

COMPARACIÓN DEL EMPLEO DE NISINA Y CULTIVOS DE *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PARA LA BIOPRESERVACIÓN DE QUESO BLANCO.

Comparison of Nisin and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Cultures for Biopreservation of White Cheese.

Gustavo Castro^{1*}, Emiro Valbuena¹, Wilfido Bríñez¹, Egar Sánchez², Henry Vera¹ y Armando Tovar¹

¹Unidad de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. ²Unidad de Bioestadística. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. *E-mail: gcastro@luz.edu.ve

RESUMEN

La principal enfermedad transmitida por alimentos en Venezuela es la intoxicación estafilocócica y es el queso blanco el principal alimento involucrado. La nisina es una bacteriocina capaz de frenar el crecimiento de microorganismos Gram positivos, entre ellos *Staphylococcus aureus*. Una de las limitaciones de su uso es su alto costo. El empleo de cultivos iniciadores productores de bacteriocinas, representa una alternativa para elaboración de quesos con mejor calidad microbiológica. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto biopreservador del *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (ATCC 11454) y compararlo con la adición de nisina a la leche. Para ello se elaboraron cinco tipos de quesos con leche pasteurizada: control; con *L. lactis*; con *L. lactis* y *S. aureus*; con *S. aureus*; con *S. aureus* y nisina. Las determinaciones microbiológicas y físico-químicas se realizaron de acuerdo a las normas COVENIN. La concentración de nisina se determinó mediante la técnica de difusión en agar. Los datos se analizaron utilizando el análisis de varianza y se probaron las medias por el método de los mínimos cuadrados. Se encontró producción de nisina por parte del cultivo iniciador, pero en bajas concentraciones. En los quesos elaborados con leche a la que se le inoculó *S. aureus* (10^3 ufc/mL) no se encontró efecto inhibitor del cultivo sobre este microorganismo patógeno. Sin embargo, los quesos elaborados con *Lactococcus* sin inoculación de *Staphylococcus* y los quesos elaborados con nisina, presentaron escaso crecimiento de estafilococos y de bacterias coliformes. La nisina resultó ser más eficiente para lograr biopreservación de los quesos blancos, aunque la utilización del cultivo iniciador produc-

tor de la bacteriocina, permitió obtener quesos con bajo conteo de patógenos, cuando la carga microbiana inicial en la leche era escasa.

Palabras clave: Nisina, *Lactococcus lactis*, queso blanco, biopreservación.

ABSTRACT

The main disease transmitted by foods in Venezuela is the staphylococci poisoning, and it is white cheeses the most involved food. The nisin is a bacteriocin able to inhibit the growth of Gram positive microorganisms; among them, *Staphylococcus aureus*. One of the limitations of its use is its high cost. The use of bacteriocin producing starter cultures represents an alternative for milk industry. The objective of the present study was to evaluate the biopreserving effect of the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (ATCC 11454) and to compare it with the addition of nisin to milk. Five types of cheese from pasteurized milk were elaborated: control; addition of *L. lactis*; addition of *L. lactis* and *S. aureus*; addition of *S. aureus*; addition of nisin and *S. aureus*. Both, microbiological and physical-chemical determinations were made according to COVENIN. The nisin concentration was measured using the agar diffusion technique. The data was analyzed with an analysis of variance and testing the means by the method of least squares means. The starter cultures produced nisin, but in low amounts. In cheeses elaborated with milk inoculated with *S. aureus* (10^3 ufc/mL), no inhibiting effect of the culture on this pathogenic microorganism was observed. Nevertheless, cheeses elaborated with both, *Lactococcus* without inoculation of *Staphylococcus* and with nisin, presented little growth of *Staphylococcus* and coliforms. Nisin was more efficient to obtain biopreservation of white cheeses, although the use of producing bacteriocin starter cul-

ture, allowed to obtain cheeses with low counts of pathogens, if the initial contamination of the milk was low.

Key words: Nisin, *Lactococcus lactis*, white cheese, biopreservation.

INTRODUCCIÓN

El queso blanco es considerado como el producto lácteo de mayor consumo y el más popular en América Latina y Venezuela [1, 22]. También es el principal alimento involucrado en casos de intoxicación estafilocócica, principal enfermedad transmitida por alimentos (ETA) del país, causada por toxinas producidas por algunas cepas de *Staphylococcus aureus* [31, 32, 35].

Aproximadamente el 50% de la producción nacional de quesos se realiza mediante procesos artesanales o semi-industriales [7], para lo cual generalmente se emplea leche cruda, muchas veces obtenida bajo un ambiente antihigiénico para el ordeño. Esa elaboración artesanal se da, tanto en pequeñas plantas procesadoras como en las mismas unidades de explotación lechera, dando origen a lo que se conoce popularmente como “queso de matera”. A nivel semi-industrial, aunque se cuente con tecnologías que mejoran la productividad, existen muchas fallas en cuanto a normas sanitarias, en parte quizás debido a la escasa formación técnica del personal [7]. De allí que no sorprende que sean los productos lácteos, específicamente los quesos blancos, los involucrados en la mayoría de los casos de ETA en Venezuela.

Según la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN), la leche utilizada para la elaboración de queso blanco debe ser pasteurizada [18], pero la pasteurización por sí sola no representa la solución a los casos de intoxicación estafilocócica, ya que el proceso logra destruir al *Staphylococcus aureus*, pero no a la toxina causante de la enfermedad. Es por ello que la solución debe abarcar las condiciones higiénico-sanitarias durante el ordeño y manejo de la leche antes del procesamiento. Se debe tener en cuenta además, que éste microorganismo constituye parte de la flora bacteriana de animales y humanos, siendo éstos considerados como los principales reservorios, aunque también se puede encontrar en el agua, suelo, polvo, aire o equipos empleados en la elaboración de alimentos [8]. En consecuencia, si se tiene un manejo poco cuidadoso de los productos terminados, existe la posibilidad de que los quesos se contaminen con el patógeno y con ello el riesgo de producir ETA.

La industria tiene la alternativa de emplear preservativos biológicos o biopreservadores, para satisfacer el interés de los consumidores por obtener alimentos inocuos y naturales, es decir, elaborados con estricto control de calidad sanitaria y sin la adición de aditivos químicos artificiales [25]. El *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* es una bacteria ácido láctica (BAL) con propiedades biopreservadoras, ya que algunas cepas son capa-

ces de producir nisina, una bacteriocina ampliamente usada en la industria alimentaria y generalmente reconocida como segura (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO) en 1969 [43]. Numerosos estudios han sido publicados reportando la eficacia de la nisina para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, entre ellas *Listeria monocytogenes* y *Clostridium* spp.; sin embargo, son escasos los que demuestran la efectividad sobre *Staphylococcus aureus* [30, 36, 37, 43].

Uno de los inconvenientes que tiene el uso de nisina como aditivo en alimentos es su elevado costo como materia prima, por lo que la utilización de cultivos microbianos productores de bacteriocinas, puede ser una alternativa prominente para mejorar la calidad e inocuidad de los alimentos manteniendo bajos los costos de producción.

El objetivo del presente trabajo fue el de evaluar el efecto biopreservador de cultivos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* productores de nisina, en quesos blancos elaborados con leche de vaca (*Bos taurus-indicus*) pasteurizada y compararlo con la utilización de la bacteriocina adicionada directamente a la leche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó leche cruda fresca obtenida a nivel de recepción de una planta quesera ubicada en la ciudad de Maracaibo. La leche fue transportada refrigerada hasta el laboratorio de Ciencia y Tecnología de la Leche de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, donde se evaluó su calidad sanitaria y físico-química mediante prueba de la acidez titulable (AT), alcohol, punto crioscópico así como el contenido de sólidos totales (ST), grasa (G) y sólidos no grasos (SNG). Posteriormente, la leche se pasteurizó a 65°C por 30 minutos en baño maría y seguidamente se le realizó el recuento de aerobios mesófilos (RAM), recuento de bacterias coliformes (RBC) y recuento de *Staphylococcus aureus* (RSa).

Con la leche pasteurizada se elaboraron los quesos para los diferentes tratamientos, a los cuales se les evaluó la composición físico-química (ST, humedad sin materia grasa (HSMG), grasa en el extracto seco (GES) y contenido de sal) y la calidad microbiológica (RAM, RBC y RSa). El RAM y RBC solo se realizó a los tratamientos CONTROL, LACTIS, LACTIS+S Y NISINA. Adicionalmente se determinó la concentración de nisina. Las determinaciones físico-químicas y microbiológicas se realizaron de acuerdo a lo establecido en las normas COVENIN respectivas [9-20].

Tratamientos experimentales y elaboración de quesos

Se elaboraron cinco tipos de quesos blancos, de acuerdo a los diferentes tratamientos experimentales que se indican a continuación: queso blanco con cultivo iniciador de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, denominado tratamiento LACTIS;

queso blanco con cultivo iniciador de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y *Staphylococcus aureus*, denominado LACTIS+S; queso blanco con cultivo de *Staphylococcus aureus*, denominado STAPH; queso blanco con cultivo de *Staphylococcus aureus* y adición de nisina, denominado NISINA y queso blanco control (sin adición de ningún cultivo), denominado CONTROL.

La elaboración de los quesos se realizó según el procedimiento siguiente:

1. La leche se pasteurizó a 65°C por 30 minutos y se enfrió a 37°C, temperatura a la cual se mantuvo hasta la coagulación. Posteriormente se llenaron 5 recipientes de acero inoxidable con aprox. 3 L de leche, uno para cada tratamiento.
2. Se adicionó el cultivo iniciador de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* al 2% a los tratamientos LACTIS y LACTIS+S y se dejó la leche en reposo por 30 minutos. La población inicial se estimó en 10^4 ufc/mL.
3. Posteriormente se adicionó el cultivo de *Staphylococcus aureus* a los tratamientos LACTIS+S, STAPH y NISINA para obtener una población inicial de 10^3 ufc/mL. Al mismo tiempo se mezcló la leche con 0,02% de cloruro de calcio en solución al 10% (a todos los tratamientos) y al tratamiento NISINA, se adicionó 200 mg/Kg de Nisaplin® (Danisco, Grindsted, Dinamarca) para alcanzar una dosis aproximada de nisina en la leche de 200 UI/g. La leche se dejó en reposo por 5 minutos.
4. Se adicionó el cuajo siguiendo las indicaciones del fabricante (Marshall®, Danisco Colombia Ltda., Bogotá, Colombia), se mezcló y se dejó en reposo hasta alcanzar la coagulación de la leche, aprox. 40 minutos.
5. La cuajada se cortó con liras, hasta obtener granos de 1 cm de diámetro aproximadamente, mientras se elevó la temperatura hasta alcanzar 40°C.
6. Se adicionó la sal (NaCl) a razón de 2,5% del volumen inicial de leche y se mantuvo en agitación por 20 minutos.
7. La cuajada se llevó a los moldes para luego ser prensada durante 2 horas. Se invirtieron los quesos cada hora para regular su forma y asegurar un desuerado uniforme.
8. Los quesos se almacenaron a temperatura de refrigeración (aprox. 7°C) durante 10 días y cada dos días se tomaron muestras para su análisis.

Determinación de nisina

El contenido de nisina a los tratamientos CONTROL, LACTIS, LACTIS+S y NISINA, se realizó según la metodología descrita por el Committee on Food Chemicals Codex [21], utilizando como microorganismo indicador al *Micrococcus luteus* ATCC 10240 y para la curva de calibración se empleó como patrón de nisina muestras de Nisaplin®. Para ello se tomaron 10 g de muestra, los cuales se homogeneizaron con ayuda de

una licuadora (Oster, Sunbeam Products Inc., Venezuela) en 90 mL de ácido clorhídrico al 0,02 N. Las muestras se prepararon de acuerdo a la técnica citada. La determinación se realizó los días 0; 2; 8 y 10 de almacenamiento.

Preparación de los cultivos

Como cultivo iniciador se utilizó una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, productora de nisina. El microorganismo fue mantenido en caldo M-17 (Himedia® Laboratories Limited; Bombai, India) y antes de ser utilizado para la elaboración de los quesos, fue reactivado por incubación en leche descremada estéril durante 24 horas a 37°C. El cultivo en fase estacionaria se mantuvo en refrigeración y justo antes de elaborar los quesos se realizaron diluciones en leche descremada estéril, hasta obtener el título para alcanzar en la leche pasteurizada una población inicial de 10^4 ufc/mL. La cepa de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo empleada en el estudio, fue adquirida del cepario del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia y mantenida en caldo infusión cerebro corazón (Merck & Co, Darmstadt, Alemania). Su preparación se hizo de manera similar a la del cultivo iniciador.

Diseño experimental

Se planteó un diseño completamente aleatorizado, donde las unidades experimentales (10 g de quesos) se asignaron al azar a los tratamientos. Los resultados del experimento se analizaron usando el Modelo Lineal Generalizado del paquete estadístico SAS [42], las medias de tratamientos se compararon a través del método de los mínimos cuadrados y se determinaron las diferencias significativas ($P < 0,05$). Se ejecutaron un total de 4 repeticiones de cada tratamiento. Las variables dependientes fueron RAM, RBC, RSa y concentración de nisina en los quesos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición físico-química de la leche y de los quesos elaborados

Las medias de los valores físico-químicos obtenidos del análisis de la leche cruda utilizada para la elaboración de los quesos fueron: AT $16,50 \pm 2,12\%$, punto crioscópico $-0,538 \pm 0,001^\circ\text{H}$; ST $13,07 \pm 0,09\%$; G $4,10 \pm 0,14\%$ y SNG $8,97 \pm 0,05\%$, los cuales fueron similares a los reportados para la leche de vacas mestizas en el estado Zulia [4] y cumplieron con lo establecido por la norma COVENIN 903-93 [12]; a excepción de la crioscopia que estuvo ligeramente por debajo de lo establecido legalmente.

En el análisis microbiológico de la leche pasteurizada se obtuvieron resultados inferiores a 30 ufc/mL para RAM, RBC y RSa, valores que estuvieron dentro de lo establecido legalmente [15] y que demostraron la efectividad del proceso de pasteurización para asegurar la disminución de la carga bacte-

riana total y de patógenos, permitiendo contar con una materia prima de calidad para la elaboración de los quesos.

La composición físico-química promedio de los quesos blancos elaborados se muestra en la TABLA I. El contenido de GES y HSMG permitió clasificarlos como semi-grasos y blandos [18]. Los quesos blancos se caracterizan por tener un alto contenido de humedad, lo que los hace altamente perecederos [22]. El porcentaje de sal (NaCl) resultó menor que lo esperado (2,5%), por lo que se recomienda el uso de una mayor cantidad de la misma o aumentar el tiempo de salado de los granos de cuajada, para poder alcanzar la concentración final deseada, siguiendo el procedimiento de elaboración señalado en el estudio. La norma COVENIN 3821-2003 establece para quesos blancos frescos un contenido de sal menor o igual al 3%; los quesos elaborados cumplieron con lo establecido en esta norma [18].

Por no haber un proceso estandarizado único para la elaboración de quesos blancos a nivel industrial en Venezuela [1], la composición de éstos varía entre marcas comerciales; adicionalmente existen pocos estudios que permitan definir desde el punto de vista de la composición físico-química, lo que es un queso blanco venezolano.

Recuento de aerobios mesófilos (RAM)

En la TABLA II se pueden observar los resultados obtenidos para el RAM a los 0; 2; 4; 6; 8 y 10 días de almacenamiento de los quesos blancos correspondientes a los diferentes tratamientos. Los tratamientos CONTROL y NISINA resultaron ser diferente estadísticamente a los otros ($P < 0,05$), en todos los días de almacenamiento.

Los quesos elaborados con el cultivo iniciador (LACTIS y LACTIS+S) resultaron iguales entre sí y fueron los que a su vez presentaron mayor población total de microorganismos, posiblemente debido al crecimiento del *Lactococcus lactis*, bacteria anaerobia facultativa y mesófila, cuya población está representada en el RAM. Además, está demostrado que a temperaturas de refrigeración, condiciones bajo las cuales se almacenaron los quesos, éstos pueden crecer [44].

De todos los tratamientos, los quesos elaborados con nisina fueron los que presentaron un RAM significativamente

TABLA I
COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS QESOS
BLANCOS ELABORADOS / PHYSICAL-CHEMICAL
COMPOSITION OF WHITE CHEESE PRODUCED

Variable	$\bar{x} \pm DE$
Humedad (% g/g)	54,60 \pm 2,12
Grasa (% g/g)	19,90 \pm 0,74
Sal (% g/g)	1,92 \pm 0,15
Sólidos Totales (% g/g)	45,40 \pm 2,12
GES (% g/g)	43,91 \pm 2,40
HSMG (% g/g)	68,17 \pm 2,62

menor, lo que demuestra el efecto de ésta sobre la población bacteriana total, cuando es añadida directamente. Esto permite obtener un queso con una vida útil prolongada, ya que el efecto combinado de la refrigeración con la bacteriocina, evita el crecimiento microbiano excesivo [29], como se puede observar en la evolución del RAM para éste tratamiento durante toda la fase de almacenamiento.

Recuento de bacterias coliformes (RBC)

En la TABLA III se presentan los resultados obtenidos para el RBC en los quesos blancos elaborados. En todos los días de almacenamiento el tratamiento CONTROL resultó significativamente diferente ($P < 0,05$) al resto de los tratamientos, por ser estos quesos los que presentaron mayor cantidad de bacterias coliformes. A excepción del tratamiento CONTROL, todos los quesos cumplieron con lo establecido en la Norma COVENIN 3821-2003, en cuanto al contenido de bacterias coliformes [19].

Se observó un efecto significativo del cultivo iniciador sobre el RBC, posiblemente causado por la competencia microbiana por los nutrientes y/o al efecto de la acidez provocada por el cultivo iniciador. Aunque la acidez de los quesos no fue determinada, se conoce que el cultivo utilizado tiene la propiedad de fermentar la lactosa con producción de ácido láctico, lo que causa una disminución del pH, siendo éste uno de los mecanismos de biopreservación de las BAL [26, 40].

TABLA II
VALORES PROMEDIO PARA EL RECuento DE AEROBIOS MESÓFILOS (Log_{10} ufc/g) EN LOS QESOS BLANCOS
ELABORADOS / MEANS FOR AEROBIC MESOPHILE COUNT (Log_{10} ufc/g) IN THE WHITE CHEESE PRODUCED

Tratamientos	Días de almacenamiento					
	0	2	4	6	8	10
CONTROL	6,80 ^b	7,28 ^b	7,6 ^b	7,54 ^b	7,77 ^b	7,97 ^b
LACTIS	7,83 ^a	9,30 ^a	9,06 ^a	8,96 ^a	8,93 ^a	9,09 ^a
LACTIS+S	8,32 ^a	9,00 ^a	8,52 ^{ab}	8,45 ^a	8,67 ^a	8,66 ^a
NISINA	4,61 ^c	4,70 ^c	4,53 ^c	5,60 ^c	4,14 ^c	5,23 ^c

Letras diferentes en superíndice en la misma columna indican diferencia significativa ($P < 0,05$).

Estos resultados son semejantes a los reportados por Salinas [38], quien encontró en quesos blancos elaborados con cultivos de *Enterococcus* productores de bacteriocinas, baja población de bacterias coliformes al compararlos con los quesos controles, lo que se debió al efecto de la acidez generada por el metabolismo fermentativo de los cultivos y con lo observado por Rodríguez y col. [36], que utilizando cultivos de *Lactococcus* productores de nisina y pediocina encontraron un efecto inhibitorio de *Escherichia coli* O57:H7 en quesos durante la maduración. Spelhaug y col. [41], empleó la misma cepa de *Lactococcus* (ATCC 11454) en un estudio realizado *in vitro*, encontró inhibición leve del crecimiento de gérmenes Gram negativos como la *Escherichia coli* O157:H7.

Estudios previos han reportado la incapacidad de la nisina para inhibir el crecimiento de microorganismos Gram negativos, hecho que se atribuye a su mecanismo de acción sobre la membrana citoplasmática donde forma poros que facilitan la salida de componentes esenciales para la supervivencia bacteriana [43]. Las bacterias Gram negativas poseen una pared celular que evita la acción de la nisina. Sin embargo, algunos investigadores han demostrado que tratamientos previos aplicados a los cultivos como la utilización de quelantes tipo EDTA, pueden incrementar la sensibilidad de las bacterias Gram negativas frente a esta bacteriocina, pero dicho efecto se ve disminuido en productos lácteos fermentados sobre todo cuando la producción es *in situ*, porque la acidez antagoniza la acción de los quelantes [2].

Se ha demostrado también que un choque térmico puede aumentar la sensibilidad de la célula bacteriana Gram negativa a la nisina, aunque el efecto ocurre mayormente cuando la bacteriocina está presente durante el tratamiento térmico y no cuando se adiciona después, debido a que las células pueden recuperarse del efecto negativo causado por las temperaturas elevadas [3]. En este estudio, la leche fue pasteurizada a 65°C por 30 minutos y la nisina fue adicionada después de la pasteurización; sin embargo, se observó en los quesos una menor cantidad de coliformes totales con respecto al control (P<0,05).

Estos resultados concuerdan con los encontrados por Cutter y Siragusa [23], quienes reportaron actividad inhibitoria de nisina frente a bacterias Gram negativas y son contrarios a los reportados por Salinas [38], que demostró un efecto nulo de la nisina sobre la flora coliforme.

Recuento de *Staphylococcus aureus* (RSa)

La TABLA IV muestra los resultados obtenidos para el RSa en los quesos blancos. En los tratamientos LACTIS y NISINA no se logró aislar ninguna colonia de *Staphylococcus*, demostrándose por un lado, la efectividad de la nisina para inhibir su crecimiento y por el otro, la capacidad del cultivo iniciador para evitar la contaminación con el patógeno. Se observó un efecto bactericida inmediato de la nisina en la leche sobre el *Staphylococcus*, efecto que también ha sido observado sobre *Listeria monocytogenes* por Samelis y col. [39].

TABLA III
VALORES PROMEDIO PARA EL RECUESTO DE BACTERIAS COLIFORMES (Log₁₀ ufc/g) EN LOS QUESOS BLANCOS ELABORADOS / MEANS FOR COLIFORM BACTERIA COUNT (Log₁₀ ufc/g) IN THE WHITE CHEESE PRODUCED

Tratamientos	Días de almacenamiento					
	0	2	4	6	8	10
CONTROL	5,04 ^a	6,21 ^a	5,76 ^a	5,54 ^a	5,61 ^a	6,19 ^a
LACTIS	2,80 ^b	4,58 ^b	2,32 ^b	2,94 ^b	3,30 ^c	2,64 ^c
LACTIS+S	3,43 ^b	3,26 ^c	2,75 ^b	2,38 ^b	2,37 ^b	2,56 ^c
NISINA	3,16 ^b	3,09 ^c	2,65 ^b	3,35 ^b	3,06 ^{bc}	4,07 ^b

Letras diferentes en superíndice en la misma columna indican diferencia significativa (P<0,05).

TABLA IV
VALORES PROMEDIO PARA EL RECUESTO DE *Staphylococcus aureus* (Log₁₀ ufc/g) EN LOS QUESOS BLANCOS ELABORADOS / MEANS FOR *Staphylococcus aureus* (Log₁₀ ufc/g) IN THE WHITE CHEESE PRODUCED

Tratamientos	Días de almacenamiento					
	0	2	4	6	8	10
CONTROL	1,95 ^b	1,44 ^b	2,26 ^b	2,34 ^b	2,30 ^b	3,85 ^b
LACTIS	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c
LACTIS+S	5,74 ^a	6,02 ^a	5,80 ^a	5,89 ^a	5,73 ^a	5,80 ^a
STAPH	5,78 ^a	6,57 ^a	6,14 ^a	6,21 ^a	6,18 ^a	6,24 ^a
NISINA	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c

Letras en superíndice diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (P<0,05).

La norma COVENIN 3821-2003 exige un valor de 1×10^2 (mínimo) y 1×10^3 (máximo) ufc/g de *Staphylococcus aureus* (2 y 3 Log ufc/g, respectivamente) [19], en base a esto se demostró que el empleo de un cultivo iniciador de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y de nisina garantizan un queso blanco libre de estafilococos, si la contaminación inicial en la leche es baja. Salinas, igualmente reportó escaso recuento de *Staphylococcus* en los quesos blancos elaborados con adición de nisina [38].

Cava y col., demostraron la efectividad de la adición de nisina para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en queso blanco de pasta hilada elaborado con leche cruda [6]. Ellos encontraron que la población de éste se redujo a lo largo del periodo de almacenamiento de los quesos, pero no se logró eliminar por completo, contrario a lo observado en el presente estudio, donde en ningún momento se pudo aislar el microorganismo en los quesos elaborados con leche a la cual se le adicionó nisina.

Los tratamientos LACTIS+S y STAPH resultaron iguales ($P > 0,05$), demostrando que el cultivo iniciador no fue efectivo para evitar el crecimiento del *Staphylococcus* cuando la población inicial en leche fue de aproximadamente 1×10^3 ufc/mL, dosis empleada en el tratamiento LACTIS+S. Esto entra en contradicción con lo demostrado por Hamama y col., quienes al utilizar un cultivo de *Lactococcus* productor de nisina, encontraron una reducción de la carga de *Staphylococcus*, aunque en dicho estudio, el efecto biopreservador se vio favorecido a la vez por la alta acidez encontrada en los quesos elaborados [27]. Adicionalmente, Rodríguez y col., también encontraron efecto inhibitorio de cultivos biopreservadores sobre el crecimiento de *Staphylococcus* en quesos [36], al igual que Salinas, cuando utilizó cultivos autóctonos productores de bacteriocinas en la elaboración de quesos blancos [38].

El bajo efecto inhibitorio observado del *Lactococcus lactis* sobre el microorganismo patógeno, pudo ser consecuencia de la escasa producción de bacteriocina por parte del mismo, tal como se puede evidenciar en la TABLA V; por el contrario los estudios mencionados [27, 36, 38], además del efecto inhibitorio, encontraron una notable actividad bacteriocinogénica de los cultivos empleados.

Concentración de nisina

Las medias por cuadrado mínimo para la concentración de nisina en los días 0; 2; 8 y 10 de almacenamiento, se presentan en la TABLA V. En los tratamientos LACTIS y LACTIS+S, se observó un aumento de la concentración a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento, consiguiéndose para el décimo día concentraciones de 59,78 y 9,68 UI/g, respectivamente, lo cual demuestra la capacidad del cultivo para producir la bacteriocina bajo las condiciones de almacenamiento de los quesos. Solo se encontró diferencia estadística entre el tratamiento LACTIS y CONTROL para el día 10, debido a la amplia variabilidad de los resultados obtenidos para las muestras de quesos entre las diferentes repeticiones del experimento.

El método empleado está fundamentado en la técnica de difusión en agar, desarrollada inicialmente por Tramer y Fowler [43]. En la actualidad se han desarrollado nuevos métodos, buscando mejorar algunos de los inconvenientes que presenta esta técnica, como lo son dificultad para leer las zonas de inhibición y aparición de falsas zonas causadas por interferencia de componentes presentes en los diluentes o por efecto del pH [46]. La mayor limitación de la técnica es la difusión de la nisina, la cual es proporcional a su concentración solo en un limitado rango lineal, por lo que la concentración en las muestras debe estar dentro del mismo para alcanzar precisión en las lecturas [28]. Otros factores que pueden afectar los resultados son la sensibilidad del microorganismo de ensayo, cantidad de agar y de surfactante añadido y pasos previos aplicados para mejorar la difusión de la nisina [33]. Algunos investigadores concluyen que en la medición de la concentración de nisina por medio del diámetro de las zonas de inhibición, el grado del error es elevado y la repetitividad baja [5], lo cual puede explicar las amplias variaciones encontradas para esta variable en éste estudio. Sin embargo, esta técnica es la más ampliamente usada para la determinación de nisina en alimentos [45], gracias a la relativa facilidad de ejecución y de consecución de los materiales.

En la TABLA V se puede observar que los resultados para el tratamiento NISINA correspondieron a los valores iniciales aplicados a la leche (200 UI/g). Igualmente la concentración de nisina en los estándares preparados para elaborar la

TABLA V
VALORES PROMEDIO PARA LA CONCENTRACIÓN DE NISINA (UI/g) EN LOS QUESOS BLANCOS ELABORADOS /
MEANS OF NISIN CONCENTRATION (UI/g) IN THE WHITE CHEESE PRODUCED

Tratamientos	Días de almacenamiento			
	0	2	8	10
CONTROL	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^b	0,00 ^c
LACTIS	0,00 ^b	6,60 ^b	39,20 ^b	59,78 ^b
LACTIS+S	0,00 ^b	1,95 ^b	3,60 ^b	9,68 ^c
NISINA	175,28 ^a	172,89 ^a	212,56 ^a	210,65 ^a

Letras en superíndice diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($P < 0,05$).

curva de calibración, se aproximó a los valores teóricos, como se muestra en la TABLA VI.

Se ha reportado que aproximadamente un 20% de la cantidad de nisina se pierde durante el proceso de elaboración de los quesos y durante el almacenamiento en frío de los mismos [24, 43]. No obstante, se pudo observar en el tratamiento NISINA un aumento no significativo ($P>0,05$), de la concentración de la bacteriocina hacia el final del almacenamiento, posiblemente por efecto de concentración causado por la pérdida de humedad de los quesos. La norma COVENIN permite un máximo de 12,5 mg/Kg de nisina equivalente a 500 UI/g [18].

La producción de nisina por parte del cultivo iniciador no fue muy elevada, debido quizás a la población inicial del mismo en la leche, a su estado fisiológico o a las condiciones bajo las cuales se almacenaron los quesos. Zottola y col., encontraron altas concentraciones de nisina en quesos tipo Gouda elaborados con cultivos productores de esta bacteriocina, lo cual les permitió utilizarlos como ingrediente para lograr biopreservación en estos tipos de quesos [47]. También se han descrito concentraciones elevadas de nisina en queso Manchego elaborado con otras cepas de *Lactococcus lactis* productor de nisina [37] y en queso Vidiago [34]. Otros trabajos en los cuales se emplearon cultivos productores de bacteriocinas (diferentes a la nisina), reportan concentraciones significativas de éstas en los quesos elaborados [30, 36].

También se observó que la producción fue menor en aquellos queso a los cuales se les inoculó *Staphylococcus aureus*, presumiblemente debido a un posible antagonismo competitivo que afectó la producción de la nisina por parte del *Lactococcus*.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los quesos elaborados con cultivo iniciador de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, sin inoculación de *Staphylococcus aureus* presentaron bajos recuentos de éste microorganismo y coliformes totales, esto indica que el cultivo iniciador puede ser una alternativa para evitar la contaminación de los quesos por patógenos. Sin embargo, no se pudo observar inhibición cuando el *Staphylococcus aureus* fue inoculado a la leche; lo que hace inferir que su empleo como biopreservador en quesos elaborados con leche pasteurizada inoculada a las concentraciones empleadas, no es efectivo.

El cultivo iniciador de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 utilizado fue capaz de producir nisina en los quesos durante el periodo de almacenamiento, aunque en concentraciones bajas.

La adición de nisina a la leche empleada para la elaboración de quesos blancos, resultó ser eficaz para inhibir el crecimiento de bacterias coliformes y *Staphylococcus aureus* aún cuando la población inicial en la leche era de 10^3 ufc/mL, lo

TABLA VI
CONCENTRACIÓN DE NISINA (UI/mL) DE LOS ESTÁNDARES UTILIZADOS PARA ELABORAR LA CURVA DE CALIBRACIÓN / NISIN CONCENTRATION (UI/mL) OF STANDARDS USED TO CREATED THE CALIBRATION CURVE

Concentración teórica	Concentración ensayada*
1,25	1,13 ± 0,12
2,50	2,74 ± 0,28
5,00	5,22 ± 0,55
10,00	10,27 ± 1,01
20,00	18,90 ± 1,41

* $\bar{x} \pm DE$.

que permite concluir que su uso como biopreservador es eficaz para obtener un producto de buena calidad microbiológica.

La adición de nisina resultó ser más eficiente que el empleo de cultivos iniciadores productores de esta bacteriocina para lograr biopreservación en el queso.

Se recomienda realizar nuevos estudios para evaluar el efecto de la población inicial y estado fisiológico del cultivo de *Lactococcus*, para definir las condiciones que favorecen sus propiedades biopreservadoras.

Se debe estudiar el efecto de la acidez, concentración de sal y condiciones de almacenamiento de los quesos, sobre el efecto biopreservador del cultivo y de la nisina adicionada a la leche para la elaboración de los quesos.

También es necesario evaluar las características organolépticas y el periodo de vida útil de los quesos blancos elaborados con cultivo iniciador de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y con la adición de nisina.

AGRADECIMIENTO

Los autores quieren dejar constancia de su agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia, a la empresa Venelácteos y a la empresa Danisco y Calier Internacional, por el financiamiento otorgado y por haber facilitado información y materiales necesarios para la ejecución del estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARISPE, I.; WHESTHOFF, D. Manufacture and Quality of Venezuelan White Cheese. *J. Food Sci.* 49(4): 1005-1010. 1984.
- [2] BOZIARIS, I.; ADAMS, M. Effect of chelators and nisin produced in situ on inhibition and inactivation of *Gram* negatives. *Int. J. Food Microbiol.* 53: 105-113. 1999.
- [3] BOZIARIS, I.S.; ADAMS, M.R. Temperature shock, injury and transient sensitivity to nisin in *Gram* negatives. *J. Appl. Microbiol.* 91: 715-724. 2001.

- [4] BRÍÑEZ, W.; FARÍA, J.; ISEA, W.; ARANGUREN, J.; VALBUENA, E. Efectos del mestizaje, etapa de lactación y número de partos de la vaca sobre la producción y algunos parámetros de calidad en leche. **Rev. Científ FCV-LUZ**. VI(1): 59-66. 1996.
- [5] CABO, M.; MURADO, M.; GONZÁLEZ, M.; PASTORIZA L. A method for bacteriocin quantification. **J. Appl. Microbiol.** 87: 907-914. 1999.
- [6] CAVA, R.; SANGRONIS, E.; LUCCI, E.; WOYZE-CHOWSKY, L. Efecto de la adición de nisina en queso fresco "telita" sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus*. **An. Venez Nutr.** 19(2): 69-73. 2006.
- [7] CAVILAC. **La industria lechera en Venezuela. Su evolución.** Informe anual de la Cámara Venezolana de la Industria Láctea. Caracas, Venezuela. 28 pp. 2006.
- [8] CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION (CFSAN). Food borne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. US Food and Drug Administration. Estados Unidos. 1998. En línea: <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>. Dic. 2006.
- [9] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Alimentos. Método para recuento de bacterias coliformes en placas de Petri, N° 1086-84. 1984.
- [10] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Alimentos. Método para recuento de colonias de bacterias aerobias en placas de petri. (2da. Revisión) N° 902-87. 1987.
- [11] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Alimentos. Aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus*, N° 1292-89. 1989.
- [12] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Leche cruda, N° 0903-93. 1993.
- [13] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Leche fluida. Determinación de grasa. Método de Gerber, N° 1053-82. 1982.
- [14] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Leche Fluida. Determinación del punto crioscópico, N° 940-82. 1982.
- [15] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Leche Pasteurizada, N° 0798:1994. 1994.
- [16] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Leche y sus derivados. Determinación de cloruros, N° 0362-82. 1982.
- [17] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Leche y sus derivados. Determinación de la Acidez Titulable, N° 0658:1997. 1997.
- [18] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma general de Quesos, N° 1813:2000. 2000.
- [19] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Queso Blanco, N° 3821-2003. 2003.
- [20] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Quesos. Determinación de grasa, N° 1814-81. 1981.
- [21] COMMITTEE ON FOOD CHEMICALS CODEX. **Food Chemicals Codex**. Fourth supplement to the third edition. National Academy Press. Washington D.C. 203-205 pp. 1994.
- [22] CUNNINGHAM, A.I. **Optimización de Rendimientos y Aseguramiento de Inocuidad en la Industria de Quesería. Una guía para la pequeña y mediana empresa.** Organización de los Estados Americanos-Cooperación Alemana para el Desarrollo. 163 pp. 2000.
- [23] CUTTER, C.N.; SIRAGUSA, G.P. Population reductions of Gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. **J. Food Protect.** 58: 977-983. 1995.
- [24] DAVIES, E; BEVIS, H.; DELVES-BROUGHTON, J. The use of bacteriocin, nisin, as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. **Lett. Appl. Microbiol.** 24(5): 343-346. 1997.
- [25] DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: Possibilities and limitations. **Int. Dairy J.** 14: 273-285. 2004.
- [26] GONZÁLEZ, L.; SANDOVAL, H.; SACRISTÁN, N.; CASTRO, J.; FRESNO, J.; TORBADIJO, M. Identification of acid bacteria isolate from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. **Food Contr.** 18: 716-722. 2007.
- [27] HAMAMA, A.; EL HANKOURI, N.; EL AYADI, M. Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese. **Int Dairy J.** 12(11): 933-938. 2002
- [28] HICKMAN, S.; MATTOS, A.; MONTE, R. A modified method for the turbidimetric assay of nisin. **Braz Arch Biol Techn.** 46(3): 479-481. 2003.
- [29] KYKKIDOU, S.; POURNIS, N.; KOSTOULA, O.; SAVVAIDIS, I. Effects of treatment with nisin on the microbial flora and sensory properties of a Greek soft acid-curd cheese stored aerobically at 4°C. **Int. Dairy J.** 17(10): 1254-1258. 2007.
- [30] MACAULIFFE, O.; HILL, C; ROSS, R. P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured

- with lacticin 3147-producing starter culture. **J. Appl. Microbiol.** 86: 251-256. 1999.
- [31] MIRÓ, A.; RÍOS DE S., M. Calidad microbiológica de los quesos blancos venezolanos analizados en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Período enero 1988 a junio 1998. **INHRR.** 30: 14-20. 1999.
- [32] ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS)-ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Representación para Venezuela, Aruba y Antillas Holandesas. Análisis preliminar de la situación de salud en Venezuela. 2004. En línea: <http://www.ops-oms.org/ve/site/venezuela/ven-sit-salud-nuevo.htm>. Dic. 2006.
- [33] PONGTHARANGKUL, T.; DEMICRI, A. Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification. **Appl. Microbiol. Biot.** 65: 268-272. 2004.
- [34] RILLA, N.; MARTÍNEZ, B.; DELGADO, T.; RODRÍGUEZ, A. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. **Int. J. Food Microbiol.** 85(1-2): 23-33. 2003.
- [35] RÍOS DE S., M.; NOVOA, M. Apoyo del departamento de Microbiología de alimentos del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INH "RR") a la investigación de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). **INHRR.** 30: 8-13. 1999.
- [36] RODRIGUEZ, E.; CALZADA, J.; ARQÉS, J., RODRIGUEZ, J.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. **Int. Dairy J.** 15: 51-57. 2005.
- [37] RODRIGUEZ, E.; GAYA, P.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Inhibitory activity of nisin-producing starter culture on *Listeria innocua* in raw ewes milk Manchego cheese. **Int. J. Food Microbiol.** 39: 129-132. 1998.
- [38] SALINAS, B. Producción de queso tipo blanco, utilizando como cultivos iniciadores bacterias productoras de bacteriocinas.. Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia. Trabajo de Grado. 140 pp. 2001.
- [39] SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; ROGGA, K.J.; SAVVAIDIS, I.N.; KONTOMINAS, M.G. Nisin treatments to control *Listeria monocytogenes* post-processing contamination on Anthotyros, a traditional Greek whey cheese, stored at 4°C in vacuum packages. **Food Microbiol.** 20: 661-669. 2003.
- [40] SILLA, M. Utilización de microorganismos fermentadores en al conservación de alimentos. **Rev. Agro. Tecnol.** 25(2): 170-182. 1985.
- [41] SPELHAUG, S.R.; HARLANDER, S.K. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* y *Pedococcus pentosaceus*. **J. Food Prot.** 52(12): 856-862. 1989.
- [42] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS INSTITUTE (SAS). User's guide statistic. Cary, North Carolina. Version 8,1. 646 pp. 2000.
- [43] THOMAS, L.; CLARKSON, M.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin. In: Naidu, A. (Ed) **Natural Food Antimicrobial System**. USA: CRC Press. 463-524 pp. 2000.
- [44] VALBUENA, E.; BARREIRO, J.; SANCHEZ, E.; CASTRO, G.; BRIÑEZ, W.; TOVAR, A. Modelos Cinéticos Aplicados al Crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en Leche. **Rev. Científ. FCV-LUZ.** XV(5): 464-475. 2005.
- [45] WAHLSTRÖM, G.; SARIS, P. A nisin bioassay based on bioluminescence. **Appl. Environ. Microbiol.** 65(4): 3742-3745. 1999.
- [46] WOLF, C.; GIBBSON, W. Improved method for quantification of the bacteriocin nisin. **J. Appl. Bacteriol.** 80: 453-454. 1996.
- [47] ZOTTOLA, E.; YEZZI, T.; AJAO, D.; ROBERT, R. Utilization of cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods. **Int. J. Food Microbiol.** 24(1-2): 227-238. 1994.