

**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
FACULTAD DE INGENIERÍA**



**EVALUACIÓN DE NATAMICINA EN MUESTRAS DE LECHE FLUIDA ENTERA  
SIN TRATAMIENTO TÉRMICO COMO POSIBLE AGENTE ANTIMICROBIANO  
EN LA INDUSTRIA LÁCTEA.**

**Trabajo de graduación presentado por**

**María Stephanie Lissette Linares Saucedo para optar  
al grado académico de Maestría en Tecnología de Alimentos y Gestión**

Guatemala  
2015

**EVALUACIÓN DE NATAMICINA EN MUESTRAS DE LECHE FLUIDA ENTERA  
SIN TRATAMIENTO TÉRMICO COMO POSIBLE AGENTE ANTIMICROBIANO  
EN LA INDUSTRIA LÁCTEA.**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
FACULTAD DE INGENIERÍA**



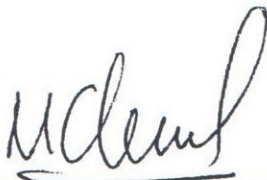
**EVALUACIÓN DE NATAMICINA EN MUESTRAS DE LECHE FLUIDA ENTERA  
SIN TRATAMIENTO TÉRMICO COMO POSIBLE AGENTE ANTIMICROBIANO  
EN LA INDUSTRIA LÁCTEA.**

**Trabajo de graduación presentado por**


**María Stephanie Lissette Linares Saucedo para optar  
al grado académico de Maestría en Tecnología de Alimentos y Gestión**

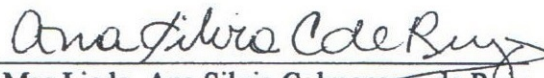
Guatemala  
2015


Vo. Bo.

(f)   
Dra. Marializ Gramajo Rodríguez

Tribunal Examinador

(f)   
~~Msc Licda. Patricia Palacios de Palomo~~

(f)   
Msc Licda. Ana Silvia Colmenares de Ruiz

(f)   
Dra. Marializ Gramajo Rodríguez

Fecha de Aprobación: Guatemala, 24 de Abril de 2015

## PREFACIO

Esta investigación fue elaborada en el período de enero a marzo del año 2015. El objetivo del trabajo consistió en evaluar la actividad antimicrobiana de un preservante utilizado en la industria de alimentos como un anti fúngico efectivo. La búsqueda de una nueva aplicación en el preservante natamicina, surge debido a que los pequeños productores de leche en Guatemala no pueden almacenar por un tiempo mayor a tres días la leche fresca de vaca, y para su preservación necesitan de equipo costoso, que no se encuentra a su alcance. La industria alimenticia posee una variedad de preservantes, de los cuales sus usos han sido revelados al mercado, sin embargo aún pueden investigarse nuevas aplicaciones en el producto, en donde la evidencia científica puede proponerlos como una alternativa en la conservación de alimentos perecederos tales como la leche fluida de vaca sin tratamiento térmico y con esto beneficiar a los productores que no poseen los recursos necesarios para el almacenamiento adecuado y preservación de la leche, evitándoles pérdidas de producto por deterioro y principalmente por contaminación microbiológica. Con los resultados de este estudio pretendo que sean de beneficio para los pequeños productores y promover la investigación en el preservante para que con los resultados que se obtengan pueda ser una alternativa económica para la preservación de alimentos perecederos, principalmente leche fresca fluida.

Agradezco a Dios y a la Virgen María Auxiliadora, por ser mi luz en cada paso de mi vida. A mi madre Norma Saucedo, mi guía, mi apoyo incondicional y mi mayor bendición, a mi hermano Alejandro Linares por su apoyo en todos los momentos de mi vida, a mi abuelita Delia de Saucedo, tíos, tías, primos y primas. A mis profesores de maestría, principalmente a la Doctora Marializ Gramajo Rodríguez, asesora de tesis, por su incondicional apoyo durante la elaboración del presente trabajo de investigación, a la Universidad del Valle de Guatemala, por ser mi segunda casa de estudios, en especial al departamento de maestría en alimentos de la facultad de Ingeniería.

## CONTENIDO

	Pág.
PREFACIO	v
CONTENIDO	vi
LISTA DE CUADROS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	Ix
I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
III. Marco teórico	
A. Leche entera	3
B. Microbiología de la leche	5
C. Parámetros de calidad en leche	8
D. Buenas prácticas en la recolección de leche	11
E. Conservación de la leche fresca	12
F. Natamicina	13
IV. Justificación	16
V. Objetivos	17
VI. Materiales y métodos	18
VII. Resultados	26
VIII. Discusión de resultados	28
IX. Conclusiones	32
X. Recomendaciones	33
XI. Bibliografía	34
XII. Anexos	
A. Ficha técnica de la natamicina	37
B. Certificado de análisis	39
C. Boleta de evaluación sensorial	40

## LISTA DE CUADROS

	Pág.
1. Parámetros microbiológicos para leche fluida pasteurizada, con o sin saborizante, con o sin aromatizante	10
2. Análisis organoléptico de leche con preservante	26
3. Cambios de pH y acidez titulable en leche con preservante	26
4. Análisis microbiológico de leche con preservante	27

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
1. Curva de crecimiento bacteriano	7
2. Recolección de leche	20
3. Análisis organoléptico	21
4. Determinación de acidez titulable	22
5. Determinación de pH	23
6. Análisis microbiológico	24

## RESUMEN

La leche es un alimento perecedero, que por su contenido en nutrientes es susceptible a contaminación microbiana, lo cual acelera su descomposición generando características que no son aptas para su utilización como producto final o materia prima para la elaboración de productos lácteos en las industrias alimenticias. El manejo, conservación y transporte de la leche requieren de un control de variables tales como la temperatura y de equipo que no se encuentra al alcance de los pequeños productores. Preservantes, como la natamicina, que no alteran las características fisicoquímicas ni sensoriales en los productos, resultan una alternativa para su preservación, por lo que el objetivo del presente estudio consistió en evaluar el efecto antimicrobiano de la natamicina en leche fluida entera sin tratamiento térmico como posible preservante, el mecanismo de acción de la natamicina permite que el sitio de acción sea específico sin modificar características sensoriales en la leche, por lo que de los resultados obtenidos, la natamicina redujo los recuentos microbiológicos en la leche fluida entera sin tratamiento térmico y no modificó las características fisicoquímicas ni organolépticas en el producto.

## I. INTRODUCCIÓN

La leche es el alimento básico para la población por su contenido en nutrientes, siendo considerado el alimento con mayor venta en el mercado (Lancelle, 2011). Sin embargo es un producto que se puede contaminar fácilmente si no se toman las medidas adecuadas para su almacenamiento y distribución. La contaminación microbiana de la leche causa distintos daños en el producto como lo es la acidificación que provoca sabores desagradables y bajo rendimiento en la producción de sus derivados. Es por eso que la Industria láctea requiere de preservantes antimicrobianos que alarguen vida de anaquel sin interferir en las características organolépticas del producto (Santamaria, 2005).

La leche al ser un alimento perecedero es susceptible al ataque microbiano que causa su descomposición y disminuye el tiempo de vida útil del producto, a la vez la demanda del mercado por productos más naturales y con menores daños a la salud del consumidor crece. Es por ello que la presente investigación busca conocer cuáles son los efectos antibacterianos de natamicina, como preservante natural en leche. Para ello se eligieron muestras de leche entera fluida recién ordeñada, para observar los efectos de la natamicina y los beneficios que puede llegar a brindar como nueva alternativa para la conservación de leche.

Este trabajo consistió en evaluar el efecto antibacteriano que se obtiene del preservante al utilizarlo en leche fluida entera extraída de vaca y las características organolépticas de la leche con el preservante evaluado.

## II. ANTECEDENTES

La leche es un alimento perecedero, que para su conservación depende de factores como la temperatura, la cual es determinante para que comience el deterioro de este alimento. Sin embargo el control de temperaturas de almacenamiento y equipo necesario para la conservación de la leche involucra gastos que el pequeño productor no puede adquirir. El uso de preservantes para la conservación de alimentos se ha difundido en la industria alimenticia, brindando un mayor tiempo de vida de anaquel al producto. Esto beneficia a los pequeños productores, quienes logran alargar la vida útil del producto y reducir sus pérdidas económicas (Nieto, 2010).

Estudios como el de Nieto (2010), han demostrado que dentro de los productos químicos de mayor relevancia en la conservación de alimentos perecederos como la leche, se encuentra el dióxido de cloro y el peróxido de hidrógeno. El dióxido de cloro, ClO<sub>2</sub>, es un potente antimicrobiano, sin embargo adicionarlo a la leche es una práctica ilegal y peligrosa, principalmente cuando es dosificado de manera indiscriminada en leche, porque pone en riesgo la salud del consumidor, causando intoxicaciones, reacciones alérgicas, y en casos de abuso de dosis de este producto, puede llegar incluso a ser letal para el consumidor. El segundo compuesto y con una aplicación más difundida es el peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Este es un compuesto utilizado para la preservación de la leche ya que inhibe el crecimiento bacteriano y los restos de este compuesto se pueden eliminar al agregar la enzima catalasa. Sin embargo, aún no se han establecido las dosis de aplicación (Nieto, 2010).

En la actualidad se han desarrollado métodos con enzimas, entre los que destaca el uso de lactoperoxidasa, la cual es una enzima con propiedades antimicrobianas que inactiva el metabolismo bacteriano y causa la muerte de estos microorganismos (Muñoz, 2010).

En la búsqueda de nuevas alternativas para la preservación de la leche que sean efectivas e inocuas bajo evidencia científica y al alcance de los productores, se han estudiado sustancias como la natamicina, un macrólido sintetizado por el microorganismo *Streptomyces natalensis*, que ha sido eficaz contra mohos y con menor actividad inhibitoria en bacterias, su aplicación en alimentos incluye lácteos, como quesos y yogurt; cárnicos y productos de panificación, alargando de esta forma la vida útil del producto, sin causar cambios en las características organolépticas (Andrade, 2009).

### III. MARCO TEÓRICO

#### A. Leche entera

La leche es un fluido que se obtiene a partir de animales mamíferos. Es un alimento básico que tiene la función primordial de satisfacer los requerimientos nutricionales. Se encuentra constituida de proteínas, grasa, carbohidratos, sales y otros componentes en menores concentraciones dispersos en agua. Nutricionalmente presenta una amplia gama de nutrientes. Los productos lácteos derivados pueden cubrir tanto diferentes hábitos de consumo como muy distintos usos de interés nutricional (Andrade, 2009).

1. Componentes. Los componentes de la leche pueden encontrarse en suspensión, emulsión o en disolución. En emulsión se encuentran grasas y asociados, en suspensión las caseínas ligadas a sales minerales y como diluidos las vitaminas hidrosolubles, lactosa, proteínas del suero y sales (Mahaut, 2003).

La leche es un alimento completo, el agua es el componente con mayor concentración y de mayor importancia. La composición de la leche varía según la época, edad, raza y alimentación del animal (Andrade, 2009).

a. Carbohidratos. El principal carbohidrato de la leche es la lactosa, es un azúcar que es poco percibida en la leche, su concentración es relativamente constante y promedia alrededor del 5%. La lactosa se encuentra constituida por glucosa y galactosa. En una proporción significativa de la población humana, la deficiencia de la enzima lactasa en el tracto digestivo resulta en la incapacidad para digerir la lactosa. No todos los productos lácteos poseen proporciones similares de lactosa. La fermentación de lactosa durante el procesado baja su concentración en muchos productos, especialmente en los yogures y quesos (Mahaut, 2003).

b. Proteínas. La mayor parte del nitrógeno de la leche se encuentra en forma de proteína. La concentración de proteína en la leche varía de 3.0 a 4.0%, y varía con la raza y en relación con la cantidad de grasa en la leche (Mahaut, 2003).

Las proteínas se clasifican en dos grandes grupos: caseínas (80%) y proteínas séricas (20%). El comportamiento de los diferentes tipos de caseína ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ ) en la leche al ser tratada con calor, variaciones en pH y distintas concentraciones de sal, provee las características de los quesos, los productos de leche fermentada y variedades de leche (Mahaut, 2003).

c. Grasas. La grasa constituye desde el 3,5 hasta el 6,0% de la leche, variando entre razas y las prácticas de alimentación. Una ración demasiado rica en concentrados que no estimula la rumia en la vaca, puede resultar en una caída en el porcentaje de grasa 2,0 a 2,5%(Andrade, 2009).

La grasa se encuentra presente en pequeños glóbulos suspendidos en agua. Cada glóbulo se encuentra rodeado de una capa de fosfolípidos, que evitan que los glóbulos se aglutinen entre sí repeliendo otros glóbulos de grasa y atrayendo agua. Siempre que esta estructura se encuentre intacta, la leche permanece como una emulsión (Carballo, 2008).

La mayoría de los glóbulos de grasa se encuentran en la forma de triglicéridos formados por la unión de glicerol con ácidos grasos. La grasa de la leche contiene principalmente ácidos grasos de cadena corta producida de unidades de ácido acético derivadas de la fermentación rumiar (Andrade, 2009).

d. Vitaminas y minerales. La leche es una fuente excelente para la mayoría de los minerales requeridos para el crecimiento. La digestibilidad del calcio y fósforo es generalmente alta, debido a que se encuentran en asociación con la caseína de la leche. Como resultado, la leche es la mejor fuente de calcio para el crecimiento del esqueleto óseo y el mantenimiento de la integridad de los huesos en el adulto. Además la leche posee hierro, el cual a bajas concentraciones en la leche limita el crecimiento bacteriano en la leche (Andrade, 2009).

## B. Microbiología de la leche

La leche debido a su compleja composición bioquímica y por su alto contenido de agua, es un buen sustrato para los microorganismos saprófitos y también para los patógenos que la utilizan como sustrato para su reproducción (Alais, 2006).

La actividad de las bacterias saprófitas prácticamente no tiene influencia sobre la salud, pero son indicadoras del nivel de higiene en el proceso de ordeño y cuidado para la conservación de la leche (Alais, 2006).

Los microorganismos pueden producir desde cambios deseables en las características fisicoquímicas en la elaboración de diversos productos lácteos; quesos, yogurt, entre otros. Sin embargo si las condiciones del almacenamiento y manipulación de la leche no son las adecuadas puede provocar alteración en la calidad de productos lácteos y sus subproductos (Alais, 2006).

1. Contaminación pre-secreción. Una vez que la leche ha atravesado el canal del pezón tiene un determinado número de bacterias. Es fundamental obtener leche con un bajo recuento inicial de bacterias y refrigerarla inmediatamente a un rango de 4 a 8°C (Illescas, 2009).

Existen infecciones agudas en la ubre, donde el contenido de bacterias puede superar el 1.000.000 UFC/ml. Esto se presenta frecuentemente en los casos de mastitis causada por *Streptococcus agalactiae*. La leche con infecciones subclínicas debidas a estreptococos y estafilococos contiene alrededor de 25.000 UFC/ml en leche. Infecciones latentes contienen alrededor de 40.000 UFC/ml (Alais, 2006).

El canal del pezón tiene una variedad de microorganismos que van desde *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo, *Micrococcaceae*, *Corinebactrerium*, estreptococos no patógenos. Aun cuando se toma una muestra de leche desinfectando correctamente el pezón durante 20 segundos con alcohol al 80%, no es posible eliminar esa microbiota. Trabajos de investigación como el de Illescas (2009), han demostrado que la única forma de evitar esa microbiota del canal del pezón es, obtener la muestra de leche mediante punción de la cisterna de la ubre (Illescas, 2009).

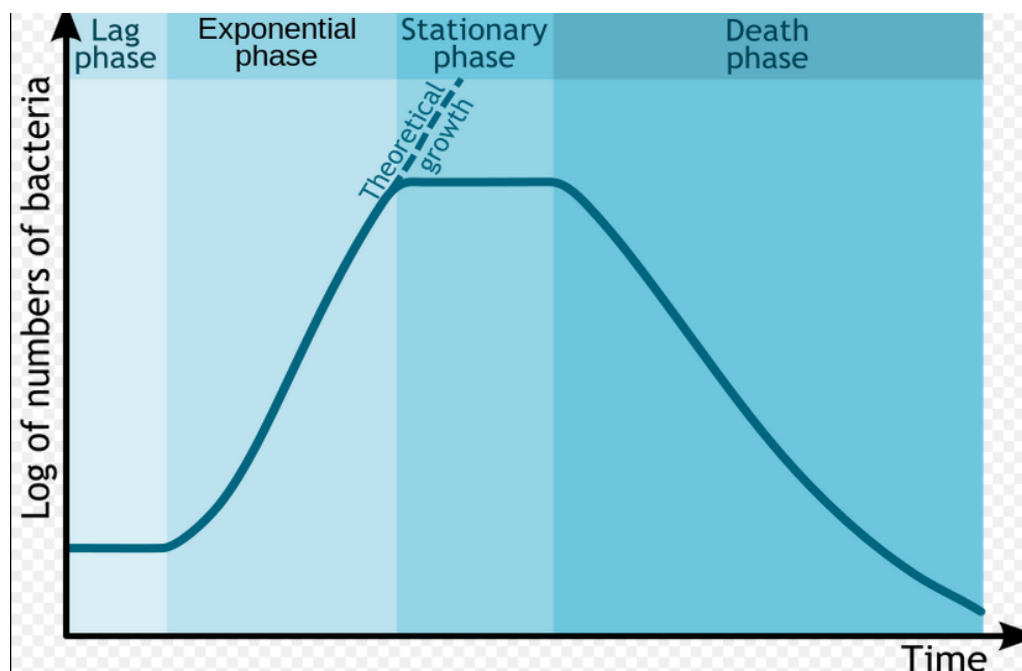
2. Contaminación post-secretoria. Los equipos de ordeño y tanques de frío, son fuente de contaminación cuando no se han sanitizado, ya que pueden llegar a contener microorganismos que se reproducen en la leche y llegar a contaminarla. La leche es un medio enriquecido para las bacterias ya que posee azúcares como la lactosa, la cual es un carbohidrato del cual los microorganismos se alimentan y empezar su fase de crecimiento, en donde aumenta el número de bacterias. Se ha demostrado que, cuando la leche del tanque tiene más de 100.000 UFC/ml no se realizó una correcta sanitización del equipo (Illescas, 2009).

3. Multiplicación de las bacterias en la leche. La multiplicación bacteriana se puede definir como el aumento del número de microorganismos en el medio. Las fases del crecimiento bacteriano son las siguientes:

- Fase lag: es la fase de latencia, en donde los microorganismos se adaptan al medio. En esta fase encuentran el alimento y condiciones ambientales que son favorables para su reproducción.
- Fase log: fase exponencial, en donde se multiplican por fisión binaria, aumentando el número de bacterias.
- Fase estacionaria: los nutrientes son escasos por el aumento de la población microbiana, el número de microorganismos es igual que la tasa de muerte.
- Fase de muerte: ausencia de nutrientes y metabolitos inhibitorios, la población microbiana disminuye (Ballen, 2002).

La multiplicación bacteriana es rápida en productos como la leche, el cual es un medio enriquecido que posee una amplia gama de nutrientes para el crecimiento de bacterias. Los factores que intervienen en el desarrollo y contaminación bacteriana son: actividad agua ( $A_w$ ) y pH (Mahaut, 2003).

Figura No.1 “Curva de crecimiento bacteriano”



Fuente: González.2013.

a. Actividad agua ( $A_w$ ). La disponibilidad de agua en un alimento es el agua que se encuentra libre en el mismo y es necesaria para que las bacterias se multipliquen. Se indica con un número que va desde 0 hasta 1.

La leche posee una actividad de agua de 0.98, debido a que es un alimento que posee gran cantidad de agua libre dentro de sus componentes, lo que la hace susceptible al ataque microbiano ya que la reproducción de los microorganismos dependen del agua (Helguera, 2008).

b. Valor pH. La leche posee un rango de pH de 6.1 a 6.8, acidez que se obtiene por los protones aportados por el agua y protones del ácido láctico, haciendo que sea un producto que pueda ser atacado por bacterias debido a que se pueden adaptar a este medio ligeramente ácido (Santamaria, 2003).

Las bacterias que se pueden encontrar en la leche pueden ser *Pseudomonas*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* que se adaptan a rangos de pH de 4.4 hasta 9. Otras bacterias como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces* y *Aspergillus*, se pueden encontrar en

productos con pH desde 1.6 hasta 9, adaptándose mejor en rangos de pH de 2 a 4 (Illescas, 2009).

### C. Parámetros de calidad en leche

La calidad de la leche, como de cualquier otro producto o insumo, se refiere al cumplimiento del mismo a las especificaciones establecidas. En la actualidad la recepción de leche en centros de acopio o en las procesadoras, depende de los resultados de tres aspectos importantes; fisicoquímicos, organolépticos, y microbiológicos (Zambrano, 2008).

1. Fisicoquímicos. Dentro de los parámetros fisicoquímicos evaluados en leche cruda, se encuentran los siguientes:

a. Acidez titulable. La leche cruda generalmente presenta una acidez de 0.14 a 0.18%, expresada como ácido láctico. En la acidez se determina la suma de la acidez de la leche, la cual está compuesta por caseínas, sustancias minerales, ácidos orgánicos, fosfatos y la acidez desarrollada por crecimiento microbiológico en donde los microorganismos degradan la lactosa y lo convierten en ácido láctico. Se ha reportado que niveles por debajo de 0.14% podrían indicar presencia de agua, neutralización de la leche con sustancias alcalinas o leche proveniente de vacas con mastitis. Niveles por encima de 0.18%, representa leche con prácticas de higiene inadecuadas y recuentos microbiológicos elevados. La acidez se mide con base en una titulación con hidróxido de sodio 0.1 Normal y utilizando fenolftaleína como indicador (González, 2013).

b. pH. El pH nos indica la acidez de la leche, el cual se encuentra de 6.1 a 6.8, esto se debe a la presencia de uno de los componentes en mayor proporción en la leche, el agua, que es la que aporta iones  $H^+$ , haciendo que la leche presente un medio ligeramente ácido (Santamaria, 2003).

c. Grasa. La grasa se encuentra en forma de glóbulos formando una emulsión. Según el contenido de grasa se pueden clasificar en; leche entera > 3%, semidescremada 1.5 a 2% y descremada 0.1 a 0.5% de grasa. El contenido de grasa varía según aspectos inherentes del animal como: salud, edad de la vaca, nutrición, raza, entre otros. Sin embargo los porcentajes de grasa son indicadores de la calidad de leche, en donde los valores de porcentaje pueden

indicar un proceso de adulteración de la grasa; como el agregarle grasa vegetal, procesos de descremado o adulteración con agua.

2. Organolépticos. Los parámetros organolépticos deben ser detectados por técnicos de laboratorio con experiencia para que identifiquen el olor, color y sabor de la leche.

a. Color. La leche es un líquido de color blanco opalescente característico debido a la refracción de la luz cuando los rayos de luz inciden sobre las partículas coloidales de la leche en suspensión. Cuando es muy rica en grasa, presenta una coloración cremosa, debido al caroteno que contiene la grasa, la leche baja en grasa toma un color ligeramente azulado (Ballen, 2002).

El color de la leche se debe a los efectos combinados de la caseína, sales coloidales, pigmentos y otros componentes. La caseína y las sales coloidales le imparten el color blanco y opaco de la leche, en la medida que refleja totalmente la luz (Ballen, 2002).

La leche adulterada con agua presenta un color blanco con tinte azulado; la leche proveniente de vacas enfermas con mastitis presenta un color gris amarillento con grumos; un color rosado indica presencia de sangre; una leche adulteración suero puede adquirir una coloración amarillo-verdoso debido a la presencia de riboflavina (Ballen, 2002).

b. Sabor. El sabor natural de la leche es ligeramente dulce, por su contenido de lactosa. Algunas veces presenta cierto sabor salado por la alta concentración en cloruros al final del periodo de lactación, o por estar atravesando por estados infecciosos de la ubre (Zambrano, 2008).

c. Olor. El olor de la leche se debe a los ácidos grasos volátiles. Es susceptible a absorber los olores del medio ambiente. Durante el ordeño, los ácidos grasos se intercambian con el aire, la grasa absorbe olores y sabores de los materiales que se encuentran en el aire (Ballen, 2002).

3. Microbiológicos. La leche recién obtenida es un sustrato ideal para un gran número de géneros bacterianos, algunos beneficiosos y otros perjudiciales, que provocan alteraciones diversas del alimento y sus propiedades. En leche se determinan una gran variedad de análisis microbiológicos, sin embargo el grupo de microorganismos indicadores determinados en alimentos son coliformes totales, coliformes fecales, *Escherichia coli* (Illescas, 2009).

La leche es un alimento de riesgo tipo A, que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, tiene una alta probabilidad de causar daño a la salud. Se encuentra categorizado en el numeral 1 del grupo alimenticio de leche y productos lácteos; en los que incluye todo tipo de productos lácteos derivados de la leche de cualquier animal que suele ser ordeñado de vaca, oveja, cabra o búfala (RTCA 67.04.50:08). Sin embargo no establece los parámetros microbiológicos para la leche simple, la define como la leche sin tratamiento térmico, aromatizante o cualquier otra sustancia. El reglamento técnico centroamericano refiere que la leche pasteurizada debe cumplir con los parámetros que se muestran en el Cuadro No.1

Cuadro No.1 “Parámetros microbiológicos para leche fluida pasteurizada, con o sin saborizante, con o sin aromatizante”

Parámetro	Riesgo	Límite máximo permitido
<i>Escherichia coli</i>		< 3 NMP/ ml
<i>Salmonella spp/25g</i>		Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	A	10 <sup>2</sup> UFC/ml
<i>Listeria monocytogenes/25 g</i>		Ausencia

Fuente: Reglamento Técnico Centroamericano, RTCA 67.04.50:08 Alimentos. Criterios Microbiológicos para la Inocuidad de Alimentos.

## D. Buenas prácticas en la recolección de leche

La leche al ser un producto perecedero, se contamina fácilmente y es muy sensible a altas temperaturas, por lo que deben de tomarse cuidados en la recolección, transporte y recepción.

1. Recolección y transporte. La temperatura de la leche en el momento del ordeño es de aproximadamente 37°C, la cual es óptima para el crecimiento de microorganismos indeseables, lo cual requiere que luego de ser ordeñada se refrigere y se mantenga una estricta cadena de frío para su conservación (Carballo, 2008).

Según estudios realizados como el de Rodríguez (1997) y Carballo (2008), recomiendan mantener la leche fresca a temperaturas de  $\leq 10^{\circ}\text{C}$  luego del ordeño, y menores de 4°C para transportarla. Si la cadena de frío se rompe por ejemplo, durante el transporte, los microorganismos en la leche empiezan a multiplicarse (Rodríguez, 1997) (Carballo, 2008).

Los primeros pasos en la preservación de la calidad de la leche deben ser tomados en la granja. Las condiciones de ordeño deben ser higiénicas, el sistema de ordeño debe evitar la contaminación y proliferación de microorganismos que deterioren la leche.

La leche de vacas enfermas no se debe suministrar a la industria láctea junto con la leche de animales sanos. La leche de las poblaciones tratadas con antibióticos debe mantenerse separada de la de los demás. Dicha leche no se puede utilizar para productos sobre la base de cultivos de bacterias, debido a que el antibiótico mata bacterias. Esto se aplica a los productos cultivados de leche, como queso, yogurt, mantequilla, etc (Mahaut, 2003).

a. Análisis de producto. Las siguientes son las pruebas más comunes realizadas en el abastecimiento de leche.

1) Sabor y olor. En el caso de recolección a granel, el controlador toma una muestra de la leche en la granja para la prueba en la lechería y se califica. La leche que se desvía en el sabor y el olor de la leche normal.

Leche con desviaciones significativas en el sabor y el olor debe ser rechazada inmediatamente (Mahaut, 2003).

2) Pruebas de sedimentos. Se toma una muestra con una pipeta de la parte inferior de una mantequera y se pasa entonces a través de un filtro. La deducción de la calidad se realiza observando si existen impurezas visibles, las cuales son retenidas por el filtro (Mahaut, 2003).

3) Almacenamiento. Para recibir la leche, se realiza una limpieza y desinfección de los tanques de almacenamiento. Esta se introduce por medio de mangueras previamente lavadas, y se transporta a los tanques que se mantienen a una temperatura de 4 a 7°C para su posterior utilización. Luego se realizan análisis fisicoquímicos de la leche para determinar la calidad de ésta, y se regulan las cantidades de grasa para que ésta siempre sea constante, en los procesos y productos a elaborar a partir de ella (Schller, 2011).

#### E. Conservación de la leche fresca.

La leche es una materia prima fácilmente perecedera. Las bacterias que la contaminan pueden multiplicarse rápidamente y hacerla no apta para la elaboración ni para el consumo humano. El desarrollo de las bacterias puede retrasarse mediante la refrigeración, que reduce la velocidad del deterioro. En ocasiones puede ser imposible aplicar la refrigeración por razones económicas y/o técnicas. Las dificultades para la refrigeración constituyen un problema especial en ciertas zonas de países en los cuales la producción lechera es incipiente o se encuentra en expansión (Díaz, 2009).

1. Productos de conservación. El uso de cloro en leche es una práctica que pretende cubrir las malas prácticas higiénicas en el ordeño, además que puede llegar a intoxicar a los consumidores al ingerir leche o alguno de los productos a base de ellos (Lima, 2009).

El peróxido de hidrógeno se ha utilizado por mucho tiempo para conservar leche cruda desde las primeras fases del procesamiento de leche en la industria láctea, sin embargo en 1967 la OMS (Organización Mundial de la Salud), lo prohibió debido a que no existían estudios acerca de las dosis de aplicación recomendadas. Además se detectó su uso en producto tratando de cubrir malas prácticas realizadas en las fases de procesamiento previas a su venta (Muñoz, 2010).

Dentro de los productos utilizados que no han sido prohibidos se encuentra la nisina, un antibacteriano utilizado en leche, ayudando a su preservación por un mayor tiempo para poder introducirla en procesos industriales sin inconvenientes de contaminación microbiana. La enzima lactoperoxidasa, también es utilizada como preservante y ha tomado mayor auge en los últimos años a partir del 2009, debido a que actúa como una enzima que inhibe el crecimiento microbiano por medio de alteración de la membrana bacteriana, causando una situación de estrés en las bacterias y eliminándolas, y de esta forma alargando la vida de anaquel de la leche (Muñoz, 2010).

#### F. Natamicina.

La Natamicina ( $C_{33}H_{47}NO_{13}$ ) es un agente natural obtenido a partir de la fermentación de carbohidratos por *Streptomyces natalensis*, muy eficaz en el control de una amplia variedad de mohos y levaduras (DMS, 2010).

Su mecanismo de acción consiste en la interacción con los esteroides en la membrana celular del microorganismo, formando un complejo llamado polienesterol en donde se introduce alterando la permeabilidad en la membrana permitiendo la pérdida de materiales celulares esenciales (DMS, 2010).

1. Funcionamiento de natamicina. En la actualidad no se conoce a detalle la función y método de acción antimicrobiana de la natamicina, sin embargo la natamicina es una piramicina que se une a la pared celular de los microorganismos, alterando su permeabilidad y desestabilizándola. Se une al ergosterol de la pared microbiana, sus sustratos son inductores de procesos metabólicos, con los cuales se une formando complejos inhibidores, que detienen actividades funcionales. Además, desestabiliza la membrana microbiana causando liberaciones de iones y metabolitos necesarios, que no se conocen a profundidad pero ocasionan lisis celular y de esta forma la muerte del microorganismo.

Su aplicación es reconocida para hongos sin embargo muy pocos estudios demuestran su uso antibacteriano en alimentos (RTCA 67.04.50:08).

De acuerdo con Villaruel & Corrales (2004), se ha determinado que la natamicina presenta actividad inhibitoria en bacterias en alimentos tales como fresas, moras, yogurt y quesos, en los cuales se aplicó natamicina. La actividad inhibitoria antimicrobiana se puede clasificar en estrecho, intermedio y amplio. Las de espectro estrecho inhiben bacterias de la misma especie; las de intermedio pueden interferir en el crecimiento de bacterias Gram positivo y patógenos de alimentos; y las de amplio espectro de inhibición actúan contra un gran número de bacterias Gram positivo. El modo de acción de las bacteriocinas formadas de aminoácidos es por medio de la formación de polos polares y apolares por los cuales logran entrar a la membrana bacteriana desestabilizándola y provocando la muerte microbiana (Villaruel & Corrales, 2004)

2. Aplicación en alimentos. La natamicina es uno de los conservantes de alimentos permitidos a nivel mundial para proteger una amplia variedad de productos tales como queso, carne fermentada, yogur, bebidas, vinos y productos horneados contra los hongos y las levaduras. Debido a los beneficios de la natamicina como un método natural y eficiente de conservación de alimentos, su aplicación tiene un enorme potencial para ampliar la vida útil y evitar la descomposición (Téllez, 2010).

La natamicina ha sido probada y aprobada como un conservante de alimentos adecuado para el consumo humano, entre otros, por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Food and Drug Administration (FDA). Las aplicaciones permitidas difieren por país o región. En Estados Unidos se utiliza en queso y yogurt; en México en pan y tortillas; en Europa en quesos y embutidos (DMS, 2010).

3. Disponibilidad comercial. Los péptidos antimicrobianos comercializados son escasos y poco reconocidos por la industria alimentaria. En el mercado se reconocen dos antimicrobianos que poseen un amplio campo de aplicación y que son conocidos como nisina y natamicina. La nisina es un antibiótico polipeptídico formado de treinta y cuatro aminoácidos, producido por la bacteria *Lactococcus lactis*, es un conservante bastante efectivo contra las bacterias Gram positivas, ya que se une a sus membranas interfiriendo en sus sistemas de transferencia de protones. Es utilizado para combatir a varios microorganismos patógenos, como *Clostridium botulinum* y *Bacillus cereus*, que forman endoesporas que resisten mejor el calentamiento que las células vegetativas y también *Listeria monocytogenes*. La nisina es también es muy eficaz en la prevención de alteraciones del queso, especialmente quesos fundidos, producidas por *Clostridia*, actualmente, esta es su principal aplicación (Bailey & Scot, 2009).

La natamicina, o piramicina, es un macrólido, obtenido del microorganismo *Streptomyces natalensis*. Normalmente se comercializa bajo la marca registrada “Delvocid”. Es muy eficaz contra mohos, pero mucho menos contra bacterias. Se utiliza por eso precisamente para la protección exterior de alimentos madurados por microorganismos, como ciertos quesos o embutidos (Calvo, 2011).

#### IV. JUSTIFICACIÓN

La leche es uno de los alimentos más consumidos en el mercado, sin embargo los procesos de ordeño determinan la calidad del producto extraído ya que debe evitarse que el producto no se contamine y se almacene en las condiciones adecuadas para disminuir riesgos de contaminación microbiana (Santamaria, 2005). Estas condiciones no se encuentran al alcance de los pequeños productores ya que requieren de equipos costosos, tales como cuartos fríos, que proporcionen un ambiente que disminuya el crecimiento microbiano y detenga actividades enzimáticas que deterioren la leche.

La Cámara de Productores de Leche en Guatemala, reporta que el consumo de leche es abastecido en un 40% por la producción nacional y un 60% importado. La producción nacional se obtiene principalmente de los pequeños y medianos productores, proveniente de las áreas de Escuintla, Jalapa, Jutiapa, Petén y la ciudad. Actualmente del total de la leche fluida de vaca obtenida, el 20% se vende a empresas, el 10% es de autoconsumo y el 70% es para el sector informal (Díaz, 2009).

En nuestro país, las industrias lácteas utilizan alrededor de 30,000.00 litros de leche fluida por industria. Dentro de estos procesos se pierden diariamente cerca de siete a diez mil litros, representando un 20% de pérdida para las industrias, debido a que no se logra conservar la leche por más de tres días con las propiedades necesarias con las cuales se reciben en los centros de acopio de procesadoras de lácteos, representando también pérdidas para los pequeños productores (Abelle, 2009).

Los preservantes que se encuentran en el mercado en ocasiones suelen modificar algunas características sensoriales en la leche, o se encuentran prohibidos para su uso, por lo que la industria se encuentra en busca de nuevos productos que alarguen vida de anaquel, tengan efecto antimicrobiano, no cambien las características organolépticas de la leche y de bajo costo, principalmente para que sea accesible a los pequeños productores.

Se considera de suma importancia conocer cuáles son las propiedades y beneficios que los preservantes ofrecen a la industria y que además de ello no perjudique la salud del consumidor. La presente investigación pretende evaluar los beneficios de la natamicina como preservante y agente antimicrobiano para llegar a ser una nueva alternativa para la industria láctea, beneficiándolos en la protección microbiana y sensorial de la leche.

## **V. OBJETIVOS**

### **A. General**

Establecer el efecto antibacteriano de la natamicina como preservante en la leche fluida sin tratamiento térmico.

### **B. Específicos**

1. Determinar la reducción microbiológica de la natamicina en leche fresca sin tratamiento térmico
2. Detectar los cambios organolépticos del preservante al evaluarlo en leche fluida entera.
3. Identificar los cambios en fisicoquímicos en leche al aplicar el preservante.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Universo

El estudio se realizará con muestras de leche fluida entera recién ordeñada manualmente de vaca raza Holstein de una finca en María Linda, Departamento de Escuintla, Guatemala.

### B. Muestra

1. Muestra. Muestras de leche fluida entera del universo descrito anteriormente.

### C. Recursos

#### 1. Recursos humanos

- Investigadora: Licda. María Stephanie Lissette Linares Saucedo
- Asesora: Dra. Marializ Gramajo Rodríguez

#### 2. Recursos institucionales


- Finca en María Linda, departamento de Escuintla, Guatemala.
- Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Escuintla. Guatemala

### D. Materiales

#### 1. Equipo

- Campana
- Balanza
- Incubadora
- Refrigeradora
- Congelador
- Pipeteador
- Potenciómetro portátil

#### 2. Reactivos

- Natamicina: Presentación: 500 gr. Marca “Harmony Ingredients-Solutions” 
- Neutralizante: NaOH 0.1N
- Indicador: Fenolftaleína
- Solución Limpiadora para pH: Clean Solution 2020

### 3. Cristalería

- Frascos de 7 onzas
- Tubos Vacutainer
- Bureta
- Tubos de Ensayo con 9 mL de agua peptonada estéril
- Frascos de Mason Estériles
- Pipetas Volumétricas 1 mL
- Vasos de vidrio
- Beackers de 25 mL

### 4. Otros

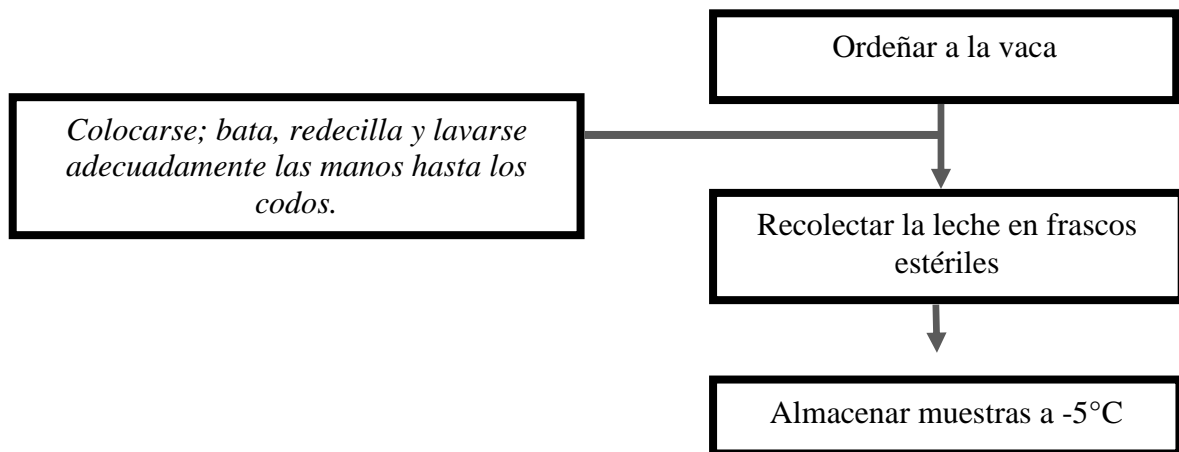
- Bata
- Cofias
- Guantes descartables
- Gradilla
- Olla
- Hielera
- Agar PCA
- Cajas de Petri estériles
- Contador de Quebec
- Soporte para bureta

## **F. Procedimiento**

### 1. Recolección de la leche:

- Colocarse bata y redcilla. Lavarse las manos hasta los codos adecuadamente, con jabón antibacterial.
- Realizar el procedimiento de ordeño, colocando el pulgar del lado frontal de la ubre y los cuatro dedos alrededor.
- Haciendo presión, jalar hacia abajo para extraer la leche.
- Colocar la leche extraída en frascos de vidrio previamente esterilizados. Cerrar los frascos.
- Guardar las muestras recolectadas a  $-5^{\circ}\text{C}$ .

Figura No.2 “Recolección de leche”



## 2. Preparación de la muestra:

- Colocar las muestras en baño María en una olla con agua con una temperatura de  $38^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos para descongelarlas.
- El análisis organoléptico de la leche fluida se realizará luego del ordeño, el cual consiste en sabor, olor, color.
- Luego evaluar 50 gramos de leche sin y con preservante, utilizando una dosis de 0.05% p/p de natamicina.

## 3. Análisis Organoléptico:

- Se realizará por medio de una prueba sensorial realizada a 6 personas de un panel experto de una Industria Alimenticia de Lácteos, la prueba será de triangulo, en la cual existen tres muestras y deben determinar si existe o no una muestra distinta dentro de las tres. Colocar las muestras en orden de derecha a izquierda y probarlas en ese orden. Evaluando color, sabor y olor.
- A tres personas se les otorgarán tres muestras dos con leche simple y una de leche con natamicina. Colocados en vasos de vidrio enumerados de la siguiente manera; 5829 (con natamicina), 6325 (sin natamicina) y 8960 (con natamicina). Colocar un vaso con agua para limpiar el paladar entre cada muestra
- Las otras tres personas tendrán dos muestras de leche con natamicina y una de leche simple. Colocados en vasos de vidrio enumerados de la siguiente manera; 3895 (sin natamicina), 7460 (con natamicina) y 1048 (sin natamicina). Colocar un vaso con agua para limpiar el paladar entre cada muestra

- La determinación de los parámetros sensoriales se realizará según las características organolépticas comúnmente detectadas en la leche, debido a que la determinación de estas, no están sujetas a determinaciones estándares como cartillas de color, o grados de intensidad de sabor. Se utilizará la siguiente escala para sabor y olor:

1=Me desagrada mucho

2= Levemente desagradable

3= Sabor característico sin cambios

4=Cambio leve sin desagradarme

5= Cambio intenso sin desagradarme

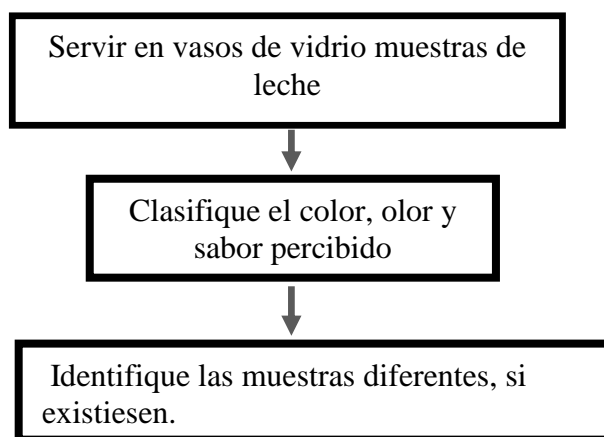
Para la determinación de color se utilizará la siguiente escala:

1= Crema

2= Blanco

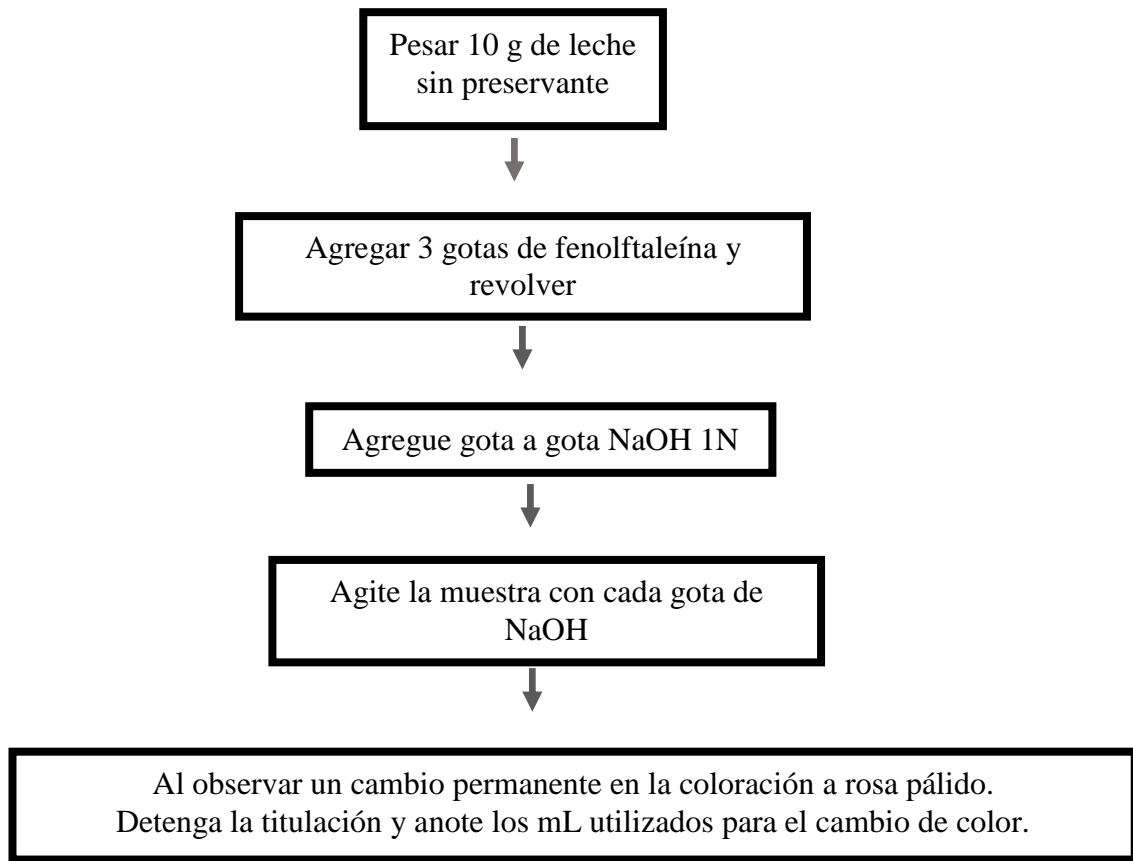
3= Amarilla

Figura No.3 “Análisis Organoléptico”



4. Acidez titulable. La medición se realiza en 10 gramos de muestra, agregando tres gotas de fenolftaleína, y titulando con Hidróxido de Sodio 0.1 N gota a gota, hasta el cambio de coloración a rosa pálido. Los mililitros necesarios para obtener el cambio de color es el porcentaje de acidez.

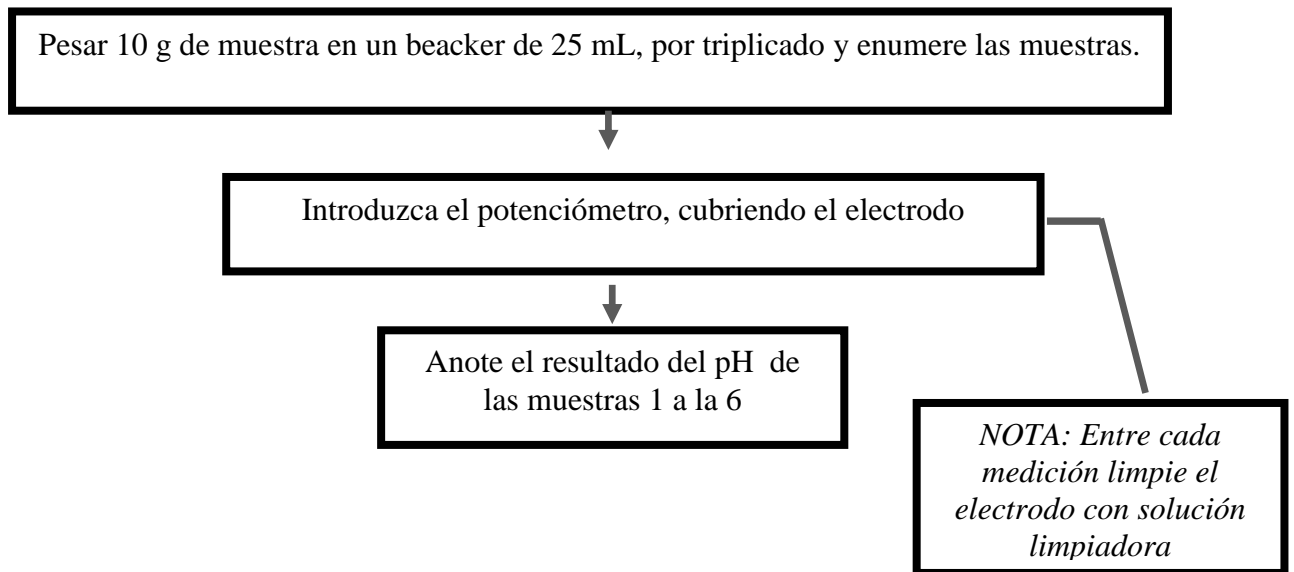
Figura No.4 “Determinación de acidez titulable”



#### 5. Determinación de pH:

- Pese asépticamente 10 mL de muestra sin preservante en un beacker de 25 mL, repetir este paso 2 veces más rotulando del 1 al 3.
- Realice el paso anterior con las muestras con preservante rotulando del 4 al 6.
- Con un potenciómetro previamente calibrado, introducirlo en la muestra no.1 cubriendo por completo el electrodo del potenciómetro.
- Espere a que el valor del potenciómetro y anótelo.
- Limpie con la solución de limpieza el potenciómetro, y repita los últimos dos pasos anteriores para la determinación del pH de las 5 muestras restantes.
- Recuerde realizar la limpieza del potenciómetro entre cada medición.

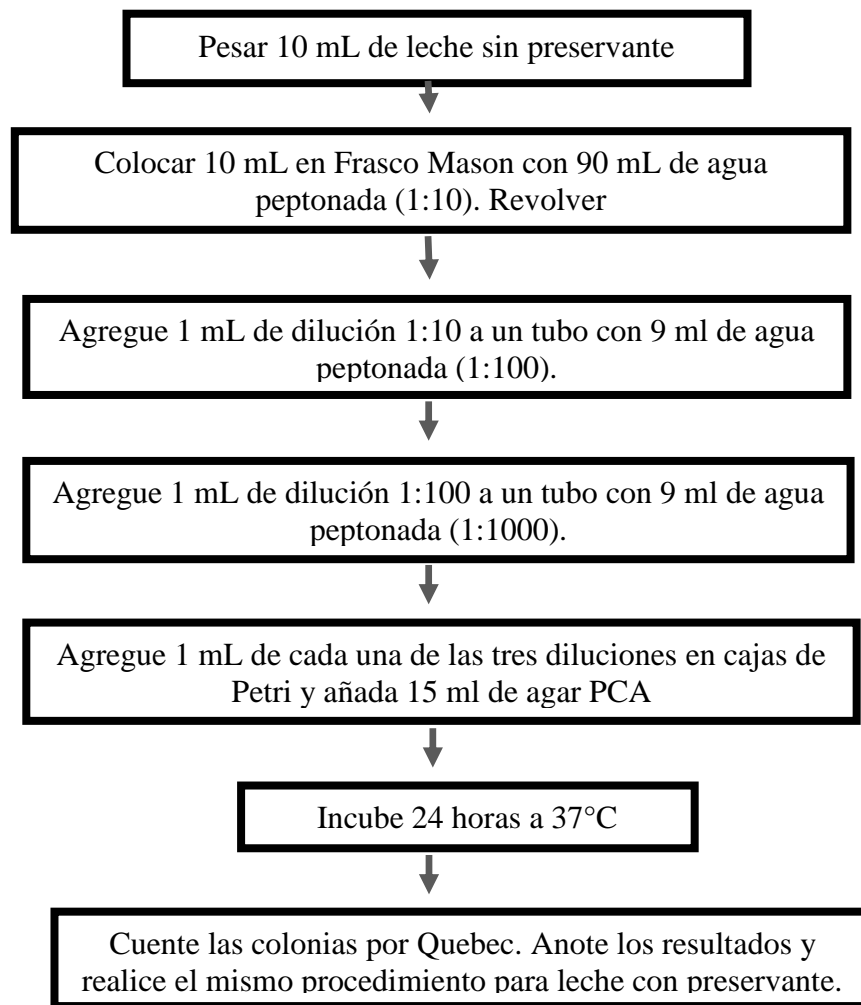
Figura No5 “Determinación de pH”



#### 6. Análisis microbiológico:

- Pese asépticamente 10 mL de muestra
- Coloque los 10 mL en un frasco Mason estéril, luego adicione 90 mL de agua peptonada estéril (dilución 1:10).
- Revuelva por dos minutos aproximadamente.
- A partir de la dilución 1:10, prepare la dilución 1:100 adicionando 1 mL de ésta al tubo con 9 mL de agua peptonada estéril.
- Prepare la dilución 1:1000, adicionando 1 mL de dilución 1:100 a un tubo con 9 mL de agua peptonada estéril.
- Coloque 1 mL de cada una de las diluciones en tres cajas de Petri y añada 15 mL de agar PCA.
- Incube por 24 horas a 37°C.
- Cuento las colonias con el contador de Quebec.

Figura No. 6 “Análisis microbiológico”

**G. Tipo de muestreo:**

No probabilístico, por conveniencia, la leche fluida entera de vacas ordeñadas en lugares del Departamento de Guatemala. La metodología utilizada fue con técnicas de almacenamiento con condiciones controladas de refrigeración para evitar contaminaciones provenientes de fuentes externas a las de la leche. Actualmente no existe un procedimiento de toma de muestra de leche fluida entera en los procedimientos establecidos en las directrices generales sobre métodos de análisis y toma de muestras del Codex Alimentarius (Codex, 2010).

**H. Criterios de inclusión:**

Muestras de leche fluida, obtenidas de muestras de leche provenientes del ordeño de vacas por funcionarios de la finca, sin tratamiento térmico, leche color blanca o amarillenta, sin presencia de cuerpos extraños, con acidez titulable de a 0,14 a 0.18%, pH 6+/- 0.5. El estudio denominará el término de leche simple a la leche sin el preservante.

## VII. RESULTADOS

Para evaluar el efecto antimicrobiano de la natamicina, se evaluaron 2 muestras de leche fluida, una muestra de leche sin preservante, y la otra con natamicina a una concentración de 0.05% p/p. Los análisis se realizaron en triplicado

Se determinaron las características organolépticas de la leche con el fin de determinar cambios sensoriales con el uso del antimicrobiano, el Cuadro No.2 muestra los resultados.

**Cuadro No.2“Análisis organoléptico de leche con preservante”**

	Muestra No.	Características Organolépticas		
		Color**	Olor*	Sabor*
Leche	1	2	3	3
	2	2	3	4
	3	2	3	3
Leche con Natamicina	4	2	3	3
	5	2	3	3
	6	3	3	4

\*Categoría para sabor y olor: 1=Me desagrada mucho2= Levemente desagradable3= Característico sin cambios

4=Cambio leve cambio sin desagradarme5= Cambia intenso sin desagradarme

\*\*Categoría de color: 1= Crema2= Blanco3= Amarilla

En el Cuadro No.3 se muestran los resultados en pH y acidez titulable en las dos muestras de leche en tres repeticiones

**Cuadro No.3“Cambios en pH y acidez titulable en leche con preservante”**

	Muestra No.	Parámetros Físicoquímicos	
		pH	Acidez Titulable (%)
Leche	1	6.2	0.14
	2	6.2	0.15
	3	6.2	0.14
Leche con Natamicina	4	6.1	0.15
	5	6.2	0.15
	6	6.2	0.14

Se realizó un análisis microbiológico, en el cual se determinó un recuento microbiológico total en leche fluida sin tratamiento térmico para observar si existe disminución en el recuento en las muestras de leche fluida con preservante, el cuadro No.4 muestra los resultados.

**Cuadro No.4 “Análisis microbiológico de leche con preservante”**

	Muestra No.	Análisis microbiológico	
		Recuento Total (UFC/mL)	Log
<b>Leche</b>	<b>1</b>	<b>450,500</b>	<b>5.65</b>
	<b>2</b>	<b>491,000</b>	<b>5.69</b>
	<b>3</b>	<b>430,000</b>	<b>5.63</b>
<b>Promedio</b>		<b>457,000</b>	<b>5.66</b>
<b>Leche con Natamicina</b>	<b>4</b>	<b>200,000</b>	<b>5.30</b>
	<b>5</b>	<b>220,000</b>	<b>5.34</b>
	<b>6</b>	<b>235,000</b>	<b>5.37</b>
<b>Promedio</b>		<b>218,367</b>	<b>5.34</b>

\*La Comisión Guatemalteca de Normas, Coguano NG 34 040 establece un límite máximo permisible de 500, 000 UFC/ml para leche de vaca.

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio se determinó el efecto de la natamicina como posible antimicrobiano en leche fresca fluida sin tratamiento térmico. Las muestras fueron obtenidas en una finca en María Linda, Escuintla. Se tomaron dos muestras de leche, la primera fue una muestra simple y a la segunda se le aplicó el preservante. A ambas se les realizaron análisis organolépticos, fisicoquímicos y microbiológicos por triplicado en el laboratorio de Microbiología de Alimentos localizado en el km 7.5 Escuintla, Guatemala.

En el Cuadro No.2 se presentan los resultados obtenidos del análisis organoléptico realizado en leche con natamicina. Se observó que en la aplicación del preservante, la característica de sabor y olor, no tuvieron ninguna variación respecto a los resultados obtenidos en la muestra simple, clasificándose en la categoría 3 que corresponde a la cambios sensoriales característicos, sin cambios a los del producto y 4 de cambio leve; sin embargo este mismo resultado se obtuvo en la leche simple, por lo que no se considera como un cambio organoléptico. El sabor de la leche es ligeramente dulce debido a la lactosa, el carbohidrato que se encuentra en mayor concentración en la leche. La natamicina interfiere entre los enlaces dobles del ergosterol, en los carbonos con dos hidrógenos libres  $\text{CH}_2$ , desestabilizando los enlaces y con ello la membrana de los microorganismos. La lactosa es un disacárido formado por la unión de la glucosa y galactosa, si bien en su estructura se encuentra un  $\text{CH}_2$ , este se encuentra hidroxilado por lo que no se encuentra libre para que la natamicina pueda interferir y modificar al carbohidrato y con ello un posible cambio de sabor (Ergel, 1983).

En coloración los resultados muestran una categoría 2 que corresponde al color blanco, es decir que la aplicación de natamicina en la leche no fue perceptible sensorialmente. El color de la leche es otorgado por un complejo de caseinato-fostato-calcicomagnésico que se encuentra en glóbulos de grasa lo cual crea una protección hacia el complejo, barrera por la cual la natamicina no interfiere en el lípido y no modifica el complejo por lo que no se da un cambio de coloración en el producto (Ergel, 1983).

Es importante mencionar que aunque el análisis sensorial se realizó con un panel sensorial entrenado perteneciente a una industria alimenticia de lácteos, en la que realizan este

análisis a diario, se sugiere utilizar métodos cuantificables para la determinación de color, como un equipo colorimétrico, el cual reporta las tonalidades de coloración en nanómetros y de ésta forma realizar comparaciones cuantitativas de los valores de color reportados, con el fin de establecer rangos de coloración aceptables con resultados cuantitativos que pueden llegar a ser de gran utilidad para medir la exactitud cualitativa de los grupos de panel entrenado.

Estudios como el de Gonzales (2010), demuestran que la aplicación de natamicina en alimentos como quesos y yogurt no cambia las características sensoriales en el producto, en donde se aplicaron dosis del 0.075% (Gonzales, 2010). Esto concuerda con los resultados mostrados en el presente estudio, en donde se utilizaron dosis menores a las reportadas por Gonzales de 0.05% p/p, la cual es recomendada por el proveedor en la ficha técnica y los asesores técnicos (Anexo A), donde no se perciben cambios sensoriales en el producto. El panel sensorial entrenado de la industria láctea alimenticia de lácteos identificó en leche únicamente sabores y olores característicos sin cambios, y un color blanco en todas las muestras de leche. Esto concuerda con lo mencionado anteriormente en donde se explica que las características sensoriales de la leche no se modifican, ya que la lactosa, componente esencial del sabor de la leche no posee los carbonos libres receptores de la natamicina que se encuentran en los dobles enlaces del anillo B del ergosterol en los cuales interfiere la natamicina para desestabilizar la permeabilidad de la membrana y provocar una lisis en los organelos del microorganismo (Welscher et al, 2007).

El Cuadro No.3 muestra los parámetros de pH y acidez titulable en leche con aplicación de natamicina, para esto se determinaron pH y acidez titulable en leche simple, los resultados fueron de 0.14 a 0.15% de acidez. La acidez detectada en la leche pertenece a los ácidos presentes en el producto, sin embargo la mayor parte es ácido láctico, el cual se obtiene por fermentación de la lactosa, transformando la lactosa en lactato y al adquirir iones de hidrógeno libre del medio se convierte en ácido láctico. Se pudo observar que los resultados no variaron con respecto a la leche simple, debido a que la dosis de aplicación es muy baja, 0.05% p/p, no interfiriendo en la acidez de la leche, por lo que no existe variación en los resultados obtenidos (Grabow, 1996).

Los valores de pH obtenidos en el Cuadro No.3 fueron de 6.1 en una muestra y 6.2 en las cinco muestras restantes, como se mencionó anteriormente el pH representa el valor de los iones hidrógeno que se encuentran disponibles en el medio, el pH de la leche es ligeramente ácido y oscila de 5.5 a 6.5, el cual se debe a la presencia de iones  $H^+$  pertenecientes a los minerales, agua, proteínas y ácidos (Díaz, 2009). La natamicina no modifico los valores de pH ya que en las muestras de leche simples como en las que poseen natamicina, el pH se encuentra dentro del rango normal de la leche. Esto se debe a que el pH de la natamicina se encuentra en un rango de 5 a 7.5 (Anexo B) cercano al del rango de pH de la leche, por lo que a bajas dosis de aplicación no modifican el pH de la leche. Además, la leche posee carbonatos, tales como el carbonato de calcio que actúa como buffer que al disociarse neutraliza iones hidroxilo manteniendo estable el pH de la leche (Harricks, 2006)

Se realizó la determinación de recuento aeróbico en placa para leche simple y leche con natamicina, los resultados se muestran en el Cuadro No.4, en donde se muestra que en leche simple la concentración promedio fue de 457,000 UFC/ml, con un valor logarítmico promedio de 5.66, para Coguanor NGO 34 040 de leche de vaca, establece un límite máximo permitido de 500,000 UFC/ml para la leche fresca sin tratamiento térmico (Comisión Guatemalteca de Normas, Coguanor NGO 34041). Se puede observar el recuento obtenido en el presente estudio se encuentra dentro del rango establecido por esta norma guatemalteca obligatoria. El recuento promedio obtenido en la leche con natamicina fue de 218,367 UFC/ml con un valor logarítmico promedio de 5.34 reduciendo más de la mitad el recuento microbiológico en la leche. Considerando la técnica de muerte bacteriana en función del tiempo, en la cual se evalúa un antimicrobiano en una muestra de alimento, si el recuento microbiológico es 1,000 veces menor que el recuento microbiológico del alimento sin el antimicrobiano, se considera como un antimicrobiano efectivo (Bailey & Scot. 2009). En este estudio la reducción fue de 238,633 UFC/ml en las muestras de leche con natamicina respecto a 457,000 UFC/ml de la muestra de leche sin preservante, teniendo en cuenta estos datos, la natamicina posee un efecto antimicrobiano en la leche cruda de vaca.

Respecto a la evaluación de la disminución del crecimiento microbiológico, otro método que se recomienda utilizar es el de un antibiograma en el cual se evalúan las concentraciones mínimas inhibitorias de antibióticos y preservantes, en este caso con natamicina, este análisis consiste en realizar una siembra de la muestra de leche y colocar taxos del antibiótico a evaluar en distintas concentraciones p/p, en este caso el preservante natamicina, luego se incuba a  $37^{\circ}C$  y se miden los halos de inhibición, en donde no existió crecimiento bacteriano, las medidas son tomadas en milímetros y establecen si los

microorganismos son resistentes o susceptibles al preservante. Cabe mencionar que entre mayores son las dimensiones de los halos mayor es la susceptibilidad microbiana al preservante (Bailey & Scot, 2009). Esto con el objetivo de determinar las dosis mínimas efectivas de natamicina, y determinar mediante otro método la cuantificación de susceptibilidad microbiológica de la natamicina en concentraciones mínimas inhibitorias (CMI).

Estos resultados se obtuvieron en muestras en condiciones favorables, como la refrigeración, se recomienda realizar un estudio en donde se trabajen las muestras a temperatura ambiente reales, debido a que los pequeños productores muchas veces carecen de equipos de refrigeración, con el fin de establecer si los resultados del efecto antimicrobiano de la natamicina son similares a los que se muestran en el presente estudio.

Se recomienda realizar estudios en donde se utilice la natamicina con otros preservantes tales como el sorbato de potasio en donde se ha demostrado un efecto antimicrobiano en leche sin necesidad de utilizar métodos de refrigeración por periodos de 5 hasta 7 días, con el fin de evaluar condiciones de temperatura ambiente de la leche, y conocer si el pequeño productor puede reducir costos en equipos de refrigeración y que únicamente el preservante sea su medio de conservación de la leche (Harricks, 2006).

Por otro lado, debe tomarse en cuenta que para la elaboración de productos lácteos, tales como el queso y el yogurt, se requiere que la leche no contenga antimicrobianos debido a que inhiben el crecimiento microbiológico de bacterias que ayudan a obtener las características deseables en este tipo de productos. Es por eso que aunque la natamicina sea utilizada en yogurt y queso se aplica en las superficies del producto final, y no durante el proceso de elaboración, evitando así que no inhiba las reacciones de los microorganismos que ayudan a obtener yogurt y quesos con las características que busca el mercado.

## **IX. CONCLUSIONES**

1. Se observó que la natamicina presentó efecto antimicrobiano en leche sin tratamiento térmico al disminuir los recuentos microbiológicos en las muestras tratadas bajo condiciones de refrigeración, utilizadas en este estudio.
2. Se determinó que la natamicina presenta una acción bacteriostática, reduciendo más de la mitad el recuento microbiológico que el recuento obtenido en la leche simple, evitando posibles reacciones metabólicas de los microorganismos que perjudiquen el tiempo de vida útil del producto.
3. La natamicina no cambió las características organolépticas en la leche fluida sin tratamiento térmico, según los resultados obtenidos por el panel de expertos.
4. Los valores de pH y acidez titulable de la leche con natamicina no tuvieron variaciones respecto a los de leche entera sin preservante.

## **X. RECOMENDACIONES**

1. Elaborar pantones que sirvan para la medición de los colores aceptables como parámetro de evaluación de la calidad de la leche, para los pequeños productores.
2. Determinar concentraciones mínimas inhibitorias de bacterias de la natamicina por medio de la realización de un antibiograma, para establecer las dosis mínimas efectivas.
3. Promover nuevos estudios sobre el tiempo de vida de anaquel al utilizar natamicina en leche, en los cuales se utilicen las condiciones normales de operación de los pequeños productores.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

Abellee, K; Díaz, J. 2009. *Principios básicos de la leche en la Industria*. 4ªed. Costa Rica. 102 págs.

Alais, F. 2006. *Ciencia de la Leche. Técnicas Lecheras*. 1ªed. México. 92 págs.

Andrade, R; Guillen, A. 2009. *Preservantes en la Industria Alimentaria*. 4ªed. Lima: Perú. 252 págs.

Bailey & Scot. 2009. *Diagnóstico Microbiológico*. 12ª ed. Editorial Panamericana. Estados Unidos. 126-131 págs.

Ballen, K. 2002 *Parámetros de Calidad en leche cruda*. [Colombia]. 230 págs.

Calvo, J; Sagastume, P. 2011. «Procesos y Métodos de Empleo en la Industria de la Alimentación». *Revista de la Universidad de Colombia*. Colombia. 100-120 págs.

Carballo, R; Rebollar, P. 2008. «Nuevas tendencias en la Alimentación». *Revista de la Universidad Politécnica de Madrid*. España. 78-91

Codex Alimentarius. 2010. «Directrices Generales sobre Métodos de Análisis y Toma de Muestra». 1-103.

Comisión Guatemalteca de Normas. «Norma Guatemalteca Obligatoria. Coguanor NGO 34 041, Leche de vaca, pasteurizada, fresca, ultra alta temperatura (UHT), esterilizada y homogenizada». 14 págs.

Díaz, J. 2009. *Productos de la Industria láctea en Guatemala*. Cámara de Productores de Leche de Guatemala. Guatemala. 51 págs.

DMS, 2007. *Regulaciones de Natamicina*. <http://www.natamycin.com/es/regulatory>, última actualización 2011, consulta realizada 18.03.2015

Ergel. M. 1983. *Medición del Efectos antimicrobiano del Sorbato de Potasio y Natamicina por el Método de HPLC*. Alemania. 13 págs.

González, A. 2013. *Calidad de leche*. México. 100-120 págs.

Gonzales, J. 2010. *Evaluación de leche para consumo humano y de utilización en la Industria Láctea*. Estados Unidos. 107-121 págs.

Grabow W. 1996. *Waterborne diseases: Update on water quality assessment and control*. Estados Unidos. 193–202 págs

Harricks J. 2006. *Microbial food spoilage – Losses and control strategies a brief review of the literature*. Estados Unidos. University of Wisconsin. 107-113 págs

Helguera, L. 2008 *Preservantes utilizados para proteger la salud del consumidor*. México, 231 págs

Illescas, M. 2009. *Microbiología de la leche*. 2ª ed. Brasilia: Brasil. 189 págs.

Kornacki J.L. & Johnson J. 2001 *Enterobacteriaceae, Coliforms, and Escherichia coli as Quality and Safety Indicators In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4 ed. Washington: Estados Unidos. 182 págs

Lancelle, M. 2011. «Calidad microbiológica de la leche cruda usada en las queserías de la Provincia de Corrientes». *Revista de Bromatología*. [Cubá]:55-60.

Lima, E; Noa, M; Gonzalez, P. 2009. «Evaluación de la Presencia de residuos de antibióticos y quimioterapéuticos en leche en Jalisco, México». *Revista de Salud Animal*. [México]. Vol. 31 No. 1 (2009): 29-33

Mahaut, M; Almudi, R. 2003. *Productos lácteos Industriales*. 4ª ed. España: Madrid, España. 113 págs.

Montaño, K; Vargas, F. 2006. «Péptidos antimicrobianos, un mecanismo de defensa». *Revista de la Universidad Autónoma de México*. [México]. 20-36

Molina, K. 2001. *Procesos en la Industria Láctea*. 1ª ed. España: Barcelona. 120 págs.

Morvan, A; Iwanaga, S; Comps, M y Bachere, E. 2007. «Evaluación de Péptidos en Alimentos». [Estados Unidos]. LIV (79): 189.

Muñoz, C. 2010. *Directrices para la conservación de la leche cruda*. 2ª ed. México. 15 págs.

Nieto, C. 2010. *Determinación de dióxido de cloro como preservante de leche cruda y efectos sobre las características físico-químicas*. [Guayaquil, Ecuador]. 122 págs

Reglamento Técnico Centroamericano 64.04.50:08 «Alimentos criterios microbiológicos para la inocuidad de alimentos». 34 págs

Thayer, B; Gerson, J y Duff, I. 2001. «Seguridad alimentaria natural, mediante agua ionizada y aminoácidos, Pharma & Biotech» [Estados Unidos]. 7 págs.

Santamaria, M. 2003. *Industria Alimentaria Tecnologías Emergentes*. 1ª ed. España: Barcelona. 112 págs.

Schller A. 2011. «Procedimientos de la Industria Láctea». *Revista de la Dirección de Industria Alimentaria*. [Córdoba, Argentina]. 75-78

Téllez, G; Castaño, J. 2010. «Péptidos antimicrobianos». *Revista de Investigación*. [Colombia]. 14 (1). 55-67

Villaruel, R; Corrales, M. 2004. «Péptidos antimicrobianos. Investigación en salud». *Revista de Investigación*. [México]. VI (179). 170-179

Welscher M, Napel H, Balagué M, Souza C, Riezman H. 2007. *Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane*. Estados Unidos. *Journal of Biology and Chemistry*. 7; 283(10):6393-401.

Zambrano, J; Ramírez, J. 2008. «Valoración de la calidad higiénica de la leche cruda en la asociación de productores de leche de Sotará – Asproleso, mediante las pruebas indirectas de resazurina y azul de metileno». *Revista de Investigación*. [México]. 1-12.

## XII. ANEXOS

### A. Ficha técnica del producto

GUATEMALA EL SALVADOR HONDURAS NICARAGUA COSTA RICA PANAMÁ



Ficha Técnica Producto

### **NATAMICINA (SIN = 235 Codex Alimentarius)**

#### **DESCRIPCIÓN**

La Natamicina ( $C_{33}H_{47}NO_{13}$ ) es un agente natural obtenido a partir de la fermentación de carbohidratos por *Streptomyces natalensis*, muy eficaz en el control de una amplia variedad de mohos y levaduras, pero sin efecto alguno sobre bacterias.

Este producto actúa muy eficazmente entre un pH de 5 a 7, pero sigue siendo muy eficaz entre el rango de 3 a 9. De allí su amplio uso dentro de la industria de alimentos para el control de este tipo de contaminaciones, pues la Natamicina no depende de la acidez del medio para poder actuar, tal y como lo hacen otros tipos de preservantes químicos. Es una sustancia incolora, inodora e insípida, que se obtiene en forma cristalizada, es muy estable.

#### **MECANISMO DE ACCIÓN**

Actúa sobre la membrana celular y en algunos microorganismos sobre diferentes enzimas del metabolismo oxidativo. Para inhibir la actividad vital de la célula son necesarias concentraciones mucho menores que para inhibir el crecimiento.

#### **ESPECTRO DE ACCIÓN**

Su principal aplicación es contra levaduras y mohos, inhibiendo el desarrollo de hongos productores de aflatoxinas. Los hongos con el tiempo, tienden a crear formas resistentes, lo cual hay que tener en cuenta evitando su uso prolongado.

#### **ESTABILIDAD**

Su estabilidad puede verse afectada por: acidez, temperatura, luz, oxidantes y metales pesados, por lo que se recomienda evitar este tipo de factores

- A un pH inferior a 3 y superior a 9, la natamicina es menos estable. Una suspensión acuosa de natamicina.
- Soporta una temperatura de 50°C durante varios días sin que se aprecie ningún efecto. Puede incluso, resistir un calentamiento de 100°C durante algunas horas.
- El rango óptimo de estabilidad está entre pH 4 y 7.
- La función del producto puede verse perturbada por la exposición prolongada a la luz ultravioleta.

## **ESTABILIDAD**

Su estabilidad puede verse afectada por: acidez, temperatura, luz, oxidantes y metales pesados, por lo que se recomienda evitar este tipo de factores.

- A un pH inferior a 3 y superior a 9, la natamicina es menos estable. Una suspensión acuosa de natamicina.
- Soporta una temperatura de 50 °C durante varios días sin que se aprecie ningún efecto. Puede incluso, resistir un calentamiento de 100 ° C durante algunas horas.
- El rango óptimo de estabilidad esta entre pH 4 y 7.
- La función del producto puede verse perturbada por la exposición prolongada a la luz ultravioleta.

## **SALUD PÚBLICA**

No implica ningún peligro para la salud humana. El FAO/WHO comité experto en aditivos alimenticios determinó para las personas un consumo de 0,3 mg por día x Kg de peso, dicho nivel es considerablemente más alto que la cantidad utilizada en los quesos y embutidos.

## **EFFECTOS SECUNDARIOS**

No hay ningún efecto colateral en las concentraciones usadas. Es metabolizada por el hígado y excretada.

## **APLICACIONES**

La Natamicina puede utilizarse en una serie de productos citados a continuación:

- Por adición directa, en yogurt, leches acidificadas, cremas ácidas, queso crema y requesón (Ricotta)
- En el tratamiento superficial de quesos madurados, sea ésta por inmersión en salmuera, por aspersión o aplicándolo directamente sobre el producto
- Por aplicación directa sobre quesos rallados o pulverizados
- Por aplicación directa en jaleas y mermeladas
- Por aplicación directa en zumos, concentrados y néctares de frutas
- Refrescos y bebidas saborizadas
- Bebidas con o sin pulpa

## **DOSIFICACIÓN Y CONDICIONES DE ALMACENAJE**

La Natamicina se dosifica directamente al sistema alimenticio a razón de 1 a 5 gramos por cada 100 kilos de producto terminado. Deberá almacenarse bajo condiciones de sombra, en lugar fresco y seco, alejado de la radiación solar directa y en su recipiente original. Bajo estas condiciones de almacenamiento, el producto tiene una duración en vida de anaquel de 2 años (24 meses).

## **BENEFICIOS DE USO**

- ✓ Preservante natural obtenido por fermentación
- ✓ Efectivo en cantidades menores a las utilizadas con preservantes sintéticos.
- ✓ No imparte sabor ni color al producto final
- ✓ Estable a temperaturas de pasterización

**COMPOSICIÓN**

La composición de la presentación de Natamicina es la siguiente:

Natamicina (como ingrediente activo) 50% mínimo

Excipiente (ingrediente inerte) 50% máximo

**PRESENTACIÓN**

La presentación es en botes de polietileno conteniendo 100 ó 500 gramos de Natamicina al 50%, debidamente identificados mediante una etiqueta

Fuente: Aseal, Natamicina.

**B. Certificado de análisis**

F-017-1 v03

**CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE PRODUCTO TERMINADO****Producto:** FUNGHI MIX 90**Cliente:** ASEAL DE EL SALVADOR SA CV**Lote:** 012014/01**Fecha de elaboración:** FEBRERO DE 2014**Fecha de vencimiento:** FEBRERO DE 2016**Características Organolépticas**

Determinación	Especificación	Resultado
Aspecto	Polvo	Cumple
Color	Blanco – Crema	Cumple
Sabor	Inodoro	Cumple

**Parámetros físico-químicos:**

Determinación	Especificación	Resultado
pH	5.0 – 7.0	6.0
Plomo (ppm)	≤2	Cumple
Pureza (en base seca)	≥90%	Cumple
Humedad (%)	6,0 – 9.0	7.0
Cenizas sulfatadas (%)	<5%	Cumple
Rotación óptica	+ 250° - + 295°	Cumple

El cumplimiento con los límites de metales pesados según el Codex Alimentarius y microbiológicos de nuestra especificación están asegurados por nuestro SGC y HACCP y no son efectuados necesariamente en todos los lotes de producción. El producto ha sido examinado por nuestro departamento de Control de Calidad de acuerdo con los estándares de Harmony Ingredients Solutions S.A. y corresponde a la especificación.

Confeccionado por  
Ing. Esteban Marino  
Calidad

Revisado por  
Solange Trenyan  
Desarrollo

### C. Boletas de evaluación sensorial

#### EVALUACIÓN SENSORIAL TRIANGULAR DE LECHE

Género: F M

Edad:

**Instrucciones:**

Se le presentan 3 muestras, clasifique cada muestra utilizando las categorías que se muestran a continuación. Identifique cual de las tres es distinta y en el apartado de respuesta coloque el número de la muestra que considera que difiere de las otras y porque. En caso de no encontrar ninguna diferencia escriba cualquier número de las muestras y coloque la palabra "SIN DIFERENCIA"

**Categorías para sabor, olor y apariencia:**

1=Me desagrada mucho 2= Levemente desagradable 3= Sabor característico sin cambios  
4= Levemente cambio sin desagrarme 5= Cambia mucho sin desagrarme

**Categorías para color:**

1= Crema 2= Blanco 3= Amarilla

Característica	5829	6325	8960
Color			
Olor			
Sabor			

Respuesta: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

#### EVALUACIÓN SENSORIAL TRIANGULAR DE LECHE

Género: F M

Edad:

**Instrucciones:**

Se le presentan 3 muestras, clasifique cada muestra utilizando las categorías que se muestran a continuación. Identifique cual de las tres es distinta y en el apartado de respuesta coloque el número de la muestra que considera que difiere de las otras y porque. En caso de no encontrar ninguna diferencia escriba cualquier número de las muestras y coloque la palabra "SIN DIFERENCIA"

**Categorías para sabor, olor y apariencia:**

1=Me desagrada mucho 2= Levemente desagradable 3= Sabor característico sin cambios  
4= Levemente cambio sin desagrarme 5= Cambia mucho sin desagrarme

**Categorías para color:**

1= Crema 2= Blanco 3= Amarilla

Característica	3895	7460	1048
Color			
Olor			
Sabor			

Respuesta: \_\_\_\_\_