendez,M y Avila, L (2007). Caracterización de la calidad higiénica y sanitaria de la leche cruda en algunos sistemas productivos de la región del alto del Chicamocha (departamento de Boyacá) (tesis pregrado). Bogotá- Colombia. Universidad de la Salle. 156p
- Miller, G, Jarvis, J y McBean.L (2007). Handbook of Dairy Foods and Nutrition. (en línea) Tercera Edición (ed.). USA, CRC Press. 407 p. Consultado 23 de Julio del 2019. Disponible en <http://file.qums.ac.ir/repository/vct/nutrition/%D8%A2%D9%85%D9%88%D8%B2%D8%B4%D9%8A/%D9%83%D8%AA%D8%A8%20%D9%85%D8%B1%D8%AC%D8%B9/Handbook%20of%20DAIRY%20FOODS%20AND%20NUTRITION.pdf>
- Ministerio de Agricultura(2017). Decreto Supremo N°007-2017-Minagri : Especificaciones sanitarias microbiológicas en leche cruda. Lima-Perú .34p
- Mitsuoka T (1992) Intestinal flora and aging. (en línea) . Nutrition Reviews, Vol 50, p. 438–446,. Consultado 04 de Septiembre del 2019. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1488186>
- Mora, L (2003) Estudio de parámetros Microbiológicos que afectan la calidad del Queso tipo Gouda (tesis pregrado)-Valdivia –Chile. Universidad Austral de Chile 104p
- Moreno, F., Rodríguez,G, Mendez, V Osuna,L, Vargas,M (2007) Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche producida en la región de alto de Chicamocha(departamento Boyacá). Revista de medicina Veterinaria (14):p.61-83

- Narayanan, N., Roychoudhury, P Y Srivastava A. 2004 Isolation of adh mutan of Lactobacillus rhamnosus for production of L(+) Lactic acid. Valparaiso-Chile .Electronic. Journal of Biotechnology issn 0717-3458 7(1): 72-84. Consultado 01 de agosto del 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/27793668_Isolation_of_adh_mutant_of_Lactobacillus_rhamnosus_for_production_of_L_Lactic_acid
- Negri, L. 2005. El pH y la acidez de la leche: manual de referencias técnicas para el logro de leche de calidad. 2 ed. INTA. 7 p.
- Ortiz L y Rodriguez J (2015) “Incidencia del contenido de grasa de la leche de vaca, dosis del probiótico (lactobacillus casei - 01) y temperatura de inoculación del cultivo en la elaboración de queso fresco” (Tesis pregrado) Ibarra-Ecuador. Universidad Tecnica del Norte.108p
- Pascual A; M Del Rosario y Calderon V (2000). . Microbiología Alimentaria:Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. Segunda Edición. Madrid, España. Editorial Díaz de Santos.464p
- Prescott, L. M., Harley, J. P., and Klein, D. A. (2004). Microbiología 5ª Edición: Nutricion, crecimiento y control microbiano. España, Madrid. EditorialMcGraw-Hill. Interamericana. 1195p
- Pierson M. y Smoot L. (2001)Food Microbiology. Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. Segunda Edicion. Doyle M. Beuchat L. & Montville T. USA. ASM Press. 71-87p
- Risco T (2015) Efecto Bactericidad de diferentes poblaciones de (Lactobacillus casei var Rhamnosus) sobre una población de (Escherichia coli ATCC 25922)inoculado en queso mantecoso elaborado en condiciones de laboratorio durante el almacenamiento. (tesis pregrado) Trujillo, Peru. Universidad Cesar Vallejo. 55 p
- Santos , A (2007) Estudio de comportamiento cinético de microorganismo de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos. (tesis pregrado) Barcelona, España. Universidad Autonoma de Barcelona, 282 p
- Sarika, A. R.; Lipton, A. P.(2010) AISHWARYA, M. S. Bacteriocin production by a new isolate of Lactobacillus rhamnosus GP1 under different culture conditions. Kerala, India. Journal of the Society of Dairy Technology, Cornwall, 2 (5): 91-297. Consultado 29 de Julio del 2019. Disponible en file:///C:/Users/USER/Downloads/Bacteriocin_Production_by_a_New_Isolate_of_Lactobacillus_rhamnosus.pdf
- The University Wisconsin-Madison. (2013). Hoja de Información sobre cuestiones de Seguridad en la Granja; Riesgos para la salud al beber leche cruda. Madinson-Estados Unidos. Consultado 14 de Abril de 2019. Disponible en http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/documents/es_rawmilkRev.pdf.
- Todorov , S y Dicks , L(2005) Growth parameters influencing the production of Lactobacillus rhamnosus bacteriocins ST46BZ andST46BZ. Stellenbosch, South

- Africa. *Annals of Microbiology*, 55(4) 283-289 Consultado 30 de Julio de 2019. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/242316206_Growth_parameters_influencing_the_production_of_Lactobacillus_rhamnosus_bacteriocins_ST461BZ_and_ST462BZ
- TUTTEUR ALIMENTOS 20013. Experiencia cultivo SACCO LRB en silo de leche cruda.(diapositivas) Bouchard, P . Buenos Aires. Argentina. 21 diapositivas, color
- Urdaneta, J. (2005)¿Cómo obtener leche de calidad: en estos tiempos?(en línea. Estado de Yaracuy- Venezuela. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, 12 p. Consultado 14 de Junio del 2019 Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=VE2007400191>
- Vargas ,N 2006. Calidad de la leche(en línea) . Informe Maracay- Colombia, UCV. 11p. Consultado 16 de Julio del .. Disponible en http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/jornada_leche_III/calidad_de_la_leche_vargas.pdf
- Ward,J. y Timmins, M (1999). Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* an *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. Palmerston North Nueva Zelanda. *Letters in Applied Microbiology* 29:90-92. Consultado 14 de Junio del 2019 Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2672.1999.00586.x?sid=nlm%3Apubmed>
- Wattiaux, M. A. 2011. Composición de la leche y valor nutricional. Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera. Universidad de Wisconsin-Madison. USA. pp. 73-76.
- 3M Microbiología (2006). Placas Petri Film para para Recuento de E.Coli (En línea, sitio web). Consultado 03/05/2019- Disponible en <https://multimedia.3m.com/mws/media/4449500/3m-petrifilm-e-coli-coliform-count-plate-interpretation-guide-spanish.pdf>

ANEXOS

ANEXO N° 01. SESIÓN FOTOGRAFICA

MATERIALES E INSUMOS



Materiales de laboratorio



Frascos Estériles

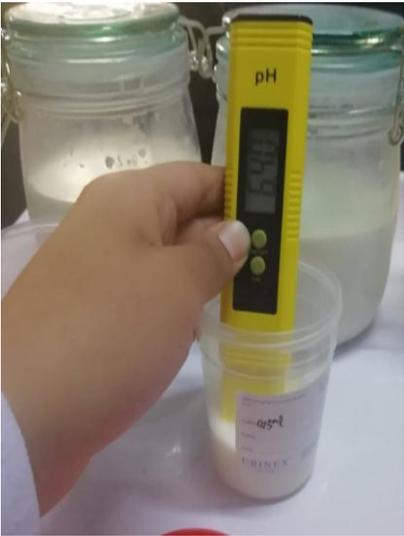


Leche fresca de vaca

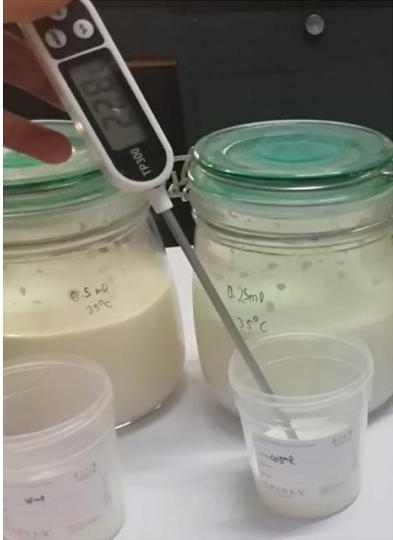


Termómetro digital y potenciómetro digital

PROCESO 'PARA ANALISIS Y PREPARACION DE MUESTRAS



Toma de pH



Toma de temperatura



Preparación de cultivo madre



Muestra patrón y muestras con cultivo



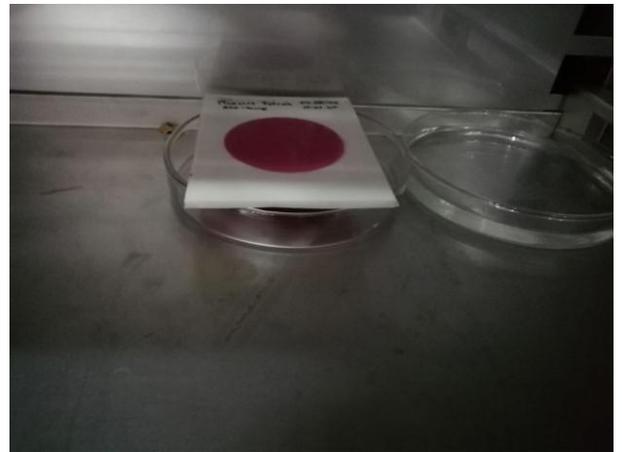
Almacenamiento de muestras en refrigeración



Diluciones de las muestras



Siembra en láminas petri film



Incubación de láminas

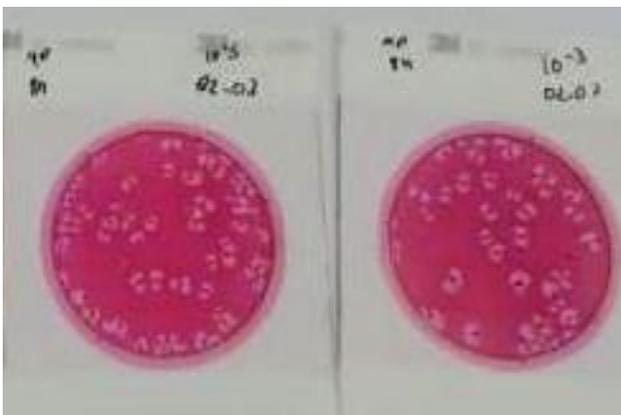


Recuento de UFC de *E. coli*

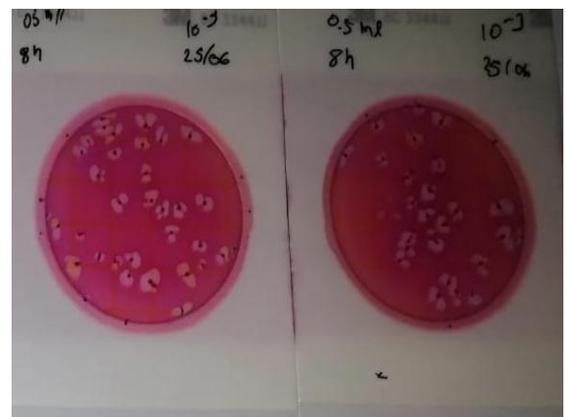


Crecimiento de UFC de *E. coli* en leche fresca sin cultivo a las 0 horas

CRECIMIENTO DE UFC DE ESCHERICHIA COLI EN MUESTRAS A LAS 8 HORAS DE ALMACENAMIENTO



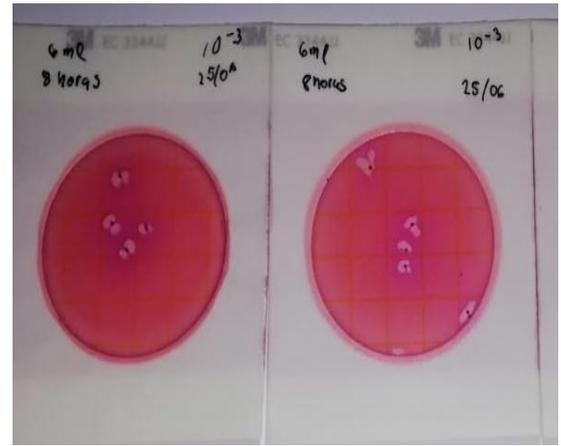
Muestra patrón



Muestra con 0.00025 gr de cultivo protector

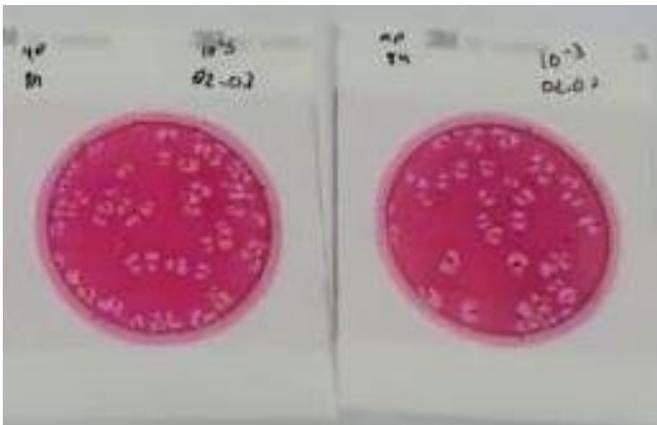


Muestra con 0.0015 gr de cultivo protector

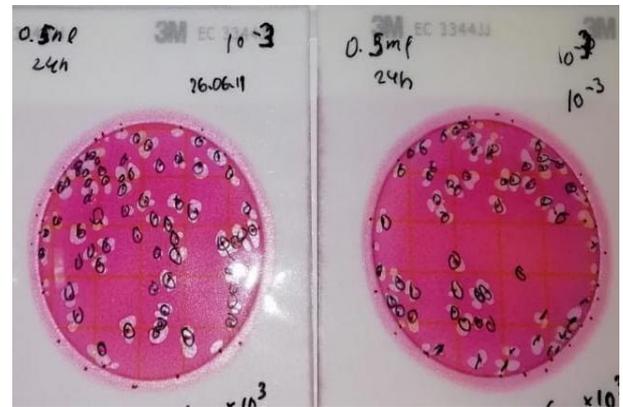


Muestra con 0.0035 gr de cultivo protector

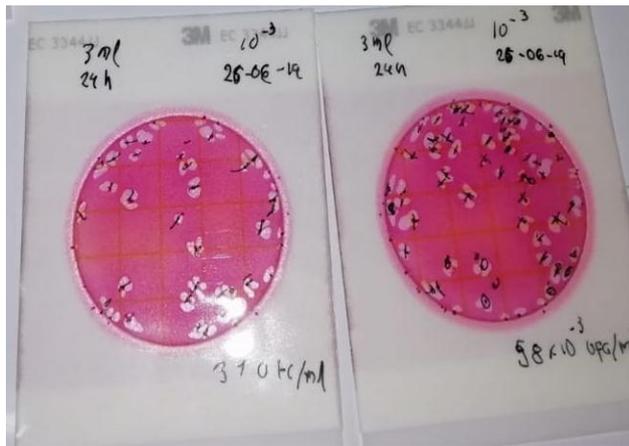
CRECIMIENTO DE UFC DE ESCHERICHIA COLI EN MUESTRAS A LAS 24 HORAS DE ALMACENAMIENTO



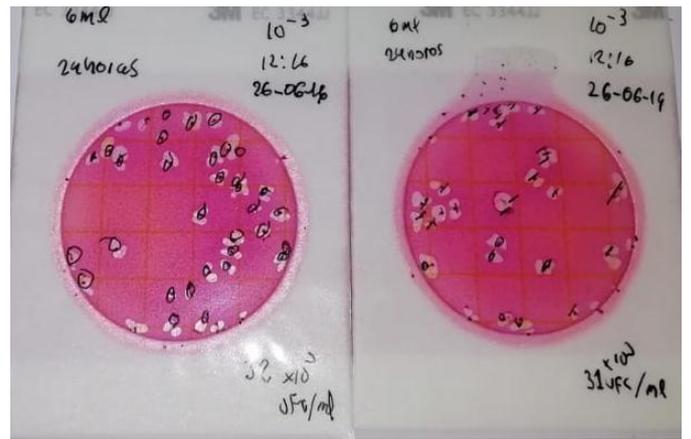
Muestra Patrón



Muestra con 0.00025 gr de cultivo protector



Muestra con 0.0015 gr de cultivo protector



Muestra con 0.003 gr de cultivo protector

GLOSARIO

Aerotolerante, pueden crecer en presencia de oxígeno, pero no pueden utilizarlo, y obtienen energía exclusivamente por fermentación.

Antibióticos, todas aquellas sustancias químicas producidas por organismos vivos que tienen el poder de inhibir el desarrollo o destruir bacterias y otros microorganismos en soluciones débiles.

Bacteriocinas, toxina proteica sintetizada por una bacteria con el fin de inhibir el crecimiento de bacterias similares o de cepas cercanas.

ETA'S, enfermedades transmitidas por alimento.

Inhibición, suspensión transitoria de la actividad de un órgano o del organismo mediante la acción de un estímulo.

Inoculación, introducción de microorganismos vivos, muertos o atenuados, en un organismo de forma accidental o voluntaria.

Lantionina, son aminoácidos no proteínogénicos, es decir aquellos que forman parte de las proteínas y están codificados en el material genético.

LRB, *Lactobacillus rhamnosus*.

Metabolitos, productos intermedios y productos del metabolismo.

NMP, es una estrategia eficiente de estimación de densidades poblacionales especialmente cuando una evaluación cuantitativa de células individuales no es factible.

Patógeno, agente infeccioso que pueden provocar enfermedades a su huésped.

Polimerizar, unión de varias moléculas idénticas para formar otra mayor.

UFC (unidad formadora de colonias), es una unidad de medida que se emplea para la cuantificación de microorganismos.