



**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**PROYECTO DE TESIS PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

TEMA:

**EVALUACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DEL QUESO FRESCO CON LA
ADICIÓN DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS, PREBIÓTICOS Y
ANTIOXIDANTES ENCAPSULADOS.**

AUTOR:

ESPINOZA POSLIGUA VANESSA GABRIELA

TUTOR:

ING. CHRISTIAN SIMON RIVADENEIRA BARCIA Mgs. SC

MANTA-MANABÍ-ECUADOR

2019

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Los Honorables Miembros del tribunal Examinador luego del debido análisis y su cumplimiento de la Ley aprueban el informe de investigación sobre el tema:
“EVALUACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DEL QUESO FRESCO CON LA ADICIÓN DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS, PREBIÓTICOS Y ANTIOXIDANTES ENCAPSULADOS”.

Ing. Edison Greco Lavayen, Mg.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL _____

Ing. Roy Leonardo Barre Zambrano, Mg.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL _____

Ing. Aldo Eduardo Mendoza González, Mg

MIEMBRO DEL TRIBUNAL _____

CERTIFICACIÓN

En calidad de docente tutor de la Facultad de CIENCIAS AGROPECUARIAS de la Universidad Laica “Eloy Alfaro” de Manabí, certifico:

Haber dirigido y revisado el trabajo de titulación, cumpliendo el total de 400 horas, bajo la modalidad de tesis, cuyo tema del proyecto es “**Evaluación de la vida útil del queso fresco con la adición de bacterias ácido lácticas, prebióticos y antioxidantes encapsulados**”, el mismo que ha sido desarrollado de acuerdo a los lineamientos internos de la modalidad en mención y en apego al cumplimiento de los requisitos exigidos por el Reglamento de Régimen Académico, por tal motivo CERTIFICO, que el mencionado proyecto reúne los méritos académicos, científicos y formales, suficientes para ser sometido a la evaluación del tribunal de titulación que designe la autoridad competente.

La autoría del tema desarrollado, corresponde a la señora **Vanessa Gabriela Espinoza Posligna**, estudiante de la carrera de **Ingeniería Agroindustrial**, período académico 2018-2019, quien se encuentra apto para la sustentación de su trabajo de titulación.

Particular que certifico para los fines consiguientes, salvo disposición de Ley en contrario.

Manta, 05 de agosto de 2019.

Lo certifico,

Ing. CHRISTIAN SIMON RIVADENEIRA BARCIA Mgs. Sc.
Docente Tutor

DECLARACION DE AUTORIA

Yo, Espinoza Posligua Vanessa Gabriela, con C.I. 131336187-3, declaro que el presente trabajo de titulación, es de mi autoría, y que los resultados del mismo son auténticos, originales y personales, los textos constantes en el documento que proviene de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Manta, 05 de agosto 2019

Espinoza Posligua Vanessa Gabriela

C.I: 131336187-3

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Dios primeramente por haberme permitido terminar este proyecto sin él no hubiera sido posible.

A mi esposo y a mis hijos por apoyarme hasta el final y siempre tener una palabra de aliento para avanzar en este proyecto, por brindarme esa seguridad en todo momento.

Mis familiares que siempre me acompañaron en esta aventura que no sería fácil, por la ayuda que siempre me brindaron cada uno de ellos. Como no agradecerles a mis profesores que estuvieron desde mis primeros pasos de la universidad, y a mi tutor Ing. Cristhian Rivadeneira por su apoyo incondicional que siempre estuvieron dispuestos ayudarme, por enseñarme todos sus conocimientos. Gracias a todos por brindarme un granito de arena en todo este proceso de la Universidad

Vanessa E. P.

DEDICATORIA

Dedico este logro principalmente a Dios por la sabiduría y fortaleza que me ha dado para llegar a cumplir esta meta en mi vida profesional.

A mi hijo Santiago, a mi hija Amaia y a mi esposo Marlon, que son pilares fundamentales y fortaleza en mi vida, que en todo momento hicieron que confiara en mi misma, a mis familiares que me brindaron su apoyo incondicional en todo este proceso de mi vida universitaria

Este proyecto es un trabajo que fue echo con mucho empeño, con mucha perseverancia y sobre todo con mucho esfuerzo

Vanessa E. P.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la adición de bacterias ácido lácticas, prebióticos y antioxidantes encapsulados en la vida útil del queso fresco. Se manejó un Diseño Completamente al Azar con un arreglo factorial 2^{4+1} con tres réplicas por cada tratamiento. Para esto, se manipularon los factores. A: Bacteria Acidoláctica (*Lactococcus lactis* ssp, y *Lactobacillus casei*), B: Tipo de prebiótico (Fructosa e Inulina), C: Encapsulación (SI y No) y D: Ácido gálico (Libre y Encapsulado). Las variables determinadas en las muestras de queso fueron acidez titulable, pH, firmeza instrumental, pérdida de peso, conteo de unidades formadoras de colonias UFC de *Salmonella*, *Escherichia. coli* y *Listeria monocytogenes*. El ANOVA reveló alta significancia para los tratamientos y testigo, utilizando el test de Dunnett con un $p < 0.05$, indicó que estadísticamente el tratamiento T11 (*L. Casei* + fructosa encapsulados + ácido gálico encapsulado), presentó los mejores valores en los parámetros evaluados mostrando menor acidez con un valor de 0,22%; el pH evidenció valores de 5,03; el valor mostrado para firmeza fue de 1,97N, en cuanto a la pérdida de peso expuso la menor pérdida con 9,04% El análisis microbiológico evidenció los menores recuentos con 168 UFC/g de *Salmonella*, 89 UFC/g de *E. coli* y para *L. monocytogenes*. 74 UFC/g. De esta forma, en base a los resultados, se concluye que, los factores estudiados influyeron sobre las propiedades físico-químicas y antimicrobianas en la conservación de queso fresco a 25°C.

Palabras clave: Probióticos, Sustratos, Encapsulación, Ácido gálico, Conservación, Antimicrobiano

SUMMARY

The objective of the present study was to evaluate the effect of the addition of lactic acid bacteria, prebiotics and antioxidants encapsulated in the shelf life of fresh cheese. A Completely Random Design was handled with a factorial arrangement of $2^4 + 1$ with three replicas for each treatment. For this, the factors were manipulated. A: Acidolactic bacteria (*Lactococcus lactis* ssp, and *Lactobacillus casei*), B: Type of prebiotic (Fructose and Inulin), C: Encapsulation (SI and No) and D: Gallic acid (Free and Encapsulated). The variables determined in the cheese samples were titratable acidity, pH, instrumental firmness, weight loss, counting of colony forming units of Salmonella, Escherichia. coli and Listeria monocytogenes. The ANOVA revealed high significance for the treatments and control, using the Dunnett's test with $p < 0.05$, indicated that statistically the treatment T11 (encapsulated L. casei + fructose + gallic acid encapsulated), presented the best values in the parameters evaluated showing lower acidity with a value of 0.22%; the pH showed values of 5.03; the value shown for firmness was 1.97N, in terms of weight loss it exhibited the least loss with 9.04% The microbiological analysis showed the lowest counts with 168 CFU/g of *Salmonella*, 89 CFU/g of *E. coli* and for *L. monocytogenes*. 74 CFU/g. In this way, based on the results, it is concluded that the factors studied influenced the physico-chemical and antimicrobial properties in the conservation of fresh cheese at 25°C.

Key words: Probiotics, Substrates, Encapsulation, Gallic acid, Conservation, Antimicrobial

ÍNDICE

CAPÍTULO I.....	14
1.1. INTRODUCCIÓN	14
1.2. PROBLEMA	16
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	18
1.4. OBJETIVOS.....	20
1.4.1. Objetivos General	20
1.4.2. Objetivos Específicos.....	20
1.5. HIPÓTESIS.....	20
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	21
2.1. Queso.....	21
2.2. Encapsulación.....	22
2.3. Probióticos	22
2.3.1. <i>Lactobacillus Casei</i>	23
2.3.2. <i>Lactococcus lactis ssp. lactis</i>	23
2.4. Prebióticos	24
2.4.1. Inulina	25
2.4.2. Fructosa.....	25
2.5. Antioxidantes (Ácido gálico).....	26
2.6. Bacterias patógenas	27
2.6.1. <i>Escherichia coli</i>	27
2.6.2. <i>Salmonella spp</i>	28
2.6.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	28
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	30
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	30
3.1.1. Factores en estudio.....	30
3.1.2. Variables dependiente	31
3.1.3. Análisis estadístico.....	31
3.1.4. Tratamientos	32
3.2. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS	33
3.2.1. Preparación de recubrimiento comestible	33
3.2.2. Proceso de encapsulación.....	34

3.2.3.	Doble encapsulación.....	34
3.2.4.	Acidez titulable	34
3.2.5.	pH	34
3.2.6.	Firmeza instrumental.....	34
3.2.7.	Pérdida de peso	35
3.2.8.	Análisis microbiológicos.....	35
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		36
4.1.	Determinación de la acidez titulable	36
4.2.	pH38	
4.3.	Firmeza instrumental	40
4.4.	Pérdida de peso.....	44
4.5.	Análisis microbiológicos	46
CAPÍTULO V.		52
CONCLUSIONES.....		52
RECOMENDACIONES		53
BIBLIOGRAFIA.....		54
ANEXOS.....		65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Esquema de análisis de varianza (ANOVA).....	32
Tabla N°2. Tratamientos en estudio.....	33
Tabla N°3. Análisis de acidez titulable en muestras de queso fresco almacenado a 25°C.....	35
Tabla N°4. Análisis de pH en muestras de queso fresco almacenado a 25°C.....	37
Tabla N°5. Análisis de firmeza en muestras de queso fresco almacenado a 25°C.....	39
Tabla N°6. Análisis de pérdida de peso en muestras de queso fresco almacenado a 25°C.....	44
Tabla N°7. Conteo de <i>Salmonella spp</i> , en muestras de queso fresco almacenado a 25°C.....	45
Tabla N°8. Conteo de <i>E. coli</i> , en muestras de queso fresco almacenado a 25°C.....	46
Tabla N°8. Conteo de <i>L. monocytogenes</i> , en muestras de queso fresco almacenado a 25°C.....	47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1. Activacion de bacterias lacticas.....	65
Anexo N° 2. Preparacion de medios de cultivo	65
Anexo N° 3. Preparacion de recubrimiento comestible	65
Anexo N° 4. Preparacion de las muestras de queso	66
Anexo N° 5. Inmersion de las muestras de queso en los tratamientos	66
Anexo N° 6. Analisis realizados a las muestras de queso fresco	67
Anexo N° 7. ANOVA de acidez titulable en muestra de queso almacenado a 25°C	68
Anexo N° 7.1. Prueba de comparación Dunnett en variable (Acidez)	69
Anexo N° 8. ANOVA de pH en muestra de queso almacenado a 25°C	72
Anexo N° 8.1. Prueba de comparación Dunnett en variable (pH)	73
Anexo N° 9. ANOVA de FIRMEZA en muestras de queso almacenado a 25°C.....	76
Anexo N° 9.1. Prueba de comparación Dunnett en variable (Firmeza)	77
Anexo N° 10. ANOVA de PERDIDA DE PESO en muestras de queso almacenado a 25°C	80
Anexo N° 10.1. Prueba de comparación Dunnett en variable (Pérdida de Peso).....	81

CAPÍTULO I.

1.1. INTRODUCCIÓN

Actualmente se están presentando enfermedades por el consumo de productos fermentados artesanales por microorganismos que proliferan en el proceso de elaboración, por la falta de medidas preventivas sanitarias e inocuidad en los puntos críticos de transformación del producto, los cuales se contaminan por patógenos como *E. coli*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes*, produciendo las principales enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) y constituyendo un problema sanitario y económico de relevancia mundial (Ruiz *et al.* 2017).

En concordancia a la seguridad e inocuidad alimentaria, actualmente se están aplicando tecnologías que trabajan en la reducción de este tipo de contaminación en los alimentos, una herramienta que se usa hoy en día es la encapsulación, aplicado como recubrimiento de pared, generando estabilidad, biodisponibilidad y conservación de viabilidad en microorganismos benéficos permitiendo inhibir patógenos en alimentos (Rodríguez *et al.* 2016).

Uno de los microorganismos benéficos son las bacterias ácido lácticas, que se utilizan para la elaboración de diferentes variedades de productos fermentados artesanales las bacterias ácido lácticas son adicionadas intencionalmente como cultivos indicadores y son utilizados como probióticos que, al ser ingeridos, tiene efectos benéficos para el sistema digestivo (Ramírez 2005).

Dentro de la presente investigación se encapsuló dos tipos de bacterias ácido lácticas, siendo *L. casei*, tipo de bacteria probiótica que previene trastornos intestinales (Silva 2018) y crecen a una temperatura óptima de 37°C (Castro *et al.* 2009) y la *L. lactis ssp*, que tiene propiedades biopreservadoras y algunas cepas son capaces de producir nisina, las cuales son muy utilizadas en industrias

alimentarias; (Salazar *et al.* 2003) y dos prebióticos: la fructosa, como azúcar simple y la inulina también, como carbohidrato de almacenamiento, ambos de cadena corta, reconocidos como oligosacáridos, no digeribles (Pérez *et al.* 2009).

Una vez encapsulado se aplicó los tratamientos a los patógenos: *E. coli*, el cual es la causa más frecuente de infecciones bacterianas incluyendo las del tracto urinario (Geraldine *et al.* 2017) la *Salmonella spp*, genera enfermedades comunes infecciosas y que se presenta en cualquier edad (González *et al.* 2017) y la *Listeria monocytogenes*, como patógeno transmitido por alimentos, capaz de sobrevivir a una amplia condición ambiental.

1.2. PROBLEMA

La leche constituye un excelente sustrato para la proliferación de microorganismos debido a su alto contenido de nutrientes, por ello, es de importancia fundamental determinar la calidad higiénica y sanitaria de la leche y sus derivados, entre ellos el queso, por ser uno de los productos de mayor consumo.

Debido a que el proceso artesanal de elaboración de queso se caracteriza por el empleo de leche cruda, utensilios rústicos, un entorno rural y la falta de tecnología para llevar a cabo un control estricto de los parámetros del proceso, es por lo que los quesos artesanales son asociados con lo sucio y representan un riesgo para la salud (Vasek *et al.*, 2004).

Los quesos frescos elaborados a partir de leche que no son sometidos a tratamientos rigurosos como la pasteurización antes de ser consumidos, se constituyen en una fuente potencial de transmisión de patógenos, causantes de enfermedades como *Salmonellosis*, *Listeriosis*, enfermedades entéricas y en general enfermedades caracterizadas por fiebre, diarrea y vómito (Contreras *et al.*, 2006). *Salmonella spp* es una de las bacterias de mayor importancia en quesos, ya que llega a estos alimentos por contaminación a partir de las manos del ordeñador, por heces de los animales, por contaminación del equipo de ordeño, por aguas contaminadas o por una deficiente cocción en la materia prima (leche) (Muñoz, 1996). De otro lado, estudios realizados por (Muñoz, 1999) han demostrado la presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos siendo este un microorganismo emergente que ha cobrado especial importancia en los últimos años debido a su tasa de mortalidad (alrededor del 30%).

Algunos investigadores han reportado presencia de *E. coli* en muestras de queso (Araújo *et al.*, 2002; Leuschner & Boughtflower, 2002) encontraron microorganismos patógenos como *E. coli*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* en quesos blancos blandos elaborados con leche cruda. (Aray, 2002), reporta una incidencia de *E. coli* de 20% en 30 muestras de queso telita comercializado en mercados

populares de la ciudad de Caracas, (Márquez *et al.*, 2007) reportaron 160 muestras de queso con presencia de *E. coli* en queso telita en el estado de Bolívar, Venezuela.

Son diversos los factores que favorecen el desarrollo de este microorganismo en este producto dentro de las que se incluyen: el origen de la leche, los utensilios utilizados durante la elaboración de este, la presencia de biopelículas dentro de la planta procesadora de alimentos, condiciones de microaerofilia en los quesos, entre otros. Es importante señalar que los quesos frescos han sido asociados en el mundo entero como el primer alimento implicado en brotes de listeriosis; los quesos que se han visto implicados en brotes incluyen: queso tipo mexicano, brie, cheddar y feta (Albarracín *et al.*, 2006).

Los consumidores aprecian los quesos artesanos por sus singulares características de sabor y aroma, que es generalmente atribuida a la actividad metabólica de la microbiota autóctona presente en la leche cruda (Beuvier *et al.*, 1997). La utilización de cultivos lácticos comerciales ayuda a llevar a cabo el proceso de acidificación, pero generalmente se asocian con otras propiedades organolépticas, pues esos microorganismos han sido seleccionados de quesos de otras regiones. Además, el uso de cultivos lácticos industriales en sustitución de la microbiota autóctona, podría llevar a la pérdida de las cepas autóctonas en el largo plazo (González *et al.*, 2003).

1.3. JUSTIFICACIÓN

Los alimentos listos para el consumo tienen un alto riesgo de asociarse con enfermedades de transmisión alimentaria que facilitan el crecimiento de microorganismos patógenos: leches, derivados lácteos con gran contenido de grasas, como quesos frescos, mantequillas, cremas, crustáceos cocidos, productos de mar crudos y ahumados, vegetales, frutas ácidas y otros (FDA, 2001).

Los probióticos, son microorganismos vivos, los cuales producen efectos benéficos en la salud de los consumidores. Los beneficios observados han llevado a incrementar la proporción de bacterias probióticas, tales como *Lactobacillus sp* en productos lácteos como el yogurt. Para lograr los efectos benéficos, los probióticos deben ser metabólicamente estables y activos, tanto en el producto alimenticio, como en el huésped (Kailasapathy & Chin, 2000). Se ha indicado que la viabilidad de bacterias probióticas en el yogurt resulta ser menor al umbral terapéutico (10^8 UFC/mL), este umbral corresponde a la cantidad necesaria de microorganismos probióticos requerida para que los efectos benéficos sean percibidos por el huésped (López-Rubio *et al.*, 2006). Se han realizados estudios en cuanto al control de microorganismos patógenos en el queso con BAL *L. lactis* (Coelho *et al.*, 2014).

La supervivencia de microorganismo probióticos depende de las condiciones de estrés ambiental tales como: producción de peróxidos, producción de ácido láctico y acético, disponibilidad de nutrientes y temperatura de incubación (Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014). Por ende, una técnica que permita aumentar o mantener la viabilidad de microorganismos probióticos resulta de gran interés. La microencapsulación de células bacterianas ha ganado atención con el fin de potenciar la viabilidad de bacterias probióticas en productos ácidos como el queso y yogurt (Krasaekoopt *et al.*, 2003).

La microencapsulación, es una técnica que le permite a un material sensible ser empacado y protegido de las condiciones ambientales adversas. Diversos materiales de interés biológico han sido microencapsulados, desde pequeñas

moléculas y proteínas hasta células bacterianas, levaduras y animales (Borgogna *et al.*, 2010). Por tanto, lo mencionando anteriormente, la microencapsulación puede ser utilizada para disminuir las pérdidas celulares durante el procesamiento de alimentos, así como reforzar la viabilidad de las bacterias de interés (Capela *et al.*, 2006).

El presente trabajo propone y estructura un estudio sobre la vida útil del queso fresco adicionándole probióticos, prebióticos y antioxidantes libres y encapsulados analizando el comportamiento del producto en cuanto a sus características físico-químicas y antimicrobianas. De esta forma se dará el ejemplo necesario para estudiar el comportamiento de los materiales utilizados en esta investigación, su efecto en la conservación de alimentos y su potencial uso como componentes beneficiosos para la salud de las personas.

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivos General

Evaluar el efecto de la adición de bacterias ácido lácticas, prebióticos y antioxidantes encapsulados en la vida útil del queso fresco.

1.4.2. Objetivos Específicos

1. Valorar el efecto de los tratamientos en las propiedades físico-químicas del queso almacenado a 25 °C.
2. Evaluar el efecto antimicrobiano de bacterias ácido lácticas, prebióticos y antioxidantes encapsulados sobre *Salmonella spp.*, *E. coli* y *L. monocytogenes*.
3. Determinar el mejor tratamiento en la conservación de queso mediante análisis microbiológico.

1.5. HIPÓTESIS

La adición de bacterias ácido lácticas, prebióticos y antioxidantes encapsulados podría ser una buena alternativa en la conservación de queso fresco.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Queso

El queso blanco fresco es un queso artesanal ecuatoriano con buena aceptación entre los consumidores ecuatorianos (Santacruz & castro 2018). Queso es el producto elaborado de la cuajada de leche estandarizada de vaca o de otras especies animales, con o sin adición de crema, obtenida de la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior, por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo por su proceso ser: fresco, madurado o procesado (Castro-Castillo *et al.*, 2013).

Los quesos frescos son aquellos que además de cumplir con la descripción general de queso se caracterizan por su alto contenido de humedad, y por no tener corteza o tener corteza muy fina, pudiendo o no adicionarles aditivos e ingredientes opcionales, son de corta maduración y enfrentan algunos aspectos negativos: son altamente perecederos, con una vida corta de anaquel y se les atribuye una baja calidad microbiológica por ser elaborados con leche cruda, considerándolos como un producto de riesgo al consumidor por la transmisión de enfermedades y riesgos de intoxicaciones alimentarias (Rodríguez *et al.*, 2009).

La elaboración de productos lácteos es una actividad importante dentro de la industria alimentaria comprendiendo la producción tradicional de quesos (Del Valle, 2002). Sin embargo, las condiciones de procesamiento y comercialización no cumplen con las regulaciones ecuatorianas, lo que lleva a la presencia de microorganismos patógenos (Zambrano, 2014).

2.2. Encapsulación

La encapsulación es un proceso aplicado para proteger, mediante un material de recubrimiento o material pared, la estabilidad, biodisponibilidad y conservación de los componentes bioactivos y así mismo la viabilidad en microorganismos (Khem *et al.*, 2016). Para la selección de un adecuado material pared se deberán considerar aspectos como grado alimenticio, costos y propiedades físico-químicas como la solubilidad, peso molecular, transición vítrea / fusión, cristalinidad, difusividad, formación de películas y propiedades emulsionantes (Gharsallaoui *et al.*, 2007) biodegradabilidad y capacidad para formar una barrera entre el interior de la cápsula y sus alrededores. Se deberán considerar adicionalmente, las propiedades de la matriz alimenticia a la cual se incorporarán los encapsulados (Stoll *et al.*, 2015). Existen numerosas técnicas como la atomización, coacervación compleja, polimerización interfacial e inclusión molecular, liofilización, emulsificación, liposomas y gelificación iónica, que son empleadas para la encapsulación de microorganismos probióticos (Xu *et al.*, 2016).

2.3. Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que al ser suministrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del huésped (FAO/WHO 2002). Los microorganismos deben cumplir con características específicas para que sean considerados como probióticos; algunas características son: resistencia al ácido o a la bilis, adhesión a las células intestinales presentes en los humanos, ser seguros en el momento del consumo, inhibir bacterias patógenas, poder colonizar el intestino y la sustentación de estudios que comprueben los posibles efectos benéficos en la salud (Saarela *et al.*, 2000).

La atribución de efectos benéficos a las especies probióticas ha generado un creciente interés para su aplicación en alimentos (Liu *et al.*, 2015). Se atribuye a ellos la mejora en el equilibrio intestinal, al inhibir mediante diversos mecanismos el crecimiento de varios grupos microbianos potencialmente patógenos. Esto sucede

por la capacidad de algunas especies para interferir con la adhesión de especies patógenas a las superficies de las células intestinales; este efecto es atribuido a la producción de ácidos orgánicos y a la secreción de compuestos antimicrobianos, como las bacteriocinas (Picard *et al.*, 2005).

2.3.1. *Lactobacillus Casei*

El género *Lactobacillus* comprende a bacilos Gram positivos, no esporulados, catalasa negativos, anaerobios facultativos, que comúnmente producen ácido láctico como principal metabolito de la fermentación de hidratos de carbono. Generalmente son aislados a partir de leches fermentadas y del tracto gastrointestinal de humanos y animales (Curry & Crow, 2002). Las principales especies de lactobacilos aislados de tracto intestinal humano incluyen *Lb. gasseri*, *Lb. crispatus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. salivarius*, *Lb. reuteri*, *Lb. casei*, *Lb. ruminis*, *Lb. itulinus*, *Lb. plantarum* y *Lb. brevis*. *Lb. acidophilus* rara vez se aísla de ese origen (Matsuzaki, 2003).

Están presente naturalmente en las leches fermentadas, carne, vegetales fermentados, boca e intestino humano y en el ambiente. Se caracteriza por ser Gram positivo, sin motilidad y no formar esporas, posee un metabolismo estrictamente fermentativo con ácido láctico como producto final (Pardo *et al.* 2015).

2.3.2. *Lactococcus lactis ssp. lactis*

Lactococcus lactis es una especie de bacteria no esporulante, no mótil, Gram-positiva usada extensamente en la producción de manteca y queso (Madigan & Martinko, 2005), *L. lactis* son cocos que se agrupan en pares y en cadenas cortas, con una longitud comprendida entre 0,5 a 1,5 μm .

L. lactis es una bacteria con un metabolismo homofermentativo, y produce ácido L-(+)-láctico como subproducto metabólico a partir de diversos azúcares como la

lactosa o la glucosa. Asimismo, se ha descubierto que puede producir ácido D-(-)-láctico al ser cultivado en condiciones de pH bajo. Ésta habilidad para producir ácido láctico es una de las razones por las que *L. lactis* es uno de los microorganismos más importantes en la industria láctea. *L. lactis*, debido a su extenso e histórico uso en la industria alimentaria, tiene un estatus GRAS (Generalmente reconocido como seguro, Generally Regarded as Safe) (FDA, 2001).

2.4. Prebióticos

Los prebióticos son definidos como ingredientes alimenticios no digeribles de los alimentos que afectan de manera positiva al huésped, estimulando de forma selectiva el crecimiento y/o la actividad metabólica de un número limitado de cepas de bacterias colónicas (Rodríguez *et al.*, 2017). Estos compuestos se caracterizan por ser moléculas de gran tamaño que no pueden ser digeridas por las enzimas digestivas del tracto gastrointestinal alto, alcanzando el intestino grueso donde son degradados por la microflora bacteriana, principalmente por las *Bifidobacterias* y *Lactobacilos*, generando de esta forma una biomasa bacteriana saludable y un pH óptimo (Ashwell, 2005).

Para que un ingrediente alimenticio sea considerado prebiótico debe cumplir con los siguientes criterios: • No debe ser hidrolizado o absorbido en la parte alta del tracto digestivo; • Debe ser fermentado selectivamente por una o un número limitado de bacterias potencialmente benéficas del colon, por ejemplo *bifidobacterias* y *lactobacilos*; • Debe ser capaz de alterar la microflora colónica tornándola saludable, por ejemplo reduciendo el número de organismos putrefactivos e incrementado las especies sacarolíticas (Kolida, *et al.*, 2002). En la actualidad los oligosacáridos más estudiados y reconocidos con actividad prebiótica son los fructanos. Este es un término genérico empleado para describir a todos los oligo o polisacáridos de origen vegetal, y se refiere a cualquier carbohidrato el cual una o más uniones fructosil-fructosa predominan dentro de las uniones glucosídicas (Olagnero *et al.*, 2007).

2.4.1. Inulina

La inulina es un carbohidrato de reserva energética presente en muchas especies de plantas; es el nombre de una familia de glúcidos complejos (polisacáridos), cuya estructura está formada por una molécula de glucosa ligada a múltiples unidades de fructosa. Es un ingrediente natural de los alimentos y se encuentra en más de 36000 especies de plantas que almacenan carbohidratos que contienen inulina (Abou-Arab *et al.*, 2011).

La inulina tipo fructano, es uno de los mejores oligosacáridos utilizados por su efecto sobre las bifidobacterias intestinales y es considerado un sustrato prebiótico importante. (Gaafar *et al.*, 2010). Es un oligosacárido no digerible que estimula el crecimiento de un número limitado de bacterias en el colon, así como contribuye con la atenuación de la glucosa en sangre, homeostasis de lípidos, así como mejorar las características reológicas de los alimentos (Taha *et al.*, 2007).

En la actualidad, la presencia de ciertas cantidades de inulina o sus derivados en la formulación de un producto alimenticio es condición suficiente para que dicho producto pueda ser considerado como "alimento funcional" (Roberfroid, 2007), que por definición sería aquel que contiene un componente o nutriente con actividad selectiva beneficiosa, lo que le confiere un efecto fisiológico adicional a su valor nutricional (Silveira-Rodríguez, 2003).

Como prebiótico, tienen un gran aporte de fibra dietética, bajo valor calórico, hipoglucemiante, mejorador de la biodisponibilidad de calcio y magnesio. Se presentan evidencias promisorias de su actuación en la regulación de parámetros lipídicos, reducción del riesgo de cáncer, refuerzo de la respuesta inmune y protección contra desórdenes intestinales (Benítez-Cortés *et al.*, 2015).

2.4.2. Fructosa

La fructosa es un monosacárido de 6 carbonos que se encuentra de forma natural en alimentos como frutas, verduras y miel. Durante miles de años, los seres

humanos consumieron alrededor de 15 a 24 g/día de fructosa (4-5% de las calorías totales en relación a 2.000 kcal/día promedio), provenientes principalmente de frutas y verduras (Riveros *et al.*, 2014).

Es un azúcar simple con fórmula química $C_6H_{12}O_6$, similar a la de la glucosa; ambas se reducen fácilmente a sorbitol tanto in vitro como in vivo; la fructosa difiere por la presencia de un grupo ceto unido al carbono 2 de la molécula, en tanto la glucosa presenta un grupo aldehído en el carbono 1 (Le KA, 2006). Los productos principales de su metabolismo en la vía glucolítica son: glucosa, glucógeno, lactato y piruvato; otros en menor cantidad son oxidados a bióxido de carbono, cuerpos cetónicos o convertidos a triacilglicerol (Elliott *et al.*, 2002; Mayes, 1993). Al igual que la sacarosa, se encuentra en el grupo de edulcorantes nutritivos reconocidos por la FDA (Food and Drug Administration).

2.5. Antioxidantes (Ácido gálico)

El ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) es una sustancia orgánica que se encuentra en muchas plantas, ya sea como molécula libre o como parte de una molécula de ácido tánico. También sirve como un precursor para la producción comercial de un medicamento antimicrobiano trimetoprim, un galato de propilo conservante de alimentos y algunos colorantes (Pourrat *et al.*, 1987). Además de esto, el ácido gálico posee una amplia gama de actividades biológicas, como antioxidantes, antibacterianos, antivirales, analgésicos, etc. Como ácido gálico antioxidante actúa como un agente antiapoptótico y ayuda a proteger las células humanas contra el daño oxidativo (Treviño-Cueto *et al.*, 2006).

El ácido gálico también muestra actividad citotóxica contra las células cancerosas, sin dañar las células normales (Mondal *et al.*, 2001). Debido a sus varias propiedades interesantes y aplicaciones comerciales, el ácido gálico es un compuesto de gran interés para las industrias farmacéutica, química y alimentaria, (Bajpai & Patil, 2008).

2.6. Bacterias patógenas

2.6.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*. (Bryan, Youngster, & McAdam, 2015).

Escherichia coli pertenece a la flora normal del intestino humano, de ésta se conocen hasta el momento seis serotipos que pueden ser patógenos y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea, síndrome urémico hemolítico, colitis hemorrágica y cuadros de disentería (Cicuta *et al.*, 2006). Este microorganismo se clasifica en base al grado de patogenicidad y manifestaciones clínicas en: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa, (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC) (Koneman, 2008).

La *E. coli* produce la toxina Shiga, esta puede desarrollarse a temperaturas entre 7°C y 50°C, con una temperatura óptima de 37 °C. También puede proliferar en alimentos ácidos, hasta a un pH de 4,4, y en alimentos con una actividad de agua (aw) mínima de 0,95 (OMS 2018).

La *E. coli* se transmite a los alimentos por contaminación cruzada producida en los hogares y restaurantes, durante la preparación de estos (con carne vacuno y otros productos cárnicos, superficies) por el uso de utensilios de cocina contaminados, además es causa de infecciones, los alimentos como son las hamburguesas poco cocidas, el salami curado, la sidra fresca no pasteurizada, el yogur y el queso elaborado por la fermentación de la leche cruda (OMS 2018).

2.6.2. *Salmonella spp*

Los microorganismos del género *Salmonella* son bacilos, Gram negativos, anaerobios facultativos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Su tamaño oscila de 0,3 a 1 um x 1,0 a 6,0 um. Son móviles debido a la presencia de flagelos peritricos, a excepción de *S. gallinarum* y *S. pullorum*. Para que su crecimiento sea óptimo, *Salmonella* necesita de un pH entre 6,6 y 8,2, las temperaturas más bajas a las que se ha señalado su existencia decrecimiento son de 5,3 a 6,2 grados centígrados, son incapaces de tolerar elevadas concentraciones de sal. *Salmonella* es destruida a las temperaturas de pasteurización de la leche (Linder, 1995).

La *Salmonella* es una enterobacteria del tracto gastrointestinal de animales y seres humanos, caracterizada por un amplio rango de hospedadores. Son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporoformadores y Flagelados. Se pueden inactivar a pH por debajo de 5 y a temperaturas que excedan los 60 °C. (Beltrán *et al.*, 2012). *Salmonella spp.* se considera como "Patógeno Universal" debido a que cuenta con mecanismos de adaptación a diversas condiciones ambientales y por tanto posee una amplia distribución en el medio (Koneman, 2008).

2.6.3. *Listeria monocytogenes*

El género *Listeria* comprende seis especies, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y *L. grayi*; la presencia de cualquier especie se considera como indicador de una higiene deficiente (McLauchlin, 1997). Es un bacilo Gram positivo, no esporulado, anaerobio facultativo, produce β -hemólisis en agar sangre de diversos animales, oxidasa negativa, crece entre 2,5 y 42°C, motilidad positiva (20-25°C) tipo "tumbling" (Brackett, 1998). Está presente comúnmente en aguas de desecho, fluviales, afluentes y hasta en plantas de tratamiento de aguas servidas, en el suelo, en el ambiente; en aves, pescado, moluscos, crustáceos, insectos, leche, productos cárnicos, frutas y vegetales (Ortiz, 1993). La listeriosis, es diferenciada por síntomas y por signos severos en el sistema nervioso, se presenta en población vulnerable y en menor medida, el síndrome de tipo

gastrointestinal, leve auto limitante, que puede afectar a la población en general (Herrera & Suárez 2012).

La listeriosis perinatal es siempre de carácter invasivo. En el adulto la listeriosis puede ser tanto invasiva como no invasiva. La listeriosis invasiva se da en los casos en los cuales la infección inicial en el tejido intestinal se disemina hacia otros tejidos, como útero grávido, sistema nervioso central, sangre o combinaciones de éstos, y se asocia con individuos inmunocomprometidos (Rufo *et al.* 2016).

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Investigación de Alimentos, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí (ULEAM), ubicado en la ciudad de Manta, Av. Circunvalación - Vía a San Mateo (Latitud 0°57' S y de Longitud 80°42 W y Altitud aproximada de 20 m.s.n.m). en el periodo 2018-2019.

El trabajo de investigación se realizó utilizando como variable de diseño dos tipos de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus casei* y *Lactococcus lactis*) midiendo el efecto en las características físico-químicas y antimicrobianas en queso fresco almacenado a 25 °C durante 30 días. Las variables dependientes se analizaron cada 10 días.

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el presente trabajo de investigación se utilizará un diseño completamente al azar con un arreglo completamente factorial 2^{4+1} , dando como resultado 16 tratamientos más 1 control.

3.1.1. Factores en estudio

A. Bacteria ácido láctica

- ✓ A1 *Lactococcus lactis ssp*
- ✓ A2 *Lactobacillus casei*

B. Tipo de prebióticos

- ✓ B1 Inulina
- ✓ B2 Fructosa

C. Encapsulación

- ✓ C1 Si
- ✓ C2 No

D. Acido gálico

- ✓ D1 Encapsulado
- ✓ D2 Libre

3.1.2. Variables dependiente

- ❖ Acidez titulable
- ❖ pH
- ❖ Firmeza instrumental
- ❖ Pérdida de peso
- ❖ Conteo de UFC (*Salmonella spp*, *E. coli* y *L. Monocytogenes*) presentes en el queso.

3.1.3. Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) ($P < 0,05$), el cual se muestra a continuación en la tabla 1. Las medias de los tratamientos se analizaron de acuerdo al test de Dunnett ($P < 0,05$) para determinar la diferencia estadística entre los tratamientos. Para procesar los datos obtenidos se utilizó el paquete estadístico Infostat 2018, versión libre, todos los datos fueron analizados por triplicado.

Tabla 1. Esquema de análisis de varianza (ANOVA)

Fuente de variación		G.L
Total	(t*r-1)	50
Tratamientos	(t-1)	16
Repetición	r-1	2
Factor A	FA-1	1
Factor B	FB-1	1
Factor C	FC-1	1
Factor D	FD-1	1
Interacción (AxB)	(FAxFB)	1
Interacción (AxC)	(FAxFC)	1
Interacción (AxD)	(FAxFD)	1
Interacción (AxBxCxD)	(FCxFD)	1
Control	C-1	0
Error experimental		24

Elaborado por: Espinoza V. 2019

$$\text{Coeficiente de variación (\%)} \text{ CV} = \frac{\sqrt{\text{CM ERROR}}}{\bar{x}} * 10$$

3.1.4. Tratamientos

En la tabla 2, se muestran los tratamientos que se utilizaron en esta investigación, en total fueron 16 tratamientos resultantes de las combinaciones entre los factores de estudio tales como; A: Tipo de probiótico, B: Tipo de prebiótico, C: Encapsulación D: Presencia de ácido gálico.

Tabla N° 2. Tratamientos en estudio

N°	Tratamientos	Probiótico	Prebióticos	Encapsulación	Ácido gálico encapsulado
1	A1B1C1D1	<i>L. lactis spp</i>	Inulina	Si	Si
2	A1B1C1D2	<i>L. lactis spp</i>	Inulina	Si	No
3	A1B2C1D1	<i>L. lactis spp</i>	Fructosa	Si	Si
4	A1B2C1D2	<i>L. lactis spp</i>	Fructosa	Si	No
5	A1B1C2D1	<i>L. lactis spp</i>	Inulina	No	Si
6	A1B1C2D2	<i>L. lactis spp</i>	Inulina	No	No
7	A1B2C2D1	<i>L. lactis spp</i>	Fructosa	No	Si
8	A1B2C2D2	<i>L. lactis spp</i>	Fructosa	No	No
9	A2B1C1D1	<i>L. Casei</i>	Inulina	Si	Si
10	A2B1C1D2	<i>L. Casei</i>	Inulina	Si	No
11	A2B2C1D1	<i>L. Casei</i>	Fructosa	Si	Si
12	A2B2C1D2	<i>L. Casei</i>	Fructosa	Si	No
13	A2B1C2D1	<i>L. Casei</i>	Inulina	No	Si
14	A2B1C2D2	<i>L. Casei</i>	Inulina	No	No
15	A2B2C2D1	<i>L. Casei</i>	Fructosa	No	Si
16	A2B2C2D2	<i>L. Casei</i>	Fructosa	No	No
17	CONRTROL	-	-	-	-

Elaborado por: Espinoza V. 2019

3.2. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS

3.2.1. Preparación de recubrimiento comestible

La preparación del recubrimiento comestible a base de almidón de yuca se realizó de acuerdo con el método propuesto por Santacruz, Rivadeneira & Castro (2015).

3.2.2. Proceso de encapsulación

La encapsulación de BAL se realizó mediante aspersión utilizando un compresor y una pistola de aspersión.

3.2.3. Doble encapsulación

Esta metodología se utilizó con el fin de contrarrestar la acción de los compuestos fenólicos sobre las BAL encapsuladas. Para la doble encapsulación se utilizaron las metodologías propuestas por (Wang, Rojas, & Papadopoulos, 2012).

3.2.4. Acidez titulable

Se realizó la cuantificación de acidez titulable mediante la valoración con solución de NaOH 0,01 M de acuerdo al método de la AOAC (1984).

3.2.5. pH

Para determinar el pH se utilizó el método de potenciómetro de la A.O.A.C. (método A.O.A.C 981,12, A.O.A.C 1980).

3.2.6. Firmeza instrumental

Para medir la firmeza instrumental por penetración se utilizó un Texturómetro, se realizó de acuerdo a la metodología de Castro *et al.* (2017).

3.2.7. Pérdida de peso

Para determinar la pérdida de peso se registró el peso inicial y a lo largo del almacenamiento mediante una balanza digital (Sartorius TE6101, Alemania). Los resultados fueron expresados como porcentaje de pérdida de peso con respecto al peso inicial (Rodríguez Villanueva, 2007).

3.2.8. Análisis microbiológicos

Los análisis microbiológicos se realizaron evaluando la presencia de *Salmonella* spp., mediante el método (NTE INEN 1529-15:2009); *E. coli* mediante el método (INEN 1 529-8 1990-02) y *L. Monocytogenes* usando el método (ISO 11290-1:1996).

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de la acidez titulable

En la tabla 3, se muestra los resultados del análisis de acidez titulable en las muestras de queso indicando que para los días 0 y 20 no existió diferencia estadística significativa, iniciando con un valor de 0,18 % en ácido láctico, aumentando durante los 30 días de conservación del producto, siendo el T11 el que reporto menor valor de acidez con 0,22% en contraste con la muestra del control el cual presento el mayor valor con 0,55% en el día 30 del periodo de estudio.

Tabla 3. Análisis de acidez titulable en muestras de queso fresco almacenado a 25°C.

Tratamientos	Código	Día 0	Día 10	Día 20	Día 30
T1	A1B1C1D1	0,18	0,20	0,24	0,27
T2	A1B1C1D2	0,18	0,21	0,25	0,30
T3	A1B2C1D1	0,18	0,19	0,21	0,25
T4	A1B2C1D2	0,18	0,22	0,26	0,34
T5	A1B1C2D1	0,18	0,21	0,24	0,31
T6	A1B1C2D2	0,18	0,24	0,29	0,42
T7	A1B2C2D1	0,18	0,23	0,25	0,33
T8	A1B2C2D2	0,18	0,24	0,27	0,35
T9	A2B1C1D1	0,18	0,19	0,22	0,29
T10	A2B1C1D2	0,18	0,21	0,25	0,33
T11	A2B2C1D1	0,18	0,18	0,19	0,22
T12	A2B2C1D2	0,18	0,20	0,24	0,33
T13	A2B1C2D1	0,18	0,22	0,27	0,36
T14	A2B1C2D2	0,18	0,25	0,31	0,44
T15	A2B2C2D1	0,18	0,23	0,27	0,41
T16	A2B2C2D2	0,18	0,25	0,32	0,49
T17	CONRTROL	0,18	0,21	0,36	0,55

Elaborado por: Espinoza V. 2019

En cuanto a la prueba estadística de Dunnett y ANOVA, los resultados del análisis de acidez muestran diferencia estadística significativa $P \leq 0.05$, en el día 10 de

almacenamiento para los tratamientos y el control (Anexo 8 y Anexo 8.1), reportando el valor más bajo para el tratamiento T11 (0,18 %) en contraste con los mayores valores reportados para el T1 y T16 con 0,55% respectivamente.

En el día 20 los resultados mostraron diferencia numérica, pero no se reportó diferencia estadística significativa $P \leq 0.05$.

Los resultados reportados en el día 30 del periodo de estudio (Tabla 3) indican que existió diferencia estadística significativa $P \leq 0.05$, para los tratamientos y la muestra de control, siendo el T11 el que mostro menor valor de acidez titulable con 0.22% en contraste con la muestra de control el cual reporto la mayor acidez con un valor de 0,49%.

Los resultados encontrados en esta investigación concuerdan con los reportados por Para, Álvarez, Yanamango y Barrientos (2011) los cuales indicaron que en el estudio que realizaron si existió diferencia en todos los tratamientos, y que es esto se debe a la población inicial de *Lactobacillus casei* presente en el queso fresco.

La acidez, en el queso es un factor que no sólo tiene incidencia sobre el sabor, sino también directamente en los cambios que experimenta la red de proteína (cuajada) del queso, teniendo ésta una correlación directa en los fenómenos de sinéresis (es decir; a mayor acidez, mayor sinéresis) y textura final (Pinho et al., 2004). Además de la acidez, la sinéresis está afectada también por circunstancias propias del proceso de elaboración y por la presencia de calcio libre, el cual provoca la unión de la caseína en la red protéica de la cuajada (Walstra, 1990).

La actividad lipolítica y proteolítica tiene influencia en la formación de compuestos de sabor y aroma típicos de variedades de quesos madurados, como son los ácidos grasos libres y transformaciones enzimáticas de algunos aminoácidos produciendo amoniaco, ácidos orgánicos (ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico) y dióxido de carbono (Mathot et al., 2009; Blanco et al., 2006).

La variabilidad encontrada en el parámetro de acidez es un reflejo fiel de las condiciones artesanales con que es elaborado este producto, principalmente por dos motivos. Primero, la fermentación se realiza a temperatura ambiente, la cual, por su naturaleza, experimenta fluctuaciones que pueden incidir en la actividad metabólica de los cultivos. Segundo, puede haber pequeñas variaciones en la cantidad del cultivo iniciador porque su dosificación se realiza de manera empírica (Villalobos y Castro 2009).

4.2. pH

Los resultados de pH mostrados en la tabla 4, exponen los resultados en las muestras evaluadas de queso fresco, evidenciando que existió una disminución del valor de pH en todos los tratamientos y muestras de control durante los 30 días de estudio.

Tabla 4. Análisis de pH en muestras de queso fresco almacenado a 25°C.

Tratamientos	Código	Día 0	Día 10	Día 20	Día 30
T1	A1B1C1D1	5,13	5,12	5,08	5,01
T2	A1B1C1D2	5,13	5,10	5,05	4,95
T3	A1B2C1D1	5,13	5,12	5,06	4,97
T4	A1B2C1D2	5,13	5,08	5,02	4,94
T5	A1B1C2D1	5,13	5,10	5,06	4,95
T6	A1B1C2D2	5,13	5,04	4,98	4,91
T7	A1B2C2D1	5,13	5,06	5,00	4,93
T8	A1B2C2D2	5,13	5,04	4,96	4,86
T9	A2B1C1D1	5,13	5,11	5,07	4,94
T10	A2B1C1D2	5,13	5,10	5,05	4,96
T11	A2B2C1D1	5,13	5,12	5,08	5,03
T12	A2B2C1D2	5,13	5,10	5,04	4,75
T13	A2B1C2D1	5,13	5,06	4,99	4,51
T14	A2B1C2D2	5,13	4,32	4,20	4,11
T15	A2B2C2D1	5,13	4,40	4,25	4,14
T16	A2B2C2D2	5,13	4,30	4,24	4,15
T17	CONRTROL	5,13	4,23	4,18	4,01

Elaborado por: Espinoza V. 2019

Con respecto a el ANOVA y a la prueba estadística de Dunnet realizada para la variable pH, los resultados del análisis indican diferencia estadística significativa $P \leq 0.05$, entre los tratamientos y también con referencia a la muestra de control en el día 10 de almacenamiento (Anexo 9 y Anexo 9.1), reportando el valor más bajo para el control con un valor de 4.23 en contraste con el mayor valore reportado para los tratamientos T1, T3 y T11 con pH de 5.12 respectivamente.

Para el día 20 de almacenamiento, los resultados expresaron diferencia estadística significativa $P \leq 0.05$, en cuanto a los tratamientos y también con referencia a la muestra de control, indicando un comportamiento similar en referencia al día 10 de estudio, mostrando el valor más bajo la muestra del control con de 4.18 en contraste con el mayor valore reportado para los tratamientos T1 y T11 con pH de 5.08 respectivamente.

En el día 30 del periodo de estudio también se reportó diferencia estadística significativa $P \leq 0.05$, para los tratamientos y la muestra de control, siendo el control el que mostro menor valor de pH con un valor de 4.01 en contraste con el tratamiento T11 el cual reporto la mayor con 5.03 de pH.

Este comportamiento en los resultados obtenidos en esta investigación, podrían ser atribuidos a la presencia de las BAL, como es conocido que estos microorganismos generan ácido láctico, pues su presencia indicaría que se produzca este acido en mayor cantidad por lo tanto se obtiene un pH más acido.

Se reconoce también que el pH es uno de los parámetros que afecta sobre todo las propiedades texturales del queso, debido a su efecto sobre la red de proteínas. Un pH cercano al punto isoeléctrico provoca fuertes fuerzas iónicas e hidrófobas, que resultan en una red de caseína compacta típica de los quesos duros, mientras que en el caso de un pH más alto las caseínas presentan una carga negativa, lo que genera repulsión entre los agregados proteicos, generándose un queso con mayor humedad, más elástico y menos compacto (Watkinson et al., 2001; Lu et al., 2008).

En los quesos frescos, la elevada humedad y el bajo pH, son condiciones que afectan notoriamente la textura y sabor durante la conservación, de forma que una excesiva proteólisis podría ocasionar defectos como una textura excesivamente blanda y un sabor amargo (Fox y McSweeney, 1996). Un ejemplo donde se hace más evidente este defecto es en el queso Oaxaca, que con el tiempo se ablanda, pierde elasticidad y definición visual del hilado, semejante al que se observa en el queso Mozzarella (Imm et al., 2003; Zisu y Shah, 2005).

4.3. Firmeza instrumental

Los resultados que se muestran en la tabla 5, presentan los resultados del análisis de firmeza en muestras de queso fresco, demostrando que la firmeza aumentó en todos los tratamientos y en la muestra de control durante los 30 días de almacenamiento, lo que indica una pérdida de firmeza en el queso.

Tabla 5. Análisis de firmeza en muestras de queso fresco almacenado a 25°C.

Tratamientos	Código	Día 0	Día 10	Día 20	Día 30
T1	A1B1C1D1	1,20	1,31	1,74	2,33
T2	A1B1C1D2	1,20	1,47	1,80	2,39
T3	A1B2C1D1	1,20	1,29	1,63	2,21
T4	A1B2C1D2	1,20	1,33	1,75	2,30
T5	A1B1C2D1	1,20	1,39	1,77	2,30
T6	A1B1C2D2	1,20	1,60	1,90	2,44
T7	A1B2C2D1	1,20	1,82	2,21	3,13
T8	A1B2C2D2	1,20	1,87	2,25	3,12
T9	A2B1C1D1	1,20	1,25	1,55	2,03
T10	A2B1C1D2	1,20	1,37	1,71	2,25
T11	A2B2C1D1	1,20	1,28	1,44	1,97
T12	A2B2C1D2	1,20	1,33	1,74	2,40
T13	A2B1C2D1	1,20	2,37	3,05	4,01
T14	A2B1C2D2	1,20	2,81	3,43	4,26
T15	A2B2C2D1	1,20	2,88	3,61	4,01
T16	A2B2C2D2	1,20	2,92	3,89	5,15
T17	CONRTROL	1,20	3,05	4,72	6,17

Elaborado por: Espinoza V. 2019

El análisis de varianza y la prueba de comparación de Duennett mostraron diferencia estadística significativa en los tratamientos y control en el día 0, demostrando diferencia significativa ($P>0.05$) en los días 10; 20 y 30 ver (Anexo 10 y Anexo 10.1). Respecto a día 10 la firmeza aumentó en las muestras de queso siendo el control el que presentó una mayor firmeza con un valor de 3.05 N, a diferencia del T11 que mostro la menor firmeza siendo el valor reportado de 1.28 N. Para el día 20 se reportó la mayor firmeza en la muestra del control con 4.72N en contraste con el T11 el cual evidencio la menor firmeza con un valor de 1.44N, un comportamiento similar se registró en el día 30 de almacenamiento siendo el testigo el cual mostro mayor firmeza con 6.17N y el T11 el cual evidencio la menor firmeza con un valor de 1.97N.

En base a los resultados obtenidos en esta investigación, el beneficio en cuanto a la aplicación de las BAL se logró observar durante los 30 días del periodo de almacenamiento, esto concuerda con Zambrano (2010) el cual en su investigación indica que los probióticos disminuyen la dureza a los 7 días de su almacenamiento.

Sin lugar a dudas para el consumidor la textura juega un rol importante en términos de inferir la calidad de un alimento. Particularmente en el queso, la textura es uno de los atributos más importantes que ayudan a determinar la identidad del mismo (Bourne, 2002).

Por otro lado, las pruebas imitativas (también denominadas pruebas semifundamentales), incluyen sistemas de medición mecánica con poco control de variables experimentales (tales como, el tipo de sonda, el tamaño y forma de la muestra, entre otras). Como su nombre lo indica son pruebas que tratan de imitar mecánicamente la evaluación sensorial realizada por evaluadores humanos. De hecho, se recomienda emplearlas junto con la evaluación sensorial, a fin de obtener modelos más exactos de los atributos de textura del alimento (Gunasekaran y Ak, 2003). Una de las pruebas imitativas más comunes es el Análisis de Perfil de Textura (TPA, por sus siglas en inglés).

En términos generales, se habla de que existen dos fenómenos opuestos que controlan la firmeza del queso. El primero consiste en la acción de las diferentes enzimas proteolíticas sobre la matriz proteica, principalmente sobre la κ -caseína, que da como resultado una disminución de la firmeza y en consecuencia, modificaciones en algunas propiedades como el color, la elasticidad y textura del queso (Lawrence et al., 1987; Lucey et al., 2003). El segundo es el efecto de pérdida de humedad, que al provocar una disminución de la hidratación de las proteínas conduce a una mayor interacción de las mismas provocando el aumento de la firmeza de la matriz proteica (Adda et al. 1982; Walstra, 1990).

Otro de los cambios bioquímicos que ocurren en el queso es la lipólisis. En la estructura del queso, la grasa se encuentra distribuida como material de relleno en la matriz proteica, por lo tanto, si se incrementa su contenido en la formulación, el queso presentará menor firmeza y mayor elasticidad, mientras que cuando su contenido se reduzca (ya sea por acción lipolítica o intencional para fines de obtener un producto con bajo contenido en grasa) se obtendrán quesos más duros y rígidos (Theophilou y Wilbey, 2007; Brighenti et al., 2008).

Para Jaros et al. 2001, las propiedades texturales del queso se ven afectadas por su composición fisicoquímica, siendo importantes el contenido de grasa, de proteínas y de humedad, aunque también influyen la tecnología de procesamiento y la intensidad de la proteólisis. La red proteica de los quesos está formada por las κ y caseínas, cuyas cadenas helicoidales forman celdas que encierran los glóbulos de grasa, haciendo que la relación de grasa proteína en la leche sea crítica (Castañeda 2002), así como el contenido de minerales, un incremento en materia grasa y contenido de agua debilitan la estructura proteica, mientras que una disminución de los mismos provoca un endurecimiento. La dureza aumenta en la medida que el contenido de grasa, proteína y humedad disminuyen (Castañeda 2002 y Osorio 2004).

Tal y como señala Castro (2007), los parámetros texturales pueden tener mucha variabilidad, considerándose precisos los valores de coeficiente de variabilidad menores a 10 %. El autor anteriormente mencionado también indica que el análisis reológico del fenómeno de deformaciones, como es el caso de la prueba de compresión, es bastante complejo, debido a que las estructuras no son uniformes y tienen grandes variaciones naturales. El perfil de textura de un alimento está definido por varios parámetros (Pinho et al. 2004). En términos generales, la dureza es la fuerza necesaria para provocar una cierta deformación en el queso, constituyendo el pico máximo de fuerza durante la primera compresión; por su lado, la elasticidad corresponde a cómo se comporta el producto al tratar de regresar a su forma original con el tiempo, aspecto que generalmente se asocia con el contenido de grasa del queso.

La cohesividad del queso se determina con base en el comportamiento durante la segunda compresión en comparación a cómo se comportó durante la primera (relación $A2/A1$) y representa el punto límite hasta el cual puede deformarse el material antes de romperse (Osorio et al. 2004). La masticabilidad denota la energía necesaria para masticar el alimento y es definida en términos del producto de la multiplicación de la dureza, la elasticidad y la cohesividad. Finalmente, la adhesividad ($A3$) es la fuerza necesaria para superar la de atracción entre la superficie del alimento y aquellos materiales con los que entra en contacto, en este caso la sonda del texturómetro.

El queso de cabra preparado presentó una dureza promedio de 10 N. La dureza de éste está relacionada ampliamente con su composición química. La humedad es un factor determinante en la textura final, donde bajos contenidos se asocian con quesos duros y poco elásticos (Adda et al. 1982). Como se explicó con anterioridad, la grasa, cuando está presente en alto porcentaje, brinda mayor elasticidad y menor firmeza, obteniéndose quesos más duros y rígidos al bajar este porcentaje (Küçüköner y Haque 2006, Theophilou y Wilbey 2007). Por lo tanto, por su contenido de humedad y grasa el queso de cabra obtenido se clasifica como un queso blando.

Otros factores como el método de preparación y el grado de madurez también influyen en las características texturales de los quesos. Phadungath (2005) menciona que se han hallado cinco condiciones de proceso que, principalmente, afectan la textura y propiedades sensoriales del queso crema: el contenido de grasa en la leche estandarizada, la presión de homogenización, el nivel de inóculo, la temperatura de incubación y el pH en el momento de romperse el gel lácteo. Otros factores que influyen en las propiedades físicas y el aroma del queso son: la calidad de la leche y su composición, la extensión de la acidificación por parte de las bacterias iniciadoras, la concentración de sales de calcio (proporciones de las formas solubles e insolubles), la extensión de la proteólisis y otras reacciones ocurridas durante la maduración (Lucey 2003).

Sin embargo, en la determinación instrumental de la textura, el método utilizado (tipo y tamaño de la sonda, velocidad de la prueba, tipo de prueba –compresión o penetración-, tamaño y forma de la muestra) también tienen gran influencia en los resultados obtenidos, los que solo son comparables cuando han sido realizados exactamente en las mismas condiciones de medición. Al respecto, Bourne (2002) recomienda estandarizar todas las condiciones de la prueba con el fin de obtener la mejor resolución entre las diferentes muestras evaluadas. Debido a que la cohesividad es adimensional y la elasticidad puede transformarse en un valor relativo, son los únicos dos parámetros de textura medidos cuyos valores son comparables a los obtenidos de otros estudios con condiciones experimentales diferentes. Bourne (1982) afirma que, aunque la elasticidad solo se puede comparar entre productos con idéntica forma y tamaño, al expresar la elasticidad como una razón de la altura original de la muestra, pueden hacerse comparaciones entre una más amplia variedad de muestras y productos.

4.4. Pérdida de peso

En la tabla 6, se muestran los resultados del análisis en cuanto a la variable pérdida de peso, en muestras de queso fresco, evidenciándose que el porcentaje de pérdida

de peso registro un aumento en todos los tratamientos y en la muestra de control durante los 30 días del periodo de estudio, lo que indica que a mayor tiempo de almacenamiento mayor pérdida de peso se registra en el producto.

Tabla 6. Análisis de pérdida de peso en muestras de queso fresco almacenado a 25°C.

Tratamientos	Código	Día 0	Día 10	Día 20	Día 30
T1	A1B1C1D1	0	3,43	8,14	10,12
T2	A1B1C1D2	0	4,44	7,99	18,80
T3	A1B2C1D1	0	2,11	6,27	9,11
T4	A1B2C1D2	0	4,46	8,00	19,01
T5	A1B1C2D1	0	4,31	8,19	19,19
T6	A1B1C2D2	0	4,60	8,92	20,05
T7	A1B2C2D1	0	4,53	8,63	18,99
T8	A1B2C2D2	0	4,46	8,02	19,02
T9	A2B1C1D1	0	2,85	7,17	16,40
T10	A2B1C1D2	0	3,78	6,51	11,17
T11	A2B2C1D1	0	2,08	5,53	9,04
T12	A2B2C1D2	0	3,14	6,01	15,12
T13	A2B1C2D1	0	4,00	8,28	20,02
T14	A2B1C2D2	0	4,45	8,05	20,77
T15	A2B2C2D1	0	4,66	8,91	20,87
T16	A2B2C2D2	0	4,68	8,80	21,00
T17	CONRTROL	0	4,79	9,02	22,05

Elaborado por: Espinoza V. 2019

El análisis estadístico ANOVA y la prueba de comparación Dunnett determinaron diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) en pérdida de peso de los tratamientos y control en los días 10, 20 y 30 de su almacenamiento (Anexo 11 y Anexo 11.1). Existió diferencia a partir del día 10 de almacenamiento, donde todos los tratamientos pierden peso, siendo el T11 el que menor pérdida tuvo (9,04 %) en contraste con el control el cual presento mayor pérdida (22.05 %) al finalizar el periodo de estudio.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo se observó que la pérdida de peso se ve influenciada por la aplicación de los tratamientos. La aplicación del recubrimiento comestible y de BAL redujo la pérdida de peso, en contraste con los resultados reportados por Álvarez Yanamango y Barrientos (2011) los cuales mencionan que al aplicarle el *Lactobacillus casei* al queso fresco en el análisis de varianza no mostro diferencia estadística durante su almacenamiento.

4.5. Análisis microbiológicos

En la tabla 7, se muestran los resultados del análisis en cuanto al conteo de UFC/g de *Salmonella* en muestras de queso fresco, los resultados muestran que en la mayoría de los tratamientos disminuye la presencia de este microorganismo a excepción de los tratamientos T6; T8; T14; T16 y muestras del control, en los cuales aumenta la carga bacteriana durante los 30 días del periodo de estudio, lo que indica que no se elimina la presencia de *Salmonella* en el queso solo se elimina parcialmente este patógeno.

Tabla 7. Conteo de UFC/g de *Salmonella spp*, en muestras de queso fresco almacenado a 25°C.

Tratamientos	Código	Día 0 UFC/g	Día 10 UFC/g	Día 20 UFC/g	Día 30 UFC/g
T1	A1B1C1D1	253,00	255,67	225,00	211,67
T2	A1B1C1D2	255,00	228,00	187,33	113,67
T3	A1B2C1D1	252,67	195,00	116,00	98,33
T4	A1B2C1D2	250,67	270,00	212,67	182,00
T5	A1B1C2D1	252,33	194,33	105,67	100,33
T6	A1B1C2D2	250,67	244,67	389,33	415,00
T7	A1B2C2D1	254,33	226,33	201,33	182,33
T8	A1B2C2D2	250,00	234,00	309,00	403,33
T9	A2B1C1D1	253,67	218,33	113,67	100,00
T10	A2B1C1D2	253,00	220,67	178,33	168,00
T11	A2B2C1D1	251,67	214,00	182,67	61,33
T12	A2B2C1D2	251,00	239,00	215,33	177,67
T13	A2B1C2D1	252,67	247,33	148,76	125,67
T14	A2B1C2D2	250,67	204,33	323,67	416,67
T15	A2B2C2D1	251,67	226,33	183,67	105,33
T16	A2B2C2D2	250,00	221,00	307,33	467,00

T17	CONRTROL	250,67	382,33	498,33	604,67
------------	-----------------	--------	--------	--------	--------

Elaborado por: Espinoza V. 2019

Los resultados mostrados en la tabla 8, correspondientes al conteo de UFC/g de *E. coli* en muestras de queso fresco, los resultados exponen que al igual que en el análisis de *Salmonella* en la mayoría de los tratamientos disminuye la presencia de este microorganismo a excepción de los tratamientos T6;T14 y las muestras del control los que reportan aumento de UFC de *E. Coli* durante los 30 días del periodo de estudio, los datos muestran una reducción de este patógeno pero no se elimina por completo.

Tabla 8. Conteo de UFC/g de *E. coli*, en muestras de queso fresco almacenado a 25°C.

Tratamientos	Código	Día 0 UFC/g	Día 10 UFC/g	Día 20 UFC/g	Día 30 UFC/g
T1	A1B1C1D1	303	282	254	223
T2	A1B1C1D2	300	234	177	162
T3	A1B2C1D1	305	202	144	101
T4	A1B2C1D2	308	223	188	153
T5	A1B1C2D1	317	200	132	97
T6	A1B1C2D2	306	300	344	360
T7	A1B2C2D1	311	256	203	187
T8	A1B2C2D2	305	287	230	211
T9	A2B1C1D1	308	200	121	99
T10	A2B1C1D2	302	285	217	162
T11	A2B2C1D1	303	185	101	89
T12	A2B2C1D2	304	288	199	187
T13	A2B1C2D1	303	251	201	164
T14	A2B1C2D2	305	333	396	425
T15	A2B2C2D1	308	278	203	198
T16	A2B2C2D2	304	353	379	390
T17	CONRTROL	303	394	431	478

Elaborado por: Espinoza V. 2019

En la tabla 9, se muestran los resultados correspondientes al conteo de UFC/g de *L. monocytogenes* en muestras de queso fresco, los resultados indican que en la mayoría de los tratamientos disminuye la presencia de este patógeno a excepción

de los tratamientos T14; T16 y las muestras del control los que evidenciaron aumento de UFC de *L. monocytogenes* durante los 30 días del periodo de estudio, los datos muestran una disminución de este patógeno a lo largo del almacenamiento.

Tabla 9. Conteo de UFC/g de *Listeria monocytogenes*, en muestras de queso fresco almacenado a 25°C.

Tratamientos	Código	Día 0	Día 10	Día 20	Día 30
T1	A1B1C1D1	129	125	119	117
T2	A1B1C1D2	133	128	122	115
T3	A1B2C1D1	125	123	111	102
T4	A1B2C1D2	124	122	120	118
T5	A1B1C2D1	126	125	113	104
T6	A1B1C2D2	125	124	122	119
T7	A1B2C2D1	128	124	122	118
T8	A1B2C2D2	130	120	115	110
T9	A2B1C1D1	131	127	110	103
T10	A2B1C1D2	125	123	118	114
T11	A2B2C1D1	122	89	87	74
T12	A2B2C1D2	124	123	120	118
T13	A2B1C2D1	127	122	117	112
T14	A2B1C2D2	128	138	141	144
T15	A2B2C2D1	129	124	122	117
T16	A2B2C2D2	128	133	139	144
T17	CONRTROL	124	189	225	245

Elaborado por: Espinoza V. 2019

En el presente estudio se reportó actividad antimicrobiana contra cepas de *Salmonella* spp, *E. coli* y *Listeria Monocytogenes*, lo que concuerda con varios autores, Concha-Meyer et al. (2011) quienes también encapsularon BAL (dos cepas de *Carnobacterium maltaromaticum*) en películas de alginato que contenían almidón y glicerol, donde reportaron una importante disminución de la actividad anti *Listeria* de estas películas después de su almacenamiento a 4 ° C durante 20 días.

La presencia de LAB puede ayudar a inhibir los microorganismos al producir bacteriocinas (Aymerich, Garriga, & Hugas, 2000). Este hecho está respaldado por

los resultados de la actividad de *L. acidophilus* encapsulado contra *Salmonella spp.* donde no se encontró migración de LAB de cápsulas a los alrededores, sin embargo, se observó una zona de inhibición (Santacruz y Castro 2018).

Además, los estudios in vitro mostraron inhibición de *Salmonella spp.* por *L. acidophilus*. Las zonas de inhibición de 2.08 y 2.11 cm de diámetro se formaron después de 24 y 48 h de agregar *L. acidophilus* respectivamente. Estudios previos mostraron la inhibición de *E. coli*, *L. monocytogenes* y *S. enteritidis* por LAB (Lord, 2002; Winkowski, Crandall, & Montville, 1993).

Los resultados encontrados en este trabajo sugieren que los probióticos analizados producen sustancias que difunden al medio de cultivo y que ejercen actividad inhibitoria, tal como se ha descrito previamente por Stiles (1996).

En este trabajo los patógenos más sensible fueron *Salmonella* y *Yersinia*. El efecto antimicrobiano de los probióticos sobre *Salmonella* ya fue analizado previamente por Hudahult et al. (1997), quienes describen que este proceso puede deberse a la producción de bacteriocinas o al ácido láctico. En este trabajo se demostró que el queso fresco es un vehículo acarreador efectivo de probióticos, ya que la mezcla de microorganismos probióticos seleccionada sobrevive sin alterar las propiedades organolépticas. El uso de alimentos con varias especies de probióticos ha mostrado ser más eficiente que el de los productos con una sola especie, dado que se potencian los efectos benéficos a la salud, y además se logran ventajas tecnológicas y organolépticas. (Timmerman et al., 2004). Otros investigadores elaboraron quesos con contenidos similares, por ejemplo, Vinderola et al. (2000) elaboraron un queso fresco con una mezcla de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* con un contenido de 10^8 UFC/g y, Kasimoglu et al. (2004) elaboraron un queso blanco con *L. acidophilus* y encontraron que los microorganismos sobreviven en cantidades superiores a 10^7 UFC/g. En el queso fresco elaborado los microorganismos

adicionados no disminuyen en cantidad durante el tiempo de vida de anaquel del producto.

Los productos lácteos pueden ser un vehículo de ingestión de *Salmonella*, siendo reportada su presencia y sobrevivencia en los diferentes tipos de quesos (El-Gazzar y Marth, 1992). El riesgo de contaminación por *Salmonella* en quesos frescos es mayor por sus características de baja acidez y alto contenido de humedad; Peraza, (2001), además, se potencia el riesgo de infección, debido a que se consumen sin procesos de cocción. Para evaluar la efectividad de los probióticos adicionados a los quesos sobre *Salmonella enteritidis* var. *Typhimurium* se analizó el efecto de inhibición del crecimiento del patógeno inoculado artificialmente a través de pruebas in vitro a diferentes concentraciones, y se comparó con un queso que no contenía probióticos. Los resultados muestran que en los quesos sin probióticos el patógeno se detectó en un mayor porcentaje, en contraste con el queso con probióticos. Esta tendencia se observó con las diferentes concentraciones de patógeno. Estos resultados son similares a los descritos por Saad et al. (2006) al estudiar la inhibición de *E. coli* O157:H7 en queso minas (queso fresco típico de Brasil) con *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y se encontró que las bacterias lácticas disminuyen significativamente la cantidad del patógeno, lo que demuestra que la adición de probióticos puede ser efectiva para disminuir los riesgos en quesos frescos, que por sus características son muy vulnerables de contaminarse.

La primera y principal función de las BAL es la formación de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico (Bouzar, Cerning & Desmazeaud, 1997) a una velocidad conveniente para asegurar una fermentación consistente y exitosa (Jagnow y Wolfgang 1991). El ácido láctico puede ser obtenido a través de la fermentación de la lactosa, que da un sabor ácido fresco en leches fermentadas, mejora cuerpo y textura en los quesos e inhibe, en parte, el desarrollo de flora contaminante y patógena (Kailasapathy 2006; Bertrand, 2006).

Las BAL producen varios componentes antimicrobianos los cuales inhiben el crecimiento de organismos esporádicos relevantes. Recientemente, está demostrado que la adición de levaduras fermentadas por *Lactobacillus plantarum*, inhibe el crecimiento de *Fusarium* (Boylston et al., 2004). La inhibición de *B. cereus* por BAL ha sido intensivamente estudiada en varios alimentos fermentados como productos lácteos, productos basados en cereales y productos de semilla de soya.

La utilización de las BAL o sus metabolitos para la preservación de alimentos es generalmente aceptado por consumidores como algo “natural” y “promotores de salud” (Olson y Aryana, 2008). Las BAL produce un conjunto de sustancias antimicrobianas (como ácidos orgánicos, diacetilo, acetoina, peróxido de hidrógeno, reuterina, reuterociclina, péptidos antifúngicos y bacteriocinas) (Osorio y Roldan 2003; Savadogo et al., 2006) que han sido utilizadas como biopreservadoras en productos alimenticios, incluyendo productos lácteos como quesos frescos y madurados con el objeto de evitar la proliferación de patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Clostridium* y *Staphylococcus aureus* (Durlu et al., 2007).

Las bacteriocinas son componentes proteínicos antibacterianos que son producidos por BAL comúnmente presentes en alimentos (Panesar et al., 2007). Son péptidos bioactivos con efecto bactericida o bacteriostático (Jagnow y Wolfgang, 1991). Han sido objeto de muchas investigaciones en recientes años por su novedoso uso potencial como preservante natural en alimentos y propósitos médicos (Parra et al., 2008). Las bacteriocinas típicamente tienen un estrecho espectro antibacterial. Así, algunas bacteriocinas de BAL pueden inhibir el crecimiento de Gram-positivas patogénicas y bacterias dañinas como también levaduras y especies Gram-negativas (Kailasapathy, 2006). Las aplicaciones alimenticias de bacteriocinas son una alternativa para satisfacer el crecimiento de consumidores por la demanda de alimentos que son higiénicamente seguros (Ananou et al., 2008).

CAPÍTULO V.

CONCLUSIONES

- Se evidencio que todos los tratamientos utilizados en este estudio tuvieron efecto en las propiedades físico-químicas del queso, siendo el tratamiento T11 con la codificación A2B2C1D1 el cual contenía (*L. Casei* + fructosa encapsulados + ácido gálico encapsulado) el cual presento el mejor efecto en cuanto a las características organolépticas del producto.
- En cuanto al efecto antimicrobiano de bacterias ácido lácticas, prebióticos y antioxidantes encapsulados utilizados sobre *Salmonella spp.*, *E. coli* y *L. monocytogenes* el T11 con (*L. Casei* + fructosa encapsulados + ácido gálico encapsulado) evidenció mayor inhibición microbiana, también se identificó que los tratamientos con *L casei* tienen mayor poder inhibitorio frente a los tres patógenos estudiados.
- Respecto al mejor tratamiento resultante de los resultados microbiológicos, se evidencio al tratamiento T11 con la codificación A2B2C1D1 el cual contenía (*L. Casei* + fructosa encapsulados + ácido gálico encapsulado) como mejor tratamiento en cuanto a la conservación de queso fresco almacenado a 25°C.
- Por lo expuesto anteriormente, se puede indicar que la hipótesis planteada al inicio de presente trabajo de investigación, que la adición de bacterias ácido lácticas, prebióticos y antioxidantes encapsulados si es una buena alternativa en la conservación de queso fresco.

RECOMENDACIONES

- ❖ Se podría utilizar BAL *L. Casei* y *L. lactis* como agente antimicrobiano en mohos y levaduras, para implementar su uso en otros tipos de alimentos que son afectados por este tipo de microorganismos.
- ❖ Evaluar la eficiencia de las BAL en quesos maduros.
- ❖ Realizar el estudio aplicando los tratamientos en otros tipos de productos, para ampliar su campo de aplicación.

BIBLIOGRAFIA

1. Adda, J., Gripon, JC, y Vassal, L. (1982). La química de la generación de sabores y texturas en el queso. *Química de los alimentos*, 9 (1-2), 115-129.
2. Albarracín, F. Y., Sarmiento, P., Carrascal, A. K., & Mercado, M. (2006). Estimación de la proporción de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp en quesos frescos (queso de hoja, cuajada) y queso Doble Crema producidos y comercializados en el Municipio de Pamplona, Norte de Santander. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 4(2).
3. Alvarez, E. (2011). Efectos del *Lactobacillus casei* ATCC 393 sobre el *Escherichia coli* durante la vida comercial del queso fresco (Doctoral dissertation, Tesis para optar el título de Ingeniero de Alimentos, Universidad Nacional del Callao, Callao, Perú).
4. Ananou, S., Muñoz, A., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M., & Valdivia, E. (2008). Optimization of enterocin AS-48 production on a whey-based substrate. *International dairy journal*, 18(9), 923-927.
5. A.O.A.C. (1980). *Official methods of Analysis*. 16 th Edition. Association of official Analytical Chemists. Washington D.C; USA.
6. AOAC. (1984). *Official methods of analysis of official analytical chemists international*. 14th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
7. Abou-Arab, A. A., Talaat, H. A., & Abu-Salem, F. M. (2011). Physico-chemical properties of inulin produced from Jerusalem artichoke tubers on bench and pilot plant scale. *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, 5(5), 1297-1309.
8. Araújo, V. S., Pagliares, V. A., Queiroz, M. L. P., & Freitas-Almeida, A. C. (2002). Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 92(6), 1172-1177.
9. Aray, C. (2002). *Calidad microbiológica del queso blanco venezolano tipo telita*. Trabajo de Especialización. Dpto. de Postgrado. Universidad Simón Bolívar. Caracas. Venezuela.
10. Ashwell M. (2005). *Conceptos sobre Alimentos Funcionales*. ILSI Europe Concise Monograph Series, ILSI Press.

11. Aymerich, M. T., Garriga, M., Monfort, J. M., Nes, I., & Hugas, M. (2000). Bacteriocin-producing lactobacilli in Spanish-style fermented sausages: characterization of bacteriocins. *Food Microbiology*, 17(1), 33-45.
12. Bajpai, B., & Patil, S. (2008). A new approach to microbial production of gallic acid. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(4), 708-711.
13. Beltrán, J. S. H., Aguirre, E. R., & Barragán, I. S. R. (2012). Análisis de las Buenas Prácticas de Producción en granjas porcícolas del departamento del Tolima y factores de riesgo asociados a la presencia de *Salmonella* spp. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 7(2), 11-20.
14. Benítez-Cortés, I., Pérez-Martínez, A., Álvarez-Borroto, R., Collado-García, O., & González-Díaz, Y. (2015). Perspectivas de la producción de inulina a partir de la tuna (*Opuntia ficus-indica*). *Tecnología Química*, 35(2), 181-192.
15. Bertrand-Harb, C., Ivanova, IV, Dalgalarondo, M., y Haertllé, T. (2003). Evolución del contenido de β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina durante la fermentación del yogur. *International Dairy Journal*, 13 (1), 39-45.
16. Beuvier, E., Berthaud, K., Cegarra, S., Dasen, A., Pochet, S., Buchin, S., Duboz, G. (1997). Ripening and quality of swiss type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. *International Dairy Journal* 7:311-323.
17. Blanco, S., Pacheco, E., & Frágenas, N. (2006). Evaluación física y nutricional de un yogurt con frutas tropicales bajo en calorías. *Rev. Fac. Agron*, 32, 131-144.
18. Borgogna, M., Bellich, B., Zorzin, L., Lapasin, R., & Cesàro, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122(2), 416-423.
19. Bourne, M. (2002). Textura y viscosidad de los alimentos: concepto y medida (No. 664.07 B6677f Ej. 1 020224). Prensa Académica.
20. Bourne, MC. (1982). *Food Texture and Viscosity*. Academic Press, New York. 330 p.
21. Bouzar, F., Cerning, J., & Desmazeaud, M. (1997). Exopolysaccharide production and texture-promoting abilities of mixed-strain starter cultures in yogurt production. *Journal of Dairy Science*, 80(10), 2310-2317.

22. Boylston, TD, Vinderola, CG, Ghoddusi, HB, y Reinheimer, JA (2004). Incorporación de bifidobacterias en los quesos: retos y recompensas. *International Dairy Journal* , 14 (5), 375-387.
23. Brackett, B. (1988). Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food Technol.*, 42, 162-164.
24. Brighenti, M., Govindasamy-Lucey, S., Lim, K., Nelson, K., & Lucey, J. A. (2008). Characterization of the rheological, textural, and sensory properties of samples of commercial US cream cheese with different fat contents. *Journal of dairy science*, 91(12), 4501-4517.
25. Bryan, A., Youngster, I., & McAdam, A. J. (2015). Shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Clinics in laboratory medicine*, 35(2), 247-272.
26. Capela, P., Hay, T., & Shah, N. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, 39(2), 203-211.
27. Castañeda, R. (2002). La reología en la tipificación y la caracterización de quesos. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 20(26), 48-53.
28. Castro, E. 2007. *Parámetros mecánicos y textura de los alimentos*. Universidad de Chile, Santiago, Chile. 144 p.
29. Castro-Castillo, G., Espinoza-Ortega, A., Martínez-Campos, A., & Martínez-Castañeda, F. (2013). Caracterización de la microflora de tres quesos tradicionales mexicanos: chihuahua, cincho y oaxaca. Universidad Autónoma del Estado de Mexico. Tesis Doctoral.
30. Cicuta, M., Deza, N., Roibón, W., Pereyra, D., Benitez, M., Arzú, R., & Boehringer, S. (2006). Detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en reses bovinas y carne molida de Corrientes, Argentina. *Revista Veterinaria*, 17(1), 20-25.
31. Coelho, M., Silva, C., Ribeiro, S., Dapkevicius, M., & Rosa, H. (2014). Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *International journal of food microbiology*, 191, 53-59.
32. Concha-Meyer, A., Schöbitz, R., Brito, C., & Fuentes, R. (2011). Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon. *Food Control*, 22(3-4), 485-489.
33. Contreras, Y., Sarmiento, P., Camacho, A., & Mercado, M. (2006). Estimación de la proporción de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp en quesos frescos (queso de hoja, cuajada) y queso Doble Crema producidos y

comercializados en el Municipio de Pamplona, Norte de Santander. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 4(2), 30-41.

34. Curry, B. & Crow, V. (2002). *Lactobacillus casei* group. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. (Roginski, H.; Fuquay, J.W. y Fox P.F.). Academic Press Elsevier Science, Cornwall, UK. 1488 - 1494.
35. Durlu-Özkaya, F., Aslim, B., & Ozkaya, M. T. (2007). Effect of exopolysaccharides (EPSs) produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria. *LWT-Food science and technology*, 40(3), 564-568.
36. Elliott, S., Keim, N., Stern, J., Teff, K., & Havel, P. (2002). Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *The American journal of clinical nutrition*, 76(5), 911-922.
37. FAO & WHO. (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). (2002). Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Foods*. London, Ontario, Canada: s.n.; p. 1-11.
38. FDA. (2001). Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, USDA/Food Safety and Inspection Service, Centers for Disease Control and Prevention. Draft assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready- to-eat foods. Interpretative summary p.1-24.
39. Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (1996). Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International*, 12(4), 457-509.
40. El-Gazzar, FE, y Marth, EH (1992). Salmonella, salmonelosis y productos lácteos: una revisión. *Diario de la ciencia lechera* , 75(9), 2327-2343.
41. Gaafar, A., Boudy, E., & El-Gazar, H. (2010). Extraction conditions of inulin from Jerusalem artichoke tubers and its effects on blood glucose and lipid profile in diabetic rats. *Journal of American Science*, 6(5), 36-43.
42. Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107-1121.
43. Gonzalez, J., Mas, M., Tabla, R., Moriche, J., Roa, I., Rebollo, J. & Cáceres, P. (2003). Autochthonous starter effect on the microbiological, physicochemical and sensorial characteristics of Iborea goat's milk cheeses. *Le Lait*, 83(3), 193-202.

44. Gunasekaran, S. y Ak, M.M. 2003. Cheese Rheology and Texture. CRC Press. Nueva York, EE.UU. 437 pp.
45. Hudault, S., Liévin, V., Bernet-Camard, MF, y Servin, AL (1997). Actividad antagonista ejercida in vitro e in vivo por *Lactobacillus casei* (cepa GG) contra la infección por *Salmonella typhimurium* C5. *Apl. Reinar. Microbiol.* , 63 (2), 513-518.
46. Imm, J. Y., Oh, E. J., Han, K. S., Oh, S., Park, Y. W., & Kim, S. H. (2003). Functionality and physico-chemical characteristics of bovine and caprine mozzarella cheeses during refrigerated storage. *Journal of Dairy science*, 86(9), 2790-2798.
47. INEN, N. 1529-5. (2009). Control microbiológico de los alimentos. *Salmonella*. Método de detección.
48. INEN 1529-8. (1990). Control microbiológico de los alimentos. Determinación de coliformes fecales y *E.coli*.
49. ISO 11290-1: (1996). Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* -- Part 1: Detection method.
50. Jagnow, G y Wolfgang, D. (1991). Introducción con experimentos modelo, Ed. Zaragoza: Achbla, p. 157-167.
51. Jaros, D., Petrag, J., Rohm, H., & Ulberth, F. (2001). Milk fat composition affects mechanical and rheological properties of processed cheese. *Applied Rheology*, 11(1), 10.
52. Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. *LWT-Food Science and Technology*, 39(10), 1221-1227.
53. Kailasapathy, K., & Chin, J. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunology & Cell Biology*, 78(1), 80-88.
54. Kasımoğlu, A., Göncüoğlu, M., & Akgün, S. (2004). Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. *International Dairy Journal*, 14(12), 1067-1073.
55. Khem, S., Small, D., & May, B. (2016). The behaviour of whey protein isolate in protecting *Lactobacillus plantarum*. *Food chemistry*, 190, 717-723.

56. Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3-13.
57. Krasaekoopt, W., & Watcharapoka, S. (2014). Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 761-766.
58. Kolida, S., Tuohy, K., & Gibson, G. (2002). Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87(S2), S193-S197.
59. Koneman, E. (2008). *Diagnóstico Microbiológico*. Panamericana; p. 238-248.
60. Küçüköner, E., & Haque, Z. U. (2006). Physicochemical properties of low-fat and full-fat Cheddar cheeses. *International journal of dairy technology*, 59(3), 166-170.
61. Lawrence, RC, Creamer, LK, y Gilles, J. (1987). Desarrollo de la textura durante la maduración del queso. *Journal of Dairy Science* , 70 (8), 1748-1760.
62. Lê, K., & Tappy, L. (2006). Metabolic effects of fructose. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 9(4), 469-475.
63. Leuschner, R., & Boughtflower, M. (2002). Laboratory-scale preparation of soft cheese artificially contaminated with low levels of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, and Dublin. *Journal of food protection*, 65(3), 508-514.
64. Linder, E. (1995). *Toxicología de los alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza España. p53-65.
65. Liu, G., Ren, L., Song, Z., Wang, C., & Sun, B. (2015). Purification and characteristics of bifidocin A, a novel bacteriocin produced by *Bifidobacterium animalis* BB04 from centenarians' intestine. *Food control*, 50, 889-895.
66. Lopez-Rubio, A., Gavara, R., & Lagaron, J. (2006). Bioactive packaging: turning foods into healthier foods through biomaterials. *Trends in Food Science & Technology*, 17(10), 567-575.
67. Lord, E. (2002). *Utilización de Lactobacillus acidophilus como control de Salmonella en pescado Thesis*. Cartago: Instituto Tecnológico de Costa Rica.

68. Lu, Y., Shirashoji, N., & Lucey, J. A. (2008). Effects of pH on the textural properties and meltability of pasteurized process cheese made with different types of emulsifying salts. *Journal of food science*, 73(8), E363-E369.
69. Lucey, JA, Johnson, ME, y Horne, DS (2003). Revisión invitada: perspectivas en base a las propiedades de reología y textura del queso. *Diario de la ciencia lechera*, 86 (9), 2725-2743.
70. Madigan, M., & Martinko, J. (2005). *Brock biology of microorganisms*. (11th edn).
71. Márquez, J., García, R., & Elena, C. (2007). Microflora patógena del queso blanco telita elaborada en cuatro estados de Venezuela. *An. venez. nutr*, 17-21.
72. Mathot, AG, Beliard, E., y Thuault, D. (2003). *Streptococcus thermophilus* 580 produce una bacteriocina potencialmente adecuada para la inhibición de *Clostridium tyrobutyricum* en quesos duros. *Diario de la ciencia lechera*, 86 (10), 3068-3074.
73. Matsuzaki, T. (2003). *Handbook of Fermented Functional Foods*. Cap. 6: Health properties of milk fermented with *Lactobacillus casei* strain Shirota (LcS). (Farnworth, E.R.). CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, EEUU. 145 - 175.
74. McLauchlin, J. (1997). The identification of *Listeria* species. *International journal of food microbiology*, 38(1), 77-81.
75. Mondal, K., Samanta, S., Giri, S., & Pati, B. (2001). Distribution of tannic acid degrading microorganisms in the soil and comparative study of tannase from two fungal strains. *Acta Microbiol.*, 50(1), 75-82.
76. Muñoz, A., & Díaz, G. (1996). Determinación e identificación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y madurados que se comercializan en Santafé de Bogotá. *Notinvima*.(Colombia), 1, 19-21.
77. Muñoz, D., & Pérez, M. (1999). Incidencia de *Listeria monocytogenes* en Quesos Frescos en Santa Fe de Bogotá. Departamento de Microbiología Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, DC, Colombia, 79.
78. Olagnero, G., Abad, A., Bendersky, S., Genevois, C., Granzella, L., & Montonati, M. (2007). Alimentos funcionales: fibra, prebióticos, probióticos y simbióticos. *Diaeta*, 25(121), 20-33.

79. Olson, D. W., & Aryana, K. J. (2008). An excessively high *Lactobacillus acidophilus* inoculation level in yogurt lowers product quality during storage. *LWT-Food Science and Technology*, 41(5), 911-918.
80. Ortiz, R. (1993). Incidencia de *Aeromonas* spp. y *Listeria* spp. en frutas y vegetales. Trabajo especial de Grado para optar al título de Licenciado en Biología. Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Central de Venezuela.
81. Osorio, L y Roldan, J. (2003). Volvamos al campo. Lácteos y derivados. Ed. Ltda Bogotá grupo latino, p. 44.
82. Osorio, Juan Felipe. (2004). Caracterización reológica y textural del queso Edam. Medellín. 70 h. Trabajo de grado Ingeniero Agrícola, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias.
83. Panesar, PS, Kennedy, JF, Gandhi, DN, y Bunko, K. (2007). Bioutilización de suero para la producción de ácido láctico. *Química de los alimentos*, 105 (1), 1-14.
84. Parra, R; Rodríguez J y Martínez, G. (2008). Efecto de la stevia y gelatina como aditivos en la elaboración de un yogurt probiótico durante el periodo de incubación. En: 4 Coloquio Internacional y 5 Nacional de Investigación en Alimentación y Nutrición. Universidad de Antioquia. p 53.
85. Peraza, C. (2001). Los quesos artesanales en México. Lácteos y cárnicos mexicanos. 15, pp.48-54.
86. Phadungath, C. (2005). Cream cheese products: A review. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27(1), 191-199.
87. Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F., & Matuchansky, C. (2005). bifidobacteria as probiotic agents—physiological effects and clinical benefits. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 22(6), 495-512.
88. Pinho, O., Mendes, E., Alves, M. M., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2004). Chemical, physical, and sensorial characteristics of “Terrincho” ewe cheese: changes during ripening and intravarietal comparison. *Journal of Dairy Science*, 87(2), 249-257.
89. Pourrat, H., Regeat, F., Morvan, P., Pourrat, A. (1987). Production of gallic acid from *Rhus coriaria* L. *Biotechnol. Lett.* 9, 731-734.

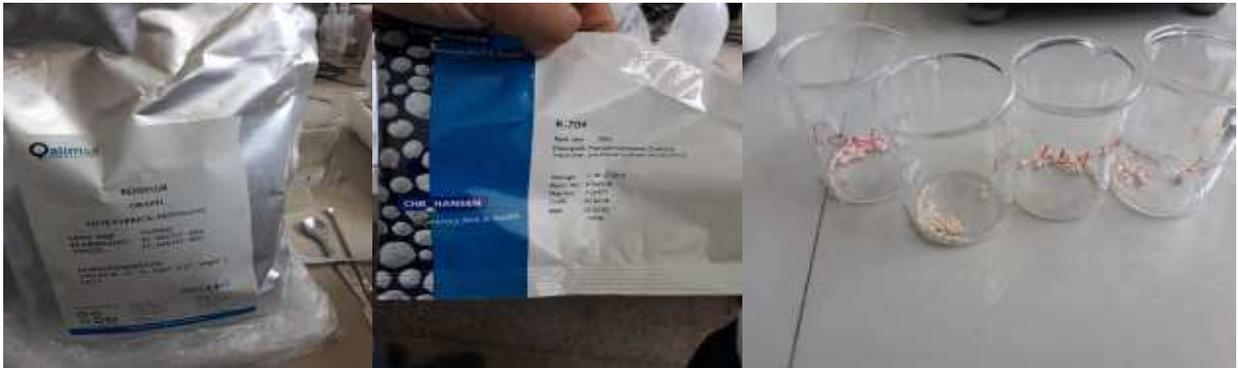
90. Riveros, M., Parada, A., & Pettinelli, P. (2014). Consumo de fructosa y sus implicaciones para la salud: malabsorción de fructosa e hígado graso no alcohólico. *Nutrición Hospitalaria*, 29(3), 491-499.
91. Rodríguez, C., Caldas, L., & Ogeerally, P. (2009). Calidad sanitaria en queso artesanal tipo "telita". Upata, estado Bolívar, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*; 29:98-102.
92. Rodríguez, O., Cortada, A., Rodríguez, J., & Santos, B. (2017). Fructooligosacáridos y probióticos en leches fermentadas, una alternativa nutricional y saludable. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 22(3).
93. Rodríguez Villanueva, G. L. (2007). Aislamiento e identificación de bacterias ácido-lácticas a partir de leche cruda y queso paipa elaborado en los municipios de Pacho (Cundinamarca) y Belén (Boyacá). (Tesis Grado), Universidad de la Salle, Bogotá (Colombia).
94. Saad SMI. Probiotics and prebiotics: the state of the art. *Braz J Pharmac Sci.* 2006; 42(1):1-16.
95. Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*, 84(3), 197-215.
96. Saad, SM, Vanzin, C., Oliveira, MN, y Franco, BD (2001). Influencia de las bacterias del ácido láctico en la supervivencia de *Escherichia coli* O157: H7 en queso Minas inoculado durante el almacenamiento a 8,5 C. *Diario de protección de alimentos*, 64 (8), 1151-1155.
97. Santacruz, S., Rivadeneira, C., & Castro, M. (2015). Edible films based on starch and chitosan. Effect of starch source and concentration, plasticizer, surfactant's hydrophobic tail and mechanical treatment. *Food Hydrocolloids*, 49, 89-94.
98. Santacruz, S., & Castro, M. (2018). Viability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* incorporated to cassava starch edible films and its application to Manaba fresh white cheese. *LWT*, 93, 570-572.
99. Savadogo, A., Ouattara, A. C., Bassole, H. I., & Traore, S. A. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria-a minireview. *African journal of biotechnology*, 5(9).
100. Silveira-Rodríguez, M., Monereo-Megías, S., & Molina-Baena, B. (2003). Alimentos funcionales y nutrición óptima: ¿Cerca o lejos? *Revista española de salud pública*, 77(3), 317-331.

101. Stiles, M.E. (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, pp.331-345.
102. Theophilou, P., & Wilbey, R. A. (2007). Effects of fat on the properties of halloumi cheese. *International journal of dairy technology*, 60(1), 1-4.
103. Zambrano Dávalos, M. C. (2010). Elaboración de queso fresco con lantilización de un fermento probiótico (*Lactobacillus Acidophilus*) (Bachelor's thesis, QUITO/EPN/2010).
104. Zisu, B., & Shah, N. P. (2005). Textural and functional changes in low-fat Mozzarella cheeses in relation to proteolysis and microstructure as influenced by the use of fat replacers, pre-acidification and EPS starter. *International Dairy Journal*, 15(6-9), 957-972.
105. Stoll, L., Costa, T., Jablonski, A., Flôres, S., & de Oliveira Rios, A. (2016). Microencapsulation of anthocyanins with different wall materials and its application in active biodegradable films. *Food and bioprocess technology*, 9(1), 172-181.
106. Taha, H., El-Sawy, A., & Bekheet, S. (2007). In vitro studies on Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) and enhancement of inulin production. *Journal of Applied Sciences Research*, 3(9), 853-858.
107. Timmerman, H. M., Koning, C. J. M., Mulder, L., Rombouts, F. M., & Beynen, A. C. (2004). Monostrain, multistrain and multispecies probiotics—a comparison of functionality and efficacy. *International journal of food microbiology*, 96(3), 219-233.
108. Treviño-Cueto, B., Luis, M., Contreras-Esquivel, J., Rodríguez, R., Aguilera, A., Aguilar, C. (2006) Gallic acid and tannase accumulation during fungal solid state culture of a tannin-rich desert plant (*Larrea tridentata* Cov.) *Bioresource Technol.*, 98(3), 721-724.
109. Vasek, O., Cabrera, R., Coronel, G., De Giori, G., & Fusco, A. (2004). Análisis de riesgos en la elaboración de queso artesanal de Corrientes (Argentina). *Facena*, 20, 13-22.
110. Villalobos, A. C., & Castro, M. L. P. (2009). Características químicas, físicas y sensoriales de un queso de cabra adaptado del tipo "Crottin de Chavignol". *Agronomía mesoamericana*, 297-309.
111. Vinderola, C. G., Prosello, W., Ghiberto, D., & Reinheimer, J. A. (2000). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, 83(9), 1905-1911.

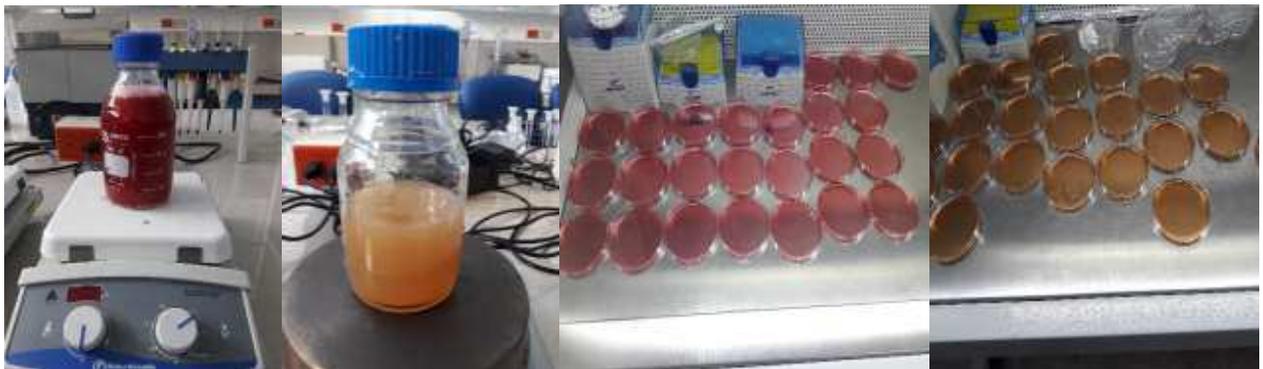
112. Wang, Q., Rojas, E., & Papadopoulos, K. (2012). Cationic liposomes in double emulsions for controlled release. *Journal of colloid and interface science*, 383(1), 89-95.
113. Watkinson, P., Coker, C., Crawford, R., Dodds, C., Johnston, K., McKenna, A., & White, N. (2001). Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 455-464.
114. Walstra, P. (1990). On the stability of casein micelles. *Journal of dairy science*, 73(8), 1965-1979.
115. Winkowski, K. A. R. E. N., Crandall, A. D., & Montville, T. J. (1993). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus bavaricus* MN in beef systems at refrigeration temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(8), 2552-2557.
116. Xu, M., Gagné-Bourque, F., Dumont, M., & Jabaji, S. (2016). Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 cells and evaluation of their survival after freeze-drying, storage and under gastrointestinal conditions. *Journal of Food Engineering*, 168, 52-59.

ANEXOS

Anexo Anexo N°1. Activación de bacterias ácido lácticas



Anexo Anexo N°2. Preparación de medios de cultivo



Anexo Anexo N°3. Preparación de recubrimiento comestible



Anexo Anexo N°4. Preparación de las muestras de queso



Anexo Anexo N°5. Inmersión de las muestras de queso en los tratamientos



Anexo Anexo N°6. Análisis realizados a las muestras de queso



Anexo N° 7. ANOVA de acidez titulable en muestra de queso almacenado a 25°C

ANOVA ACIDEZ TITULABLE

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
DIA0	Entre grupos	,000	16	,000	,030	1,000
	Dentro de grupos	,023	34	,001		
	Total	,023	50			
DIA10	Entre grupos	,018	16	,001	1,981	,046
	Dentro de grupos	,020	34	,001		
	Total	,038	50			
DIA20	Entre grupos	259,297	16	16,206	1,001	,478
	Dentro de grupos	550,488	34	16,191		
	Total	809,785	50			
DIA30	Entre grupos	1336,776	16	83,549	3,894	,000
	Dentro de grupos	729,575	34	21,458		
	Total	2066,351	50			

Anexo N° 7.1. Prueba de comparación Dunnett en variable (Acidez)

Comparaciones múltiples

T de Dunnett (bilateral)^a

Variable dependiente	(I) TRATAMIENTOS	(J) TRATAMIENTOS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
DIA0	1	17	-,00333	,02127	1,000	-,0675	,0608
	2	17	,00000	,02127	1,000	-,0641	,0641
	3	17	-,00333	,02127	1,000	-,0675	,0608
	4	17	,00333	,02127	1,000	-,0608	,0675
	5	17	,00333	,02127	1,000	-,0608	,0675
	6	17	,00000	,02127	1,000	-,0641	,0641
	7	17	-,00333	,02127	1,000	-,0675	,0608
	8	17	-,00333	,02127	1,000	-,0675	,0608
	9	17	,00333	,02127	1,000	-,0608	,0675
	10	17	,00333	,02127	1,000	-,0608	,0675
	11	17	,00333	,02127	1,000	-,0608	,0675
	12	17	,00333	,02127	1,000	-,0608	,0675
	13	17	,00000	,02127	1,000	-,0641	,0641
	14	17	,00000	,02127	1,000	-,0641	,0641
	15	17	,00000	,02127	1,000	-,0641	,0641
	16	17	,00000	,02127	1,000	-,0641	,0641
DIA10	1	17	-,00667	,01970	1,000	-,0661	,0527
	2	17	-,00333	,01970	1,000	-,0627	,0561
	3	17	-,01667	,01970	,993	-,0761	,0427
	4	17	,01667	,01970	,993	-,0427	,0761

	5	17	,00333	,01970	1,000	-,0561	,0627
	6	17	,02667	,01970	,821	-,0327	,0861
	7	17	,01667	,01970	,993	-,0427	,0761
	8	17	,03000	,01970	,706	-,0294	,0894
	9	17	-,01667	,01970	,993	-,0761	,0427
	10	17	-,00333	,01970	1,000	-,0627	,0561
	11	17	-,02667	,01970	,821	-,0861	,0327
	12	17	-,00667	,01970	1,000	-,0661	,0527
	13	17	,01000	,01970	1,000	-,0494	,0694
	14	17	,03667	,01970	,464	-,0227	,0961
	15	17	,02000	,01970	,968	-,0394	,0794
	16	17	,04000	,01970	,358	-,0194	,0994
DIA20	1	17	-,11667	3,28541	1,000	-10,0230	9,7896
	2	17	-,10333	3,28541	1,000	-10,0096	9,8030
	3	17	-,15333	3,28541	1,000	-10,0596	9,7530
	4	17	-,09333	3,28541	1,000	-9,9996	9,8130
	5	17	-,12000	3,28541	1,000	-10,0263	9,7863
	6	17	-,06667	3,28541	1,000	-9,9730	9,8396
	7	17	-,10667	3,28541	1,000	-10,0130	9,7996
	8	17	-,09000	3,28541	1,000	-9,9963	9,8163
	9	17	-,14333	3,28541	1,000	-10,0496	9,7630
	10	17	-,11333	3,28541	1,000	-10,0196	9,7930
	11	17	-,16667	3,28541	1,000	-10,0730	9,7396
	12	17	-,12000	3,28541	1,000	-10,0263	9,7863
	13	17	-,09000	3,28541	1,000	-9,9963	9,8163

	14	17	-,04667	3,28541	1,000	-9,9530	9,8596
	15	17	9,48333	3,28541	,067	-,4230	19,3896
	16	17	-,04000	3,28541	1,000	-9,9463	9,8663
DIA30	1	17	-,28333	3,78225	1,000	-11,6877	11,1211
	2	17	-,25000	3,78225	1,000	-11,6544	11,1544
	3	17	-,30000	3,78225	1,000	-11,7044	11,1044
	4	17	-,21667	3,78225	1,000	-11,6211	11,1877
	5	17	-,24000	3,78225	1,000	-11,6444	11,1644
	6	17	-,12667	3,78225	1,000	-11,5311	11,2777
	7	17	-,21667	3,78225	1,000	-11,6211	11,1877
	8	17	-,20000	3,78225	1,000	-11,6044	11,2044
	9	17	-,25667	3,78225	1,000	-11,6611	11,1477
	10	17	-,22000	3,78225	1,000	-11,6244	11,1844
	11	17	-,32667	3,78225	1,000	-11,7311	11,0777
	12	17	21,56000*	3,78225	,000	10,1556	32,9644
	13	17	-,19000	3,78225	1,000	-11,5944	11,2144
	14	17	-,10667	3,78225	1,000	-11,5111	11,2977
	15	17	-,13667	3,78225	1,000	-11,5411	11,2677
	16	17	-,06333	3,78225	1,000	-11,4677	11,3411

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

Anexo N° 8. ANOVA de pH en muestra de queso almacenado a 25°C

		ANOVA pH				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
DIA0	Entre grupos	,000	16	,000	,000	1,000
	Dentro de grupos	,025	34	,001		
	Total	,025	50			
DIA10	Entre grupos	5,600	16	,350	526,590	,000
	Dentro de grupos	,023	34	,001		
	Total	5,623	50			
DIA20	Entre grupos	6,183	16	,386	490,220	,000
	Dentro de grupos	,027	34	,001		
	Total	6,209	50			
DIA30	Entre grupos	6,553	16	,410	523,506	,000
	Dentro de grupos	,027	34	,001		
	Total	6,580	50			

Anexo N° 8.1. Prueba de comparación Dunnett en variable (pH)

Comparaciones múltiples

T de Dunnett (bilateral)^a

Variable dependiente	(I) TRATAMIENTOS	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
		TRATAMIENTOS				Límite inferior	Límite superior
DIA0	1	17	,000000	,022140	1,000	-,06676	,06676
	2	17	,000000	,022140	1,000	-,06676	,06676
	3	17	,000000	,022140	1,000	-,06676	,06676
	4	17	,000000	,022140	1,000	-,06676	,06676
	5	17	,000000	,022140	1,000	-,06676	,06676
	6	17	,000000	,022140	1,000	-,06676	,06676
	7	17	,000000	,022140	1,000	-,06676	,06676
	8	17	,000000	,022140	1,000	-,06676	,06676
	9	17	,000000	,022140	1,000	-,06676	,06676
	10	17	,000000	,022140	1,000	-,06676	,06676
	11	17	,000000	,022140	1,000	-,06676	,06676
	12	17	,000000	,022140	1,000	-,06676	,06676
	13	17	,000000	,022140	1,000	-,06676	,06676
	14	17	,000000	,022140	1,000	-,06676	,06676
	15	17	,000000	,022140	1,000	-,06676	,06676
	16	17	,000000	,022140	1,000	-,06676	,06676
DIA10	1	17	,890000*	,021051	,000	,82653	,95347
	2	17	,870000*	,021051	,000	,80653	,93347
	3	17	,890000*	,021051	,000	,82653	,95347
	4	17	,850000*	,021051	,000	,78653	,91347

	5	17	,870000*	,021051	,000	,80653	,93347
	6	17	,810000*	,021051	,000	,74653	,87347
	7	17	,830000*	,021051	,000	,76653	,89347
	8	17	,810000*	,021051	,000	,74653	,87347
	9	17	,880000*	,021051	,000	,81653	,94347
	10	17	,870000*	,021051	,000	,80653	,93347
	11	17	,890000*	,021051	,000	,82653	,95347
	12	17	,870000*	,021051	,000	,80653	,93347
	13	17	,830000*	,021051	,000	,76653	,89347
	14	17	,090000*	,021051	,002	,02653	,15347
	15	17	,170000*	,021051	,000	,10653	,23347
	16	17	,070000*	,021051	,024	,00653	,13347
DIA20	1	17	,900000*	,022924	,000	,83088	,96912
	2	17	,870000*	,022924	,000	,80088	,93912
	3	17	,880000*	,022924	,000	,81088	,94912
	4	17	,840000*	,022924	,000	,77088	,90912
	5	17	,880000*	,022924	,000	,81088	,94912
	6	17	,800000*	,022924	,000	,73088	,86912
	7	17	,820000*	,022924	,000	,75088	,88912
	8	17	,780000*	,022924	,000	,71088	,84912
	9	17	,890000*	,022924	,000	,82088	,95912
	10	17	,870000*	,022924	,000	,80088	,93912
	11	17	,900000*	,022924	,000	,83088	,96912
	12	17	,860000*	,022924	,000	,79088	,92912
	13	17	,810000*	,022924	,000	,74088	,87912

	14	17	,020000	,022924	,991	-,04912	,08912
	15	17	,070000*	,022924	,046	,00088	,13912
	16	17	,060000	,022924	,120	-,00912	,12912
DIA30	1	17	1,000000*	,022838	,000	,93114	1,06886
	2	17	,940000*	,022838	,000	,87114	1,00886
	3	17	,960000*	,022838	,000	,89114	1,02886
	4	17	,930000*	,022838	,000	,86114	,99886
	5	17	,940000*	,022838	,000	,87114	1,00886
	6	17	,900000*	,022838	,000	,83114	,96886
	7	17	,920000*	,022838	,000	,85114	,98886
	8	17	,850000*	,022838	,000	,78114	,91886
	9	17	,930000*	,022838	,000	,86114	,99886
	10	17	,950000*	,022838	,000	,88114	1,01886
	11	17	1,020000*	,022838	,000	,95114	1,08886
	12	17	,740000*	,022838	,000	,67114	,80886
	13	17	,500000*	,022838	,000	,43114	,56886
	14	17	,100000*	,022838	,001	,03114	,16886
	15	17	,130000*	,022838	,000	,06114	,19886
	16	17	,140000*	,022838	,000	,07114	,20886

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

Anexo N° 9. ANOVA de FIRMEZA en muestras de queso almacenado a 25°C

ANOVA FIRMEZA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
DIA0	Entre grupos	,000	16	,000	,003	1,000
	Dentro de grupos	,021	34	,001		
	Total	,021	50			
DIA10	Entre grupos	21,976	16	1,373	2930,842	,000
	Dentro de grupos	,016	34	,000		
	Total	21,991	50			
DIA20	Entre grupos	46,786	16	2,924	7204,374	,000
	Dentro de grupos	,014	34	,000		
	Total	46,800	50			
DIA30	Entre grupos	46932,781	16	2933,299	3,930	,000
	Dentro de grupos	25375,817	34	746,348		
	Total	72308,597	50			

Anexo N° 9.1. Prueba de comparación Dunnett en variable (Firmeza)

Comparaciones múltiples

T de Dunnett (bilateral)^a

Variable dependiente	(I) TRATAMIENTOS	(J) TRATAMIENTOS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
DIA0	1,00	17,00	-,00333	,02052	1,000	-,0652	,0585
	2,00	17,00	,00000	,02052	1,000	-,0619	,0619
	3,00	17,00	,00000	,02052	1,000	-,0619	,0619
	4,00	17,00	,00000	,02052	1,000	-,0619	,0619
	5,00	17,00	,00000	,02052	1,000	-,0619	,0619
	6,00	17,00	,00000	,02052	1,000	-,0619	,0619
	7,00	17,00	,00000	,02052	1,000	-,0619	,0619
	8,00	17,00	,00000	,02052	1,000	-,0619	,0619
	9,00	17,00	,00000	,02052	1,000	-,0619	,0619
	10,00	17,00	,00000	,02052	1,000	-,0619	,0619
	11,00	17,00	,00000	,02052	1,000	-,0619	,0619
	12,00	17,00	,00000	,02052	1,000	-,0619	,0619
	13,00	17,00	,00000	,02052	1,000	-,0619	,0619
	14,00	17,00	,00000	,02052	1,000	-,0619	,0619
	15,00	17,00	,00000	,02052	1,000	-,0619	,0619
	16,00	17,00	,00000	,02052	1,000	-,0619	,0619
DIA10	1,00	17,00	-1,74333*	,01768	,000	-1,7966	-1,6900
	2,00	17,00	-1,58000*	,01768	,000	-1,6333	-1,5267

	3,00	17,00	-1,76000*	,01768	,000	-1,8133	-1,7067
	4,00	17,00	-1,72333*	,01768	,000	-1,7766	-1,6700
	5,00	17,00	-1,66000*	,01768	,000	-1,7133	-1,6067
	6,00	17,00	-1,45000*	,01768	,000	-1,5033	-1,3967
	7,00	17,00	-1,23000*	,01768	,000	-1,2833	-1,1767
	8,00	17,00	-1,18000*	,01768	,000	-1,2333	-1,1267
	9,00	17,00	-1,80000*	,01768	,000	-1,8533	-1,7467
	10,00	17,00	-1,68000*	,01768	,000	-1,7333	-1,6267
	11,00	17,00	-1,77000*	,01768	,000	-1,8233	-1,7167
	12,00	17,00	-1,72000*	,01768	,000	-1,7733	-1,6667
	13,00	17,00	-,68000*	,01768	,000	-,7333	-,6267
	14,00	17,00	-,24000*	,01768	,000	-,2933	-,1867
	15,00	17,00	-,17000*	,01768	,000	-,2233	-,1167
	16,00	17,00	-,13000*	,01768	,000	-,1833	-,0767
DIA20	1,00	17,00	-2,97667*	,01645	,000	-3,0263	-2,9271
	2,00	17,00	-2,92000*	,01645	,000	-2,9696	-2,8704
	3,00	17,00	-3,08667*	,01645	,000	-3,1363	-3,0371
	4,00	17,00	-2,97000*	,01645	,000	-3,0196	-2,9204
	5,00	17,00	-2,95333*	,01645	,000	-3,0029	-2,9037
	6,00	17,00	-2,82000*	,01645	,000	-2,8696	-2,7704
	7,00	17,00	-2,51000*	,01645	,000	-2,5596	-2,4604
	8,00	17,00	-2,47000*	,01645	,000	-2,5196	-2,4204
	9,00	17,00	-3,17000*	,01645	,000	-3,2196	-3,1204
	10,00	17,00	-3,01000*	,01645	,000	-3,0596	-2,9604
	11,00	17,00	-3,28000*	,01645	,000	-3,3296	-3,2304

	12,00	17,00	-2,98000*	,01645	,000	-3,0296	-2,9304
	13,00	17,00	-1,67000*	,01645	,000	-1,7196	-1,6204
	14,00	17,00	-1,29000*	,01645	,000	-1,3396	-1,2404
	15,00	17,00	-1,11000*	,01645	,000	-1,1596	-1,0604
	16,00	17,00	-,83000*	,01645	,000	-,8796	-,7804
DIA30	1,00	17,00	-3,83667	22,30617	1,000	-71,0953	63,4219
	2,00	17,00	-3,78000	22,30617	1,000	-71,0386	63,4786
	3,00	17,00	-3,96000	22,30617	1,000	-71,2186	63,2986
	4,00	17,00	-3,87000	22,30617	1,000	-71,1286	63,3886
	5,00	17,00	-3,87000	22,30617	1,000	-71,1286	63,3886
	6,00	17,00	-3,73000	22,30617	1,000	-70,9886	63,5286
	7,00	17,00	-3,04000	22,30617	1,000	-70,2986	64,2186
	8,00	17,00	-3,05000	22,30617	1,000	-70,3086	64,2086
	9,00	17,00	-4,14000	22,30617	1,000	-71,3986	63,1186
	10,00	17,00	-3,92000	22,30617	1,000	-71,1786	63,3386
	11,00	17,00	125,82000*	22,30617	,000	58,5614	193,0786
	12,00	17,00	-3,77000	22,30617	1,000	-71,0286	63,4886
	13,00	17,00	-2,16000	22,30617	1,000	-69,4186	65,0986
	14,00	17,00	-1,91000	22,30617	1,000	-69,1686	65,3486
	15,00	17,00	-2,16000	22,30617	1,000	-69,4186	65,0986
	16,00	17,00	-1,02000	22,30617	1,000	-68,2786	66,2386

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

Anexo N° 10. ANOVA de PERDIDA DE PESO en muestras de queso almacenado a 25°C

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
DIA0	Entre grupos	,009	16	,001	3,126	,003
	Dentro de grupos	,006	34	,000		
	Total	,014	50			
DIA10	Entre grupos	38,060	16	2,379	4852,638	,000
	Dentro de grupos	,017	34	,000		
	Total	38,077	50			
DIA20	Entre grupos	57,326	16	3,583	6322,710	,000
	Dentro de grupos	,019	34	,001		
	Total	57,345	50			
DIA30	Entre grupos	959,662	16	59,979	130723,154	,000
	Dentro de grupos	,016	34	,000		
	Total	959,677	50			

Anexo N° 10.1. Prueba de comparación Dunnett en variable (Pérdida de Peso)

Comparaciones múltiples

T de Dunnett (bilateral)^a

Variable dependiente	(I) TRATAMIENTOS	(J) TRATAMIENTOS	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
DIA0	1,00	17,00	-,04333*	,01066	,003	-,0755	-,0112
	2,00	17,00	-,03667*	,01066	,018	-,0688	-,0045
	3,00	17,00	-,05000*	,01066	,001	-,0822	-,0178
	4,00	17,00	-,04333*	,01066	,003	-,0755	-,0112
	5,00	17,00	-,04667*	,01066	,001	-,0788	-,0145
	6,00	17,00	-,04667*	,01066	,001	-,0788	-,0145
	7,00	17,00	-,02667	,01066	,153	-,0588	,0055
	8,00	17,00	-,03333*	,01066	,039	-,0655	-,0012
	9,00	17,00	-,04667*	,01066	,001	-,0788	-,0145
	10,00	17,00	-,03667*	,01066	,018	-,0688	-,0045
	11,00	17,00	-,02667	,01066	,153	-,0588	,0055
	12,00	17,00	-,03667*	,01066	,018	-,0688	-,0045
	13,00	17,00	-,03667*	,01066	,018	-,0688	-,0045
	14,00	17,00	-,05333*	,01066	,000	-,0855	-,0212
	15,00	17,00	-,01667	,01066	,676	-,0488	,0155
	16,00	17,00	-,04333*	,01066	,003	-,0755	-,0112
DIA10	1,00	17,00	-1,36333*	,01808	,000	-1,4178	-1,3088
	2,00	17,00	-,35000*	,01808	,000	-,4045	-,2955
	3,00	17,00	-2,68000*	,01808	,000	-2,7345	-2,6255

	4,00	17,00	-,33000*	,01808	,000	-,3845	-,2755
	5,00	17,00	-,48000*	,01808	,000	-,5345	-,4255
	6,00	17,00	-,19000*	,01808	,000	-,2445	-,1355
	7,00	17,00	-,26000*	,01808	,000	-,3145	-,2055
	8,00	17,00	-,33000*	,01808	,000	-,3845	-,2755
	9,00	17,00	-1,94000*	,01808	,000	-1,9945	-1,8855
	10,00	17,00	-1,01000*	,01808	,000	-1,0645	-,9555
	11,00	17,00	-2,71000*	,01808	,000	-2,7645	-2,6555
	12,00	17,00	-1,65000*	,01808	,000	-1,7045	-1,5955
	13,00	17,00	-,79000*	,01808	,000	-,8445	-,7355
	14,00	17,00	-,34000*	,01808	,000	-,3945	-,2855
	15,00	17,00	-,13000*	,01808	,000	-,1845	-,0755
	16,00	17,00	-,11000*	,01808	,000	-,1645	-,0555
DIA20	1,00	17,00	-,87667*	,01944	,000	-,9353	-,8181
	2,00	17,00	-1,03000*	,01944	,000	-1,0886	-,9714
	3,00	17,00	-2,75000*	,01944	,000	-2,8086	-2,6914
	4,00	17,00	-1,02000*	,01944	,000	-1,0786	-,9614
	5,00	17,00	-,83000*	,01944	,000	-,8886	-,7714
	6,00	17,00	-,10000*	,01944	,000	-,1586	-,0414
	7,00	17,00	-,39000*	,01944	,000	-,4486	-,3314
	8,00	17,00	-1,00000*	,01944	,000	-1,0586	-,9414
	9,00	17,00	-1,85000*	,01944	,000	-1,9086	-1,7914
	10,00	17,00	-2,51000*	,01944	,000	-2,5686	-2,4514
	11,00	17,00	-3,49000*	,01944	,000	-3,5486	-3,4314
	12,00	17,00	-3,01000*	,01944	,000	-3,0686	-2,9514

	13,00	17,00	-,74000*	,01944	,000	-,7986	-,6814
	14,00	17,00	-,97000*	,01944	,000	-1,0286	-,9114
	15,00	17,00	-,11000*	,01944	,000	-,1686	-,0514
	16,00	17,00	-,22000*	,01944	,000	-,2786	-,1614
DIA30	1,00	17,00	-11,93000*	,01749	,000	-11,9827	-11,8773
	2,00	17,00	-3,25000*	,01749	,000	-3,3027	-3,1973
	3,00	17,00	-12,94000*	,01749	,000	-12,9927	-12,8873
	4,00	17,00	-3,04000*	,01749	,000	-3,0927	-2,9873
	5,00	17,00	-2,86000*	,01749	,000	-2,9127	-2,8073
	6,00	17,00	-2,00000*	,01749	,000	-2,0527	-1,9473
	7,00	17,00	-3,06000*	,01749	,000	-3,1127	-3,0073
	8,00	17,00	-3,03000*	,01749	,000	-3,0827	-2,9773
	9,00	17,00	-5,65000*	,01749	,000	-5,7027	-5,5973
	10,00	17,00	-10,88000*	,01749	,000	-10,9327	-10,8273
	11,00	17,00	-13,01000*	,01749	,000	-13,0627	-12,9573
	12,00	17,00	-6,93000*	,01749	,000	-6,9827	-6,8773
	13,00	17,00	-2,03000*	,01749	,000	-2,0827	-1,9773
	14,00	17,00	-1,28000*	,01749	,000	-1,3327	-1,2273
	15,00	17,00	-1,18000*	,01749	,000	-1,2327	-1,1273
	16,00	17,00	-1,05000*	,01749	,000	-1,1027	-,9973

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.