



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante  
de suero de leche bovina procedente de distintas zonas**

Estrada Alarcón, Raquel Magaly y Segarra Carrera, Pamela Mishell

Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en  
Biotecnología

Ing. Sánchez Llaguno, Sungey Naynee. Ph.D.

31 de agosto del 2021

## Urkund Analysis Result

Analysed Document: TESIS ESTRADA-SEGARRA.docx (D111851993)  
 Submitted: 8/31/2021 12:17:00 AM  
 Submitted By: neiramosquera@uteq.edu.ec  
 Significance: 8 %

### Sources included in the report:

Bioconservación de carnes para el consumo humano con la adición de mucílago de cacao (Theobroma cacao L.).docx (D110702491)  
 "Bioconservación de carnes para el consumo humano con la adición de mucílago de cacao (Theobroma cacao L.).docx (D110558141)  
<https://publitec.com/2018/12/nisina-en-productos-carnicos-para-inhibicion-de-listeria-monocytogenes-revision-de-trabajos-realizados-en-la-argentina/>  
<https://revistas.udea.edu.co/index.php/hm/article/download/335279/20794046/>  
<https://www.goodyearrubberproducts.com/files/SEPCO/SEPCOCatalog/SEPCOCatalog1.Page76.asp>  
<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3908/1/P.AL233.pdf>  
<http://181.65.155.170/bitstream/UNACH/68/3/Lactosuero.pdf>  
[https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1044&context=ing\\_alimentos](https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1044&context=ing_alimentos)  
<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/15798/1/T-ESPESD-002891.pdf>  
<https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/1826/1/T-UTEQ-0064.pdf>  
<https://repositorio.unajma.edu.pe/bitstream/handle/123456789/202/08-2013-EPIA-Huaraca%20Aparco-Evaluaci%C3%B3n%20del%20rendimiento%20del%20sistema%20LP%20en%20queso.pdf?sequence=1&isAllowed=y>  
<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/11101/1/96T00543.pdf>  
<https://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/3198/1/T-ALIM-UTEQ-0051.pdf>  
<https://riunet.upv.es/bitstream/10251/15757/1/tesisUPV3786.pdf>  
<https://repositorio.unicordoba.edu.co/bitstream/handle/ucordoba/1059/Trabajo%20de%20Grado%20Erika%20Coronado%20y%20Reinaldo%20Espitia.pdf?sequence=1&isAllowed=y>  
<https://stadium.unad.edu.co/preview/UNAD.php?url=/bitstream/10596/25839/1/TESIS%20ANGELINE%20MONCADA%20.pdf>  
<http://repositorio.utm.edu.ec/bitstream/123456789/4490/1/03%20EIA%20369%20TESIS.pdf>

### Instances where selected sources appear:

56

Firma:



**Sungey Naynee Sánchez Llaguno, Ph.D.**

C.C: 1205348673

**Directora del proyecto de investigación**



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación , **“Estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de suero de leche bovina procedente de distintas zonas”** fue realizado por las señoritas Estrada Alarcón, Raquel Magaly y Segarra Carrera, Pamela Mishell el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales , teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 31 de agosto de 2021**

Firma:



Firmado electrónicamente por:  
SUNGEY NAYNEE  
SANCHEZ LLAGUNO

**Sungey Naynee Sánchez Llaguno, Ph.D.**

C.C: 1205348673

**Directora del proyecto de investigación**



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA**

Nosotros, Estrada Alarcón, Raquel Magaly y Segarra Carrera, Pamela Mishell, con cédulas de ciudadanía n° 171249148-7 y 230048278-9, declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **Estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de suero de leche bovina procedente de distintas zonas** es de nuestra autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 31 de agosto de 2021**

Firma

Estrada Alarcón, Raquel Magaly

C.C: 171249148-7

Firma

Segarra Carrera, Pamela Mishell

C.C: 230048278-9



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN**

Nosotros Estrada Alarcón, Raquel Magaly y Segarra Carrera, Pamela Mishell, con cédulas de ciudadanía n° 171249148-7 y 230048278-9 autorizamos a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **Estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de suero de leche bovina procedente de distintas zonas** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de nuestra responsabilidad.

**Santo Domingo de los Tsáchilas, 31 de agosto de 2021**

Firma

**Estrada Alarcón, Raquel Magaly**

Firma

**Segarra Carrera, Pamela Mishell**

## DEDICATORIA

Dedico este proyecto de investigación a Dios por permitirme avanzar en mi formación profesional y por ser mi guía en todo momento.

A mi esposo Alfredo quien ha estado siempre a mi lado en cada momento de la vida dándome ánimos para seguir adelante con este sueño tan anhelado y por ser quien creyó en mi capacidad para formarme como profesional.

A mis hijas Noelia y Valeria por ser mi fuente de inspiración para continuar y ser las personas que le dan sentido a mi vida, todo mi esfuerzo se los dedico a ustedes.

Raquel.

Todo el esfuerzo plasmado en este trabajo está dedicado a Dios por ser mi guía en toda mi vida.

A mi madre, Anita, por ser mi persona incondicional, mi fortaleza y mi inspiración en todo momento, eres única mamá, este trabajo es para ti.

A mi hermano Christian, por ser el apoyo de mi madre y el mío, así como mi modelo a seguir.

A mis abuelos Ramiro y Anita, por haberme llenado de motivación en todo el transcurso de mi vida estudiantil, por ser mis segundos padres, gracias por todo.

A toda mi familia por los consejos y los mensajes de motivación que me han sabido brindar.

Gracias por ser una pieza fundamental para haber podido llegar a cumplir uno de mis mayores sueños.

Pamela.

## AGRADECIMIENTO

A Dios, por seguirme otorgando vida para permitirme realizar mi sueño más anhelado y por la bendición de tener a las personas que amo junto a mí

A mi esposo Alfredo por ser uno de los pilares fundamentales y por su apoyo incondicional para que este sueño pueda convertirse en una realidad. A mis hijas Noelia y Valeria por la comprensión y paciencia que han tenido conmigo entendiendo que todo mi tiempo fue enfocado a mis estudios.

Mi agradecimiento especial a la Dra. Sungey Naynee Sánchez Llaguno por permitirme contar con su apoyo como tutora de este proyecto y por ser fuente de inspiración en mi desarrollo profesional y al Dr. Juan Alejandro Neira Mosquera por brindarme todo su apoyo y por permitirme recurrir a su capacidad y conocimiento científico como maestro y ahora en el proyecto de investigación.

A mis padres Estuardo y Delia por inculcar en mí la responsabilidad y perseverancia y por todo el apoyo brindado a lo largo de mi proceso de formación académica.

A mis suegros Clifford y Anita por la preocupación de verme realizada como una profesional y por su apoyo siempre incondicional.

A mis amigos Pamela y Jefferson con quienes compartí muchas anécdotas, alegrías y tristezas a lo largo de mi vida universitaria.

A todas las personas, quienes pusieron su granito de arena para que este proyecto de investigación se desarrolle de la mejor manera.

Raquel



Mi más sincero agradecimiento a la tutor de este proyecto, la doctora Sungey Sánchez, por habernos guiado de la mejor manera durante el desarrollo de esta investigación y a lo largo de la vida universitaria. Fue un gusto haberla conocido.

De la misma manera agradezco infinitamente al doctor Juan Neira por la paciencia y el apoyo incondicional en el transcurso de este trabajo.

A todos los que de una u otra manera nos contribuyeron en el desarrollo de esta investigación, muchas gracias Ing. Katty Medina por su buena predisposición al momento de ejecutar la fase de laboratorio de nuestro trabajo.

Gracias a mis amigos en especial a Raquel, Karen y Jefferson que fueron parte de esta vida universitaria, por haber hecho ameno todo este tiempo, a mis amigos de escuela, gracias infinitas por todo.

Gracias Willian, por estar incondicionalmente para mí y apoyarme en todo momento.

Pamela.

## Índice de Contenido

|   |    |
|---|----|
| Carátula .....  | 1  |
| Análisis Urkund.....  | 2  |
| Certificación .....   | 3  |
| Responsabilidad de autoría.....   | 4  |
| Autorización de publicación.....  | 5  |
| Dedicatoria .....   | 6  |
| Agradecimiento.....   | 8  |
| Resumen .....   | 20 |
| Abstract.....   | 21 |
| Capítulo I .....  | 22 |
| Introducción.....   | 22 |
| Objetivo General .....  | 23 |
| Objetivos Específicos .....   | 23 |
| Hipótesis .....   | 24 |
| <i>Hipótesis para el Factor A (Concentraciones de nisina)</i> .....                             | 24 |
| <i>Hipótesis para el Factor B (Temperatura)</i> .....   | 24 |
| Capítulo II .....   | 25 |
| Revisión de literatura.....   | 25 |
| Suero lácteo .....  | 25 |
| Tipos de suero lácteo .....   | 25 |
| El suero lácteo y su impacto ambiental .....  | 26 |
| Enfoque y valorización biotecnológica del suero para la generación de<br>nuevos productos ..... | 27 |
| Bacteriocinas .....   | 28 |
| Clasificación de las bacteriocinas.....   | 29 |
| Fuente: (Heredia-Castro et al., 2017) .....   | 30 |
| Nisina .....  | 30 |
| Composición química y física de la nisina .....   | 31 |
| Estructura de la nisina .....   | 31 |
| Propiedades fisicoquímicas de la nisina.....  | 32 |
| Propiedades antimicrobianas .....   | 33 |
| Modo de acción .....  | 33 |

|  |    |
|--|----|
| Limitaciones de la nisina.....                                   | 34 |
| Aplicaciones de la nisina como preservativo alimenticio.....     | 35 |
| Adición de nisina en productos lácteos.....                      | 35 |
| Análisis fisicoquímicos.....                                     | 36 |
| pH.....  | 36 |
| Acidez titulable.....  | 36 |
| Unidades formadoras de colonias UFC.....                         | 37 |
| Grasa.....   | 37 |
| Proteína.....  | 37 |
| Ceniza.....  | 37 |
| Capítulo III.....  | 39 |
| Metodología.....   | 39 |
| Ubicación del área de investigación.....                         | 39 |
| Ubicación política.....  | 39 |
| Ubicación geográfica.....  | 39 |
| Ubicación Ecológica.....   | 39 |
| Materiales.....  | 40 |
| Adición de las distintas concentraciones de nisina al suero..... | 40 |
| Determinación de pH.....   | 40 |
| Determinación de acidez titulable.....                           | 41 |
| Determinación de ceniza.....                                     | 42 |
| Determinación de grasas.....                                     | 42 |
| Determinación de proteína.....                                   | 43 |
| Determinación de presencia de microorganismos.....               | 44 |
| Métodos.....   | 45 |
| Recolección de muestras.....                                     | 45 |
| Tratamiento de suero lácteo con bioconservante (nisina).....     | 45 |
| Diseño experimental.....   | 46 |
| Factores del experimento.....                                    | 46 |
| Tratamientos a comparar.....                                     | 47 |
| Tipo de diseño.....  | 48 |
| Repeticiones.....  | 48 |
| Características de las unidades experimentales.....              | 48 |

|   |    |
|---|----|
| Análisis estadístico .....  | 49 |
| Esquema del análisis de varianza .....  | 49 |
| Análisis funcional.....   | 50 |
| Variables evaluadas .....   | 50 |
| pH .....  | 50 |
| Acidez titulable.....   | 50 |
| Ceniza .....  | 51 |
| Grasas.....   | 52 |
| Composición proteica .....  | 53 |
| Preparación de la muestra.....  | 53 |
| Digestión.....  | 53 |
| Destilación .....   | 53 |
| Titulación .....  | 53 |
| Recuento de UFC (Ensayo para aerobios y para hongos y levadura .....  | 54 |
| Preparación de la muestra.....  | 54 |
| Procedimiento.....  | 54 |
| Capítulo IV.....  | 56 |
| Resultados .....  | 56 |
| Análisis de varianza para la variable pH DÍA 0 .....  | 56 |
| Análisis de varianza para la variable pH DÍA 1 .....  | 57 |
| Análisis de varianza para la variable pH DÍA 2 .....  | 58 |
| Análisis de varianza para la variable pH DÍA 3 .....  | 59 |
| Análisis de varianza para la variable pH DÍA 4 .....  | 60 |
| Análisis de varianza para la variable pH Día 7 .....  | 61 |
| Análisis de varianza para la variable acidez titulable día 0 .....  | 62 |
| Análisis de varianza para la variable acidez titulable día 1 .....  | 63 |
| Análisis de varianza para la variable acidez titulable día 2 .....  | 64 |
| Análisis de varianza para la variable acidez titulable día 3 .....  | 65 |
| Análisis de varianza para la variable acidez titulable día 4 .....  | 66 |
| Análisis de varianza para la variable acidez titulable día 7 .....  | 67 |
| Análisis de varianza de bacterias día 0 de suero lácteo a diferentes<br>concentraciones, temperatura y procedencia..... | 68 |
| Análisis de varianza de bacterias día 7 de suero lácteo a diferentes<br>concentraciones, temperatura y procedencia..... | 69 |

|  |     |
|--|-----|
| Análisis de varianza de levaduras y hongos día 0, de suero lácteo a diferentes concentraciones, temperatura y procedencia .....  | 70  |
| Análisis de varianza de levaduras y hongos día 7, de suero lácteo a diferentes concentraciones, temperatura y procedencia .....  | 71  |
| Resultados de las pruebas fisicoquímicas (ceniza, grasa y proteína) de los sueros de las dos procedencias estudiadas. ....   | 72  |
| Prueba de significancia de Tukey de pH del estudio de tres concentraciones de nisina, aplicados al suero de leche. ....  | 73  |
| Prueba de significancia de Tukey de pH de la temperatura (T. ambiente y T. refrigeración) del estudio de estudio de distintas concentraciones de nisina aplicada en suero lácteo. ....   | 81  |
| Prueba de significancia de Tukey de la procedencia (p.artesanal y p.tradicional) del estudio de distintas concentraciones de nisina aplicadas en suero lácteo. ....  | 89  |
| Prueba de significancia de Tukey de pH de la interacción AxB (concentración/temperatura) del estudio de distintas concentraciones de nisina aplicadas en suero lácteo, con diferente temperatura y procedencia. ....               | 98  |
| Prueba de significancia de Tukey de pH de la interacción AxC (concentración/procedencia) del estudio de distintas concentraciones de nisina aplicadas en suero lácteo, con diferente temperatura y procedencia. ....               | 107 |
| Prueba de significancia de Tukey de pH de la interacción BxC (temperatura/procedencia) del estudio de distintas concentraciones de nisina aplicadas en suero lácteo, con diferente temperatura y procedencia. ....                 | 115 |
| Prueba de significancia de Tukey de pH de la interacción AxBxC (concentración/temperatura/procedencia) del estudio de distintas concentraciones de nisina aplicadas en suero lácteo, con diferente temperatura y procedencia. .... | 124 |
| Resultados de control de calidad para las variables pH, acidez y UFC (bacterias, y hongos y levaduras).....  | 134 |
| Análisis de componentes principales .....  | 138 |
| Matriz de componente .....   | 140 |
| Capítulo V .....   | 145 |
| Discusión .....  | 145 |
| Pruebas fisicoquímicas en la procedencia del suero lácteo.....   | 145 |
| Para ceniza .....  | 145 |
| Para grasa.....  | 145 |
| Para proteína .....  | 146 |
| Concentración (Factor A).....  | 146 |
| Con respecto al pH .....   | 146 |

|  |     |
|--|-----|
| Con respecto a la acidez.....  | 148 |
| Con respecto a UFC .....   | 150 |
| Temperatura (Factor B).....  | 151 |
| Con respecto al pH .....   | 151 |
| Con respecto a la acidez.....  | 153 |
| Factor C (Procedencia) .....   | 156 |
| Con respecto al pH .....   | 156 |
| Con respecto a la acidez.....  | 158 |
| Con respecto a UFC .....   | 160 |
| Interacción entre el Factor A (Concentración) y Factor B (Temperatura) ... | 162 |
| Con respecto al pH .....   | 162 |
| Con respecto a la acidez.....  | 165 |
| Interacción entre el Factor A (Concentración) y Factor C (Procedencia) ... | 166 |
| Con respecto a pH .....  | 166 |
| Con respecto a acidez.....   | 169 |
| Interacción entre el Factor B (Temperatura) y Factor C (Procedencia) ..... | 170 |
| Con respecto a pH .....  | 170 |
| Con respecto a la acidez.....  | 173 |
| Interacción A*B*C .....  | 174 |
| Con respecto al pH .....   | 174 |
| Con respecto a la acidez.....  | 177 |
| Con respecto a UFC .....   | 180 |
| Capítulo VI.....   | 183 |
| Conclusiones y recomendaciones.....  | 183 |
| Conclusiones. ....   | 183 |
| Factor A (Concentraciones).....  | 183 |
| Factor B (Temperatura de conservación).....                                | 183 |
| Factor C (Procedencia) .....   | 183 |
| Interacción A*B*C .....  | 184 |
| Recomendaciones. ....  | 184 |
| Capítulo VII.....  | 186 |
| Bibliografía .....   | 186 |

## Índice de tablas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1</b> <i>Composición del suero dulce y suero ácido.....</i>   | 26 |
| <b>Tabla 2</b> <i>Producción microbiana de productos de valor agregado a partir del suero.....</i>   | 27 |
| <b>Tabla 3</b> <i>Clasificación del bacteriocinas .....</i>  | 29 |
| <b>Tabla 4</b> <i>Composición física y química de la nisina.....</i>   | 31 |
| <b>Tabla 5</b> <i>Recursos empleados para la aplicación de las distintas concentraciones de nisina a evaluar en el suero.....</i>  | 40 |
| <b>Tabla 6</b> <i>Recursos utilizados para la determinación de pH en las muestras de suero ....</i>  | 40 |
| <b>Tabla 7</b> <i>Recursos empleados para la determinación de acidez titulable en las muestras de suero.....</i>   | 41 |
| <b>Tabla 8</b> <i>Recursos empleados para la determinación de ceniza en las muestras de suero .....</i>  | 42 |
| <b>Tabla 9</b> <i>Recursos empleados para la determinación de grasas en las muestras de suero .....</i>  | 42 |
| <b>Tabla 10</b> <i>Recursos empleados para la determinación de proteínas en las muestras de suero .....</i>  | 43 |
| <b>Tabla 11</b> <i>Recursos empleados para la determinación de la presencia de microorganismos .....</i>   | 44 |
| <b>Tabla 12</b> <i>Datos para tratamiento del suero lácteo con el bioconservante.....</i>  | 45 |
| <b>Tabla 13</b> <i>Factores y niveles a probar en el estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de suero de leche bovina procedente de distintas zonas .....</i>    | 46 |
| <b>Tabla 14</b> <i>Tratamientos a comparar en el estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de suero de leche bovina procedente de distintas zonas.....</i>         | 47 |
| <b>Tabla 15</b> <i>Esquema del análisis de varianza del estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de suero de leche bovina procedente de distintas zonas .....</i> | 49 |
| <b>Tabla 16</b> <i>Resultados de análisis de varianza de pH día 0 de suero lácteo de diferentes concentraciones, temperatura y procedencia.....</i>  | 56 |
| <b>Tabla 17</b> <i>Resultados de análisis de varianza de pH día 1 de suero lácteo de diferentes concentraciones, temperatura y procedencia.....</i>  | 57 |
| <b>Tabla 18</b> <i>Resultados de análisis de varianza de pH día 2 de suero lácteo de diferentes concentraciones, temperatura y procedencia.....</i>  | 58 |
| <b>Tabla 19</b> <i>Resultados de análisis de varianza de pH día 3 de suero lácteo de diferentes concentraciones, temperatura y procedencia.....</i>  | 59 |
| <b>Tabla 20</b> <i>Resultados de análisis de varianza de pH día 4 de suero lácteo de diferentes concentraciones, temperatura y procedencia.....</i>  | 60 |
| <b>Tabla 21</b> <i>Resultados de análisis de varianza de pH día 7 de suero lácteo de diferentes concentraciones, temperatura y procedencia.....</i>  | 61 |
| <b>Tabla 22</b> <i>Resultados de análisis de varianza de acidez día 0 de suero lácteo de diferentes concentraciones, temperatura y procedencia .....</i>   | 62 |
| <b>Tabla 23</b> <i>Resultados de análisis de varianza para la variable acidez titulable día 1 .....</i>  | 63 |
| <b>Tabla 24</b> <i>Resultados de análisis de varianza para la variable acidez titulable día 2.....</i>   | 64 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla 25</b> Resultados de análisis de varianza para la variable acidez titulable día 3.....  | 65  |
| <b>Tabla 26</b> Resultados de análisis de varianza para la variable acidez titulable día 4.....  | 66  |
| <b>Tabla 27</b> Resultados de análisis de varianza para la variable acidez titulable día 7.....  | 67  |
| <b>Tabla 28</b> Resultados de análisis de varianza de bacterias día 0 de suero lácteo a diferentes concentraciones, temperatura y procedencia .....          | 68  |
| <b>Tabla 29</b> Resultados de análisis de varianza de bacterias día 7 de suero lácteo a diferentes concentraciones, temperatura y procedencia .....          | 69  |
| <b>Tabla 30</b> Resultados de análisis de varianza de levaduras y hongos día 0 de suero lácteo a diferentes concentraciones, temperatura y procedencia ..... | 70  |
| <b>Tabla 31</b> Resultados de análisis de varianza de levaduras y hongos día 7 de suero lácteo a diferentes concentraciones, temperatura y procedencia ..... | 71  |
| <b>Tabla 32</b> Resultados de las pruebas fisicoquímicas (ceniza, grasa y proteína) de los sueros de las dos procedencias estudiadas.....                    | 72  |
| <b>Tabla 33</b> Resultados de variable de pH de Factor A (concentración)(Tukey $P>0,05$ ) ....   | 73  |
| <b>Tabla 34</b> Resultados de variable de acidez titulable de Factor A (concentración)(Tukey $P>0,05$ ) .....  | 74  |
| <b>Tabla 35</b> Resultados de UFC de Factor A (concentración)(Tukey $P>0,05$ ).....  | 75  |
| <b>Tabla 36</b> Resultados de variable pH de Factor B (Temperatura)(Tukey $P>0,05$ ).....  | 81  |
| <b>Tabla 37</b> Resultados de variable acidez de Factor B (Temperatura)(Tukey $P>0,05$ ) ....  | 82  |
| <b>Tabla 38</b> Resultados de UFC de Factor B (Temperatura)(Tukey $P>0,05$ ).....  | 84  |
| <b>Tabla 39</b> Resultados de variable pH de Factor C (Procedencia)(Tukey $P>0,05$ ) .....   | 89  |
| <b>Tabla 40</b> Resultados de variable acidez titulable de Factor C (Procedencia)(Tukey $P>0,05$ ) .....   | 91  |
| <b>Tabla 41</b> Resultados de variable UFC de Factor C (Procedencia) (Tukey $P>0,05$ ) .....   | 92  |
| <b>Tabla 42</b> Pruebas de significancia (Tukey) de pH de interacción AxB (concentración/temperatura) .....  | 98  |
| <b>Tabla 43</b> Pruebas de significancia Tukey de acidez titulable de la interacción AxB (concentración/temperatura) .....                                   | 100 |
| <b>Tabla 44</b> Pruebas de significancia Tukey de UFC de la interacción AxB (concentración/temperatura) .....  | 101 |
| <b>Tabla 45</b> Pruebas de significancia (Tukey) de pH de interacción AxC (concentración/procedencia).....   | 107 |
| <b>Tabla 46</b> Pruebas de significancia (Tukey) de acidez titulable de interacción AxC (concentración/procedencia).....                                     | 108 |
| <b>Tabla 47</b> Pruebas de significancia (Tukey) de UFC de interacción AxC (concentración/procedencia).....  | 110 |
| <b>Tabla 48</b> Pruebas de significancia (Tukey) de pH de interacción BxC(temperatura/procedencia).....  | 115 |
| <b>Tabla 49</b> Pruebas de significancia (Tukey) de acidez titulable de interacción BxC (temperatura/procedencia) .....                                      | 117 |
| <b>Tabla 50</b> Pruebas de significancia (Tukey) de UFC de interacción BxC (temperatura/procedencia) .....   | 118 |
| <b>Tabla 51</b> Pruebas de significancia (Tukey) de pH de interacción AxBxC (concentración/temperatura/procedencia) .....                                    | 124 |



|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla 52</b> <i>Pruebas de significancia (Tukey) de acidez titulable de interacción AxBxC (concentración/temperatura/procedencia)</i> ..... | 126 |
| <b>Tabla 53</b> <i>Pruebas de significancia (Tukey) de UFC de interacción AxBxC (concentración/temperatura/procedencia)</i> .....              | 128 |
| <b>Tabla 54</b> <i>Matriz de correlación de componentes principales</i> .....  | 138 |
| <b>Tabla 55</b> <i>Matriz de componentes</i> .....   | 140 |
| <b>Tabla 56</b> <i>Tabla de comunalidades</i> .....  | 142 |

## Índice de figuras

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 1</b> Estructura de la nisina Aba:Ácido aminobutírico); Dha :Dehydroalanina; Dhb :Dehydrobutirina (B-metildehidroalanina); Ala-S-Ala:Iantitonina; Aba-S-Ala: B-metillantionina..... | 32  |
| <b>Figura 2</b> Mecanismo de acción dual de la nisina <i>Lactococcus lactis</i> .....   | 34  |
| <b>Figura 3</b> Resumen de resultados de pH Factor A (concentración), para prueba de significancia de Tukey.....  | 76  |
| <b>Figura 4</b> Resumen de resultados de pH Factor A (concentración), para prueba de significancia de Tukey.....  | 78  |
| <b>Figura 5</b> Resumen de resultados de Bacterias Factor A (concentración), para prueba de significancia de Tukey.....   | 80  |
| <b>Figura 6</b> Resumen de resultados de Levaduras y hongos Factor A (concentración), para prueba de significancia de Tukey.....  | 80  |
| <b>Figura 7</b> Resumen de resultados de pH del Factor B (Temperatura), para prueba de significancia de Tukey.....  | 85  |
| <b>Figura 8</b> Resumen de resultados de acidez del Factor B (Temperatura), para prueba de significancia de Tukey.....  | 87  |
| <b>Figura 9</b> Resumen de resultados de acidez del Factor B (Temperatura), para prueba de significancia de Tukey.....  | 88  |
| <b>Figura 10</b> Resumen de resultados de Levaduras y Hongos Factor B (temperatura), para prueba de significancia de Tukey.....   | 89  |
| <b>Figura 11</b> Resumen de resultados de pH del Factor C (Procedencia), para prueba de significancia de Tukey.....   | 94  |
| <b>Figura 12</b> Resumen de resultados de acidez del Factor C (Procedencia), para prueba de significancia de Tukey.....   | 96  |
| <b>Figura 13</b> Resumen de resultados de Bacterias Factor C (procedencia), para prueba de significancia de Tukey.....  | 97  |
| <b>Figura 14</b> Resumen de resultados de Levaduras y hongos Factor C (procedencia), para prueba de significancia de Tukey.....   | 98  |
| <b>Figura 15</b> Resumen de resultados de pH de interacción AxB (concentración/temperatura), para prueba de significancia de Tukey.....   | 103 |
| <b>Figura 16</b> Resumen de resultados de acidez de interacción AxB (concentración/temperatura), para prueba de significancia de Tukey.....   | 104 |
| <b>Figura 17</b> Resumen de resultados de la interacción AxB (concentración/temperatura) de bacterias, para prueba de significancia de Tukey.....   | 105 |
| <b>Figura 18</b> Resumen de resultados de la interacción AxB (concentración/temperatura) de bacterias, para prueba de significancia de Tukey.....   | 106 |
| <b>Figura 19</b> Resumen de resultados de pH de interacción AxC (concentración/procedencia), para prueba de significancia de Tukey.....   | 111 |
| <b>Figura 20</b> Resumen de resultados de pH de interacción AxC (concentración/procedencia), para prueba de significancia de Tukey.....   | 113 |
| <b>Figura 21</b> Resumen de resultados de bacterias de interacción AxC (concentración/procedencia), para prueba de significancia de Tukey.....  | 114 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 22</b> Resumen de resultados de Hongos y levaduras de interacción AxC (concentración/procedencia) de bacterias, para prueba de significancia de Tukey.....         | 114 |
| <b>Figura 23</b> Resumen de resultados de pH de interacción BxC (temperatura/procedencia) .....  | 120 |
| <b>Figura 24</b> Resumen de resultados de acidez de interacción BxC (temperatura/procedencia) .....  | 121 |
| <b>Figura 25</b> Resumen de resultados de la interacción BxC (temperatura/procedencia) de bacterias, para prueba de significancia de Tukey.....                              | 122 |
| <b>Figura 26</b> Resumen de resultados de la interacción BxC (temperatura/procedencia) de Levaduras y hongos, para prueba de significancia de Tukey.....                     | 123 |
| <b>Figura 27</b> Resumen de resultados de pH de interacción AxBxC (Concentración/temperatura/procedencia), para prueba de significancia de Tukey.....                        | 130 |
| <b>Figura 28</b> Resumen de resultados de acidez de interacción AxBxC (Concentración/temperatura/procedencia), para prueba de significancia de Tukey.....                    | 131 |
| <b>Figura 29</b> Resumen de resultados de la interacción AxBxC (Concentración/temperatura/procedencia) de bacterias, para prueba de significancia de Tukey. ....             | 132 |
| <b>Figura 30</b> Resumen de resultados de la interacción AxBxC (Concentración/temperatura/procedencia) de levaduras y bacterias, para prueba de significancia de Tukey. .... | 133 |
| <b>Figura 31</b> Resultado del comportamiento del pH del suero lácteo con el bioconservante nisina, desde el día 0 al día 7 de análisis.....                                 | 134 |
| <b>Figura 32</b> Resultado de comportamiento de acidez del suero lácteo con el bioconservante nisina desde el día 0 al día 7 de análisis .....                               | 134 |
| <b>Figura 33</b> Resultados de UFC (Bacterias ácido lácticas) del suero lácteo con el bioconservante nisina, desde el día 0 hasta el día 7 de análisis. ....                 | 136 |
| <b>Figura 34</b> Resultados de UFC (Hongos y levaduras) del suero lácteo con el bioconservante nisina, desde el día 0 hasta el día 7 de análisis.....                        | 137 |
| <b>Figura 35</b> Gráfico de sedimentación del análisis de componentes principales.....   | 141 |
| <b>Figura 36</b> Gráfico de sedimentación del análisis de los componentes principales.....   | 143 |

## Resumen

En esta investigación se tuvo como objetivo estudiar el efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de suero de leche bovina procedente de distintas zonas tomando en cuenta que el lactosuero es uno de los mayores contaminantes ambientales proveniente de industrias queseras buscando así herramientas bioconservadoras que contribuyan a alargar su vida útil para posteriormente darle valor agregado al producto en estudio. La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de bromatología y biociencias de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Santo Domingo, las muestras obtenidas para el análisis fueron de procedencia tradicional y artesanal. Se evaluaron variables fisicoquímicas como cenizas, grasas y proteína a los sueros lácteos y durante 7 días se analizaron las variables de pH y acidez, así como UFC en aerobios y en levaduras y hongos para evaluar su comportamiento en días. Para los resultados estadísticos se aplicó un ANOVA con modelo factorial (AxBxC) mediante un diseño de bloques completamente al azar (D.B.C.A) en donde A corresponde a las concentraciones de nisina aplicada, B a la temperatura a la que se conservó la muestra y C a la procedencia de la muestra de suero, cada tratamiento se desarrolló con 3 repeticiones con un total de 36 unidades experimentales. Para la diferencia entre medias de los tratamientos se aplicó la prueba de Tukey ( $p > 0,05\%$ ). Los resultados obtenidos identificaron al tratamiento 5 (100 ppm\*refrigeración\*elaboración tradicional) que destaca a las variables de pH (6,32 a 6,13), acidez (0,12 a 0,14) desde el día 0 al 7 analizados encontrándose dentro de los parámetros adecuados con respecto a las normas INEN 2594:2011 y con respecto a UFC es el tratamiento que menos proliferación de microorganismos reportó para bacterias ( $8,04 \times 10^8$ ) y hongos ( $8,266 \times 10^{10}$ ) comparado con el resto de tratamientos.

### Palabras clave:

- **SUERO DE LECHE BOVINA**
- **NISINA**
- **PRUEBAS FISICOQUÍMICAS**
- **UFC**

### **Abstract**

The objective of this research was to study the effect of different concentrations of nisin as a biopreservative of bovine milk serum from different areas, taking into account that whey is one of the greatest environmental pollutants from cheese industries, thus seeking bioconservative tools that contribute to extend its useful life to later add value to the product under study. The present investigation was developed in the laboratory of bromatology and biosciences of the University of the Armed Forces ESPE Santo Domingo headquarters, the samples obtained for the analysis were of traditional and artisan origin. Physicochemical variables such as ashes, fats and protein were evaluated in the milk serum and for 7 days the variables of pH and acidity as well as CFU in aerobic bacteria and in yeasts and fungi were analyzed to evaluate their behavior in days. For the statistical results, an ANOVA with a factorial model (AxBxC) was applied using a completely randomized block design (DBCA) where A corresponds to the applied nisin concentrations, B to the temperature at which the sample was stored and C to the origin of the serum sample, each treatment was developed with 3 repetitions with a total of 36 experimental units. For the difference between means of the treatments, the Tukey test was applied ( $p > 0.05\%$ ). The results obtained identified treatment 5 (100 ppm \* refrigeration \* traditional preparation) that highlights the variables of pH (6.32 to 6.13), acidity (0.12 to 0.14) from day 0 to 7 analyzed Being within the appropriate parameters with respect to the INEN 2594: 2011 standards and with respect to CFU, it is the treatment that reported the least proliferation of microorganisms for bacteria ( $8.04 \times 10^8$ ) and fungi ( $8.266 \times 10^{10}$ ) compared to the rest of the treatments.

#### **Keywords:**

- **BOVINE MILK SERUM**
- **NISINA**
- **PHYSICOCHEMICAL TESTS**
- **UFC**

## Capítulo I

### Introducción

El suero de leche es un producto lácteo que se obtiene de la separación entre el coágulo de leche y la leche descremada durante la elaboración del queso, mediante acción ácida o enzimática del tipo de cuajo utilizado. A pesar de poseer compuestos de importancia con potenciales beneficios nutricionales y de salud, no constituye un sustituto integral de la leche; sin embargo, el lactosuero es aprovechado en varios países para la fabricación de productos alimenticios y suplementos, o como materia prima para producir otros ingredientes y compuestos (Poveda E., 2013).

De cada 100 litro de leche, 90 de ellos son suero, conservando el 55% de nutrientes de la leche. En Ecuador, la industria quesera genera 1.2 millones de litros de suero de leche por día, lo que significa que podría alimentar a 120,000 personas por día; sin embargo, gran parte de este producto no es comercializado lo que termina en desperdicio como comida de cerdos o desecho vertido sobre el sistema de alcantarillado público o quebradas, generando un grave problema ambiental (La cámara de comercio de Guayaquil, 2019). El problema de descargar el suero en corrientes o plantas de tratamiento de aguas residuales es su alta demanda biológica de oxígeno causada por las proteínas y carbohidratos, por lo que se ha estimado que una DBO (demanda biológica de oxígeno) representada en 100 lb. de suero es equivalente al desperdicio producido por 21 personas cada 24 horas (Ramirez, 2010).

Para analizar esta problemática es necesario mencionar sus causas. Una de ellas es el desconocimiento de algunos productores sobre las bondades nutricionales de este subproducto y la dificultad para acceder a las tecnologías

apropiadas para su manejo, procesamiento y conservación (Poveda E., 2013). Además, en las últimas décadas los estándares de calidad y conservación en la industria alimentaria son más exigentes.(Heredia-Castro et al., 2017).

La investigación de esta problemática se realizó con el interés de conocer el valor agregado que el suero de leche bovina aportará a la industria alimenticia y los efectos que puede provocar la aplicación de la bacteriocina (nisina) como método de bioconservación del mismo. Por lo tanto, esto permitió identificar el mejor tratamiento de conservación aplicado en el suero de leche bovina y su posterior uso como subproducto en la elaboración de alimentos de la industria alimenticia.

Para cumplir con lo propuesto se plantearon los siguientes objetivos

### **Objetivo General**

Estudiar el efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de suero de leche bovina procedente de distintas zonas.

### **Objetivos Específicos**

Evaluar distintas concentraciones de nisina como bioconservante, del suero de leche para su aplicación como materia prima en el aprovechamiento para posteriores procesos.

Estudiar la influencia de la temperatura en la conservación del suero mediante la aplicación de la bacteriocina nisina.

Determinar la influencia del sistema de elaboración de queso en las características del suero y su comportamiento en la conservación mediante la aplicación de nisina.

## **Hipótesis**

### ***Hipótesis para el Factor A (Concentraciones de nisina)***

**Ho:** Las distintas concentraciones de nisina aplicadas al suero de leche no influyen en los parámetros de conservación.

**Ha:** Las distintas concentraciones de nisina aplicadas al suero de leche influyen en los parámetros de conservación.

### ***Hipótesis para el Factor B (Temperatura)***

**Ho:** La temperatura aplicada al suero de la leche tratada con la bacteriocina nisina, no influye en los parámetros de conservación.

**Ha:** La temperatura aplicada al suero de leche tratada con la bacteriocina nisina, influye en los parámetros de conservación.

### **Hipótesis para el factor C (Procedencia)**

**Ho:** El sistema de elaboración del queso, no influye en las características del suero y su comportamiento en la conservación mediante la aplicación de la nisina.

**Ha:** El sistema de elaboración del queso, influye en las características del suero y su comportamiento en la conservación mediante la aplicación de la nisina.



## Capítulo II

### Revisión de literatura

#### Suero lácteo

El suero es un subproducto obtenido a partir de la producción de queso con gran importancia en la industria de los lácteos por los grandes y considerables volúmenes que se producen, así como también por la composición nutricional (El-Tanboly, 2017) . La producción anual a nivel mundial del suero es de 180 a 190x10<sup>6</sup> ton/año de tal manera que solo es procesada el 50% para la producción de nuevos alimentos y productos de tal manera que la mitad de dicha cantidad se la emplea directamente, el 30% como suero en polvo, el 15% como lactosa y subproductos y lo restante como concentrados de proteína de suero de queso (El-Tanboly, 2017). En el caso de Ecuador, el suero de leche no tiene un tratamiento adecuado para su aprovechamiento, por lo que sería importante incrementar la rentabilidad de operación en la industria quesera. El suero generado en este país está conformado por alrededor de 973000 toneladas de lactosa, producto con alta capacidad de transformación, así como también 175 toneladas de proteína que puede ser recuperable (Riofrío Grijalva, 2014).

#### Tipos de suero lácteo

Los tipos existentes de lactosueros dependen de la eliminación de caseína (R. A. Parra Huertas, 2009). El suero dulce es obtenido una vez que se lleva a cabo la coagulación enzimática con un pH de alrededor de 5.6 (Paredes et al., 2014) aunque la norma NTE INEN 2594:2011 establece que el suero de leche dulce debe cumplir con un pH mínimo de 6.8 y máximo de 6.4. Por otro lado, el suero ácido es el resultado de un proceso de fermentación o por la

añadidura de ácidos orgánicos o minerales para posteriormente lograr la coagulación de la caseína (Parra Huertas, 2009). De acuerdo a la norma NTE INEN 2594:2011 el pH para este tipo de sueros es 5.5 como mínimo y un máximo de 4.8.

**Tabla 1**

*Composición del suero dulce y suero ácido.*

| Componente                 | Suero dulce | Suero ácido |
|----------------------------|-------------|-------------|
| % de agua                  | 93-94       | 94-95       |
| Gravedad específica (kg/l) | 1.026       | 1.024-1.025 |
| % de grasa                 | 0.8         | 0           |
| % de proteína              | 0.9         | 0.9         |
| % de lactosa               | 4.5-5.0     | 3.8-4.4     |
| % ácido láctico            | 0.8         | 0.8         |
| % minerales                | 0.5-0.7     | 0.7-0.8     |
| pH                         | 5.8-6.6     | 4.5-5.0     |

Fuente: Van der Schans (2002)

### **El suero lácteo y su impacto ambiental**

Parte del suero obtenido en las industrias queseras son empleados como alimento para animales de granja y fertilizantes, otro porcentaje se descarga a cuerpos de agua generando un grave problema de contaminación (Iniesta Planells, 2020). El suero de leche es un compuesto con alta demanda de DBO por lo que una vez vertidos en alguna fuente de agua los microorganismos allí

habitables y degradables requieren de una mayor cantidad de oxígeno disuelto por tal motivo si la cantidad de oxígeno presente disminuye, se inducirá a la muerte de la fauna existente en dicho ecosistema y por consiguiente, se producirán malos olores debido a la putrefacción (Riofrío Grijalva, 2014).

### **Enfoque y valorización biotecnológica del suero para la generación de nuevos productos**

Verter grandes cantidades de suero al medio ambiente resulta una amenaza considerable para el medio ambiente debido a que la eliminación de este producto es una de las problemáticas que afronta la industria constantemente por lo que es necesario buscar y emplear tecnologías para un manejo adecuado y sustentable del suero. Al poseer gran cantidad de nutrientes, es capaz de actuar como un sustrato para el crecimiento de microorganismos y su posterior producción de productos con valor agregado (Kaur et al., 2020).

El suero es una amplia fuente de lactosa, proteínas funcionales, péptidos y otros nutrientes de tal forma que puede ser empleado para producir una gran cantidad de productos de valor agregado.

#### **Tabla 2**

*Producción microbiana de productos de valor agregado a partir del suero.*

| Productos  | Microorganismos                       | Sustrato       |
|------------|---------------------------------------|----------------|
| Bioetanol  | <i>Candida tropicalis</i> y           | Suero de queso |
|            | <i>Blastschizomyces capitatus</i>     | mozzarella     |
| Biobutanol | <i>Clostridium acetobutylicum</i> DSM | Suero de queso |

|                 |                                      |                |
|-----------------|--------------------------------------|----------------|
| Biodiesel       | <i>Cryptocodinium cohnii</i>         | Suero de queso |
| Bacteriocina    | <i>Enterococcus faecium</i>          | Suero de queso |
|                 | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> A11 |                |
| Ácido láctico   | <i>L.helveticus</i>                  | Suero de queso |
|                 | <i>L.plantarum</i> TISTR 2265        |                |
| B-galactosidasa | <i>A.Oryzae</i> CCT 0977             | Suero de queso |
| Proteasa        | <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2           | Suero de queso |

---

Fuente: (Kaur et al., 2020).

### **Bacteriocinas**

Las bacteriocinas son péptidos de origen ribosomal, que son secretados al medio extracelular y poseen la capacidad de inhibición del crecimiento de microorganismos. Existe una diversidad de microorganismos y se ha estimado que un 99% de bacterias producen una bacteriocina (Heredia-Castro et al., 2017).

Las bacteriocinas de mayor estudio son aquellas producidas por las bacterias ácido lácticas conocidas como BAL, y son generalmente reconocidos como seguro (GRAS), cuya participación en la fermentación y conservación de alimentos es relevante para el mejoramiento de la calidad higiénica mediante la inhibición de la flora competitiva de microorganismos patógenos tales como: *Listenia monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Salmonella*, entre otros (Mondragón Preciado et al., 2013).

## Clasificación de las bacteriocinas

Las bacteriocinas han sido clasificadas en cinco clases según varios criterios como: microorganismos productores, pesos moleculares, propiedades físicas, estructura química, modo de acción y características genéticas y bioquímicas detalladas en la tabla 3.

**Tabla 3**

*Clasificación de bacteriocinas.*

| Clasificación       | Características  | Subcategoría  | Ejemplo  |
|---------------------|--|---|--|
| Clase I<br>(Lantib) | <ul style="list-style-type: none"> <li>Péptidos que contienen aminoácidos modificados</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Tipo A (moléculas lineales)</li> <li>Tipo B (moléculas globulares)</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Nisina, subtilina, epidermina.</li> <li>Mersacidina</li> </ul>  |
| Clase II            | <ul style="list-style-type: none"> <li>Clase heterogénea de péptidos termoestables pequeños.</li> <li>Grupo de péptidos lineales.</li> <li>Degradación de proteínas grandes</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Subclase IIa (pediocina-antilisteria)</li> <li>Subclase IIb (compuesto de dos péptidos)</li> <li>Subclase IIc (otras bacteriocinas)</li> <li>Subclase II d</li> <li>Subclase II e</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Pedocina, enterocina, sakacina</li> <li>Plantaricina, lacticina F.</li> <li>Lactotococcina</li> <li>Lacticina Q</li> <li>Propionicina F.</li> </ul> |

|           |                                    |                                     |
|-----------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Clase III | Péptidos grandes<br>termolábiles   | • Helveticina J,<br>millericina B   |
| Clase IV  | Péptidos cíclicos                  | • Reutericina 6                     |
| Clase V   | Péptidos de estructura<br>circular | • Enterocina AS-48,<br>gasericina A |

Fuente: (Heredia-Castro et al., 2017)

## Nisina

La nisina es un péptido antimicrobiano producido por cepas de *Lactococcus lactis spp.* que ataca la pared celular causando lisis del microorganismo diana. Esta bacteriocina es utilizada en aplicaciones específicas como la prevención en la germinación de esporas y crecimiento de bacterias patógenas que contaminan productos alimenticios (Gharsallaoui et al., 2016).

Es producida por las BAL (bacterias ácido lácticas) de forma natural en la leche cruda y productos lácteos; sin embargo, cuando es producida de manera industrial, la nisina requiere condiciones nutricionales muy complejas lo que implica un aumento en los costos de producción (Gharsallaoui et al., 2016). La nisina se encuentra clasificada dentro de los lantibióticos de la clase I, los cuales son péptidos pequeños policíclicos, estables al calor, activos a nivel de membrana (Cano-Serna et al., 2015).

Ha sido aprobada para su uso en más de 50 países, por lo que la FDA le otorgó el estado generalmente reconocido como seguro (GRAS) en 1988, además el Comité del Codex de la FAO/OMS sobre la leche y productos lácteos permite a la nisina como un aditivo alimentario para el queso procesado en una concentración de 12,5 mg/Kg de producto, mientras que la FDA de EE.UU, permite 250 mg/Kg (Ibarra-Sánchez et al., 2020).

## Composición química y física de la nisina

**Tabla 4**

*Composición física y química de la nisina*

| <b>Nombre</b>           | <b>Nisina</b>                   |
|-------------------------|---------------------------------|
| Fórmula                 | $C_{143}H_{230}N_{42}O_{37}S_7$ |
| Peso molecular          | 3.354,07 g/mol                  |
| Numero CAS              | 1414-45-5                       |
| Forma                   | Polvo                           |
| Color                   | Beige                           |
| Solubilidad             | Soluble en agua                 |
| Fuente                  | <i>Lactococcus lactis</i>       |
| Olor                    | Sin datos disponibles           |
| Concentración           | 2.5% (saldo de NaCl)            |
| Temp. de almacenamiento | 2-8°C                           |
| pH                      | Sin datos disponibles           |

Fuente: (Sigma-Aldrich, 2021)

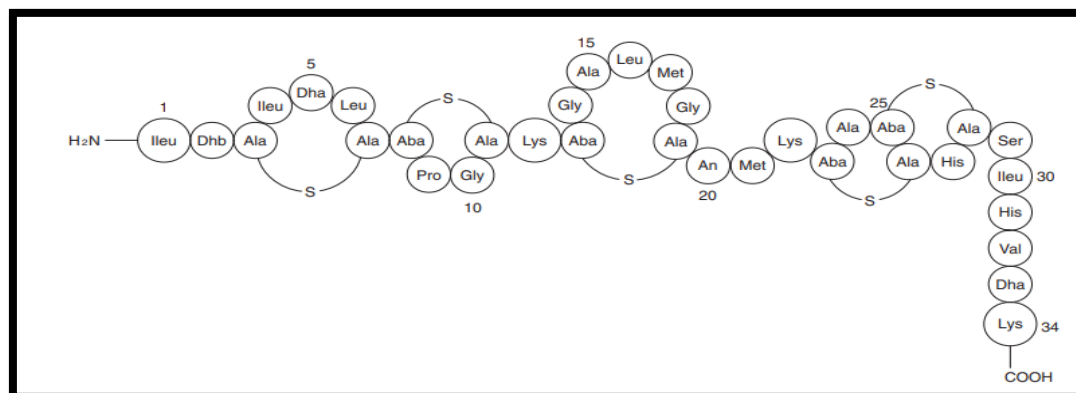
### Estructura de la nisina

La nisina pertenece a un grupo de bacteriocinas conocidos como lantibióticos, y estos se clasifican en dos subgrupos: los de tipo A que son los lantibióticos del tipo nisina y los de tipo B que son los lantibióticos del tipo duramicina.

Los antibióticos son polipéptidos policíclicos relativamente pequeños; la nisina consta de 34 aminoácidos con un peso de 3354 Da. Contiene aminoácidos inusuales como la lantionina o b-metillantionina, ambos forman puentes de tioéter de cadenas. La deshidroalanina y deshidrobutirina. En total, la nisina tiene dos deshidroalanina (Dha), una deshidrobutirina (Dhb), una lantionina y cuatro residuos de b-metillantionina (Delves-Broughton, 2014).

### Figura 1

*Estructura de la nisina* Aba:Ácido aminobutírico); Dha :Dehydroalanina; Dhb :Dehydrobutirina (B-metildehydroalanina); Ala-S-Ala:lantionina; Aba-S-Ala: B-metillantionina.



Fuente:(Delves-Broughton, 2014).

### Propiedades fisicoquímicas de la nisina

La actividad antimicrobiana de la nisina es dependiente de la solubilidad acuosa y estabilidad estructural que a su vez dependen del pH. La nisina es más soluble y más estable bajo condiciones ácidas, con una solubilidad de 12% a pH 2.5 y 4% a pH 5.0. Esta solubilidad es cercana a cero cuando el pH alcanza y excede la neutralidad, así mismo la actividad antimicrobiana es fuerte a pH ácido



y decrece gradualmente con el incremento del pH. Por otro lado, la actividad de la nisina es altamente estable a bajas temperaturas, durante la congelación, por ejemplo, pero esta actividad puede perderse cuando el péptido es calentando por un lapso largo de tiempo (Gharsallaoui et al., 2016).

### **Propiedades antimicrobianas**

Esta bacteriocina es muy efectiva contra varias bacterias Gram positivas patógenas como *Listeria monocytogenes* y *Clostridium botulinum* así como algunos patógenos Gram negativos como *Escherichia coli* y *Salmonella spp* cuando se combinan con quelantes como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), tratamientos térmicos, congelación o cualquier tratamiento, provocando la alteración de la pared celular haciendo que esta se vuelva permeable para que favorezca el contacto entre la nisina y la membrana citoplasmática (Gharsallaoui et al., 2016).

La mayoría de bacterias Gran negativas, levaduras y hongos, no son inhibidos por la bacteriocina, sin embargo, inhibe a la mayoría de baterías Gran positivas particularmente a aquellas que producen esporas. Dentro de las bacterias Gran positivas que inhibe la nisina están ciertas cepas de especies como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus* (Delves-Broughton, 1990).

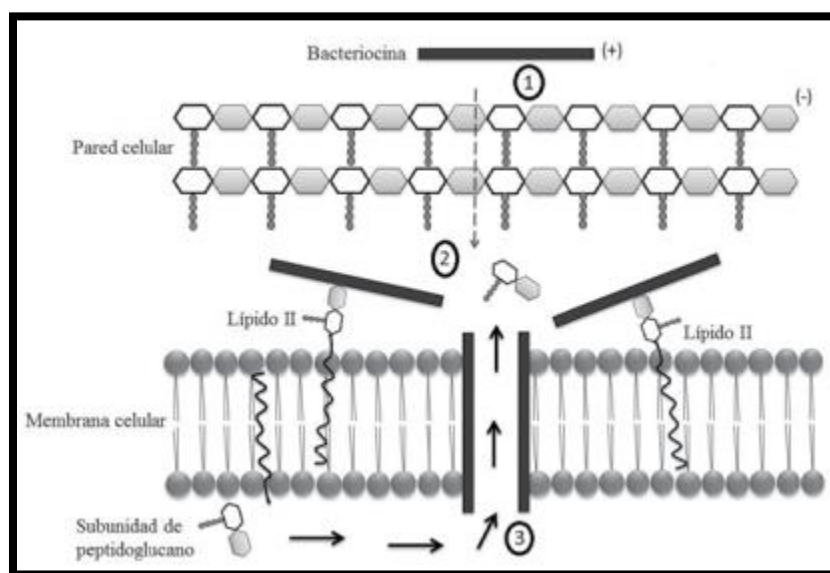
### **Modo de acción**

Las bacteriocinas de clase I como la nisina poseen un modo de acción dual, donde la bacteriocina se une a la pared celular mediante atracciones electrostáticas en la etapa 1, posteriormente, la nisina se une al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidoglucano que es el principal compuesto de la pared celular, el cual lo utiliza para anclarse a la membrana

celular en la etapa 2, luego la bacteriocina cambia su orientación en relación con la membrana y se inserta en la misma, y como paso final, la unión de varios péptidos en el lugar de inserción desarrollan un poro transmembranal el cual permite la salida de moléculas como los aminoácidos y ATP ocasionando la muerte celular de la bacteria en la etapa 3 (Mondragón Preciado et al., 2013).

## Figura 2

*Mecanismo de acción dual de la nisina *Lactococcus lactis*.*



Fuente:(Mondragón Preciado et al., 2013).

## Limitaciones de la nisina

La nisina es menos eficaz en ciertos productos lácteos, sobre todo en aquellos productos lácteos que poseen un pH neutro elaborados con leche entera. Varios son los factores que explican estas limitaciones de la nisina en ciertos productos lácteos, destacando entre ellos la falta de estabilidad de la nisina a pH neutro, la posibilidad de que la nisina se divida en glóbulos de grasa, cuando la nisina se une a la caseína aniónica, por la presencia de cationes

divalentes que bloquean el acceso a los fosfolípidos de la membrana celular y el potencial para que se desarrolle la resistencia a la nisina (Ibarra-Sánchez et al., 2020).

### **Aplicaciones de la nisina como preservativo alimenticio**

La nisina es la única bacteriocina permitida para uso en alimentos, este péptido fue adicionado a la lista de aditivos alimentarios bajo el número Europeo E234. Su uso autorizado por muchas razones, entre las cuales se destacan la siguientes: Es un péptido de fácil degradación con las proteasas intestinales, no representa riesgos para la salud humana y no altera las propiedades organolépticas y propiedades sensoriales del alimento (Gharsallaoui et al., 2016).

Son consideradas varias estrategias para la aplicación de la nisina en la preservación de los alimentos como el uso de productos fermentativos con una cepa productora de nisina como ingrediente, adición de nisina purificada o semipurificada como conservante y adición de nisina encapsulada y/o la inmovilizada de nisina en matrices sólidas para controlar su liberación y protegerlo de la degradación de enzimas proteolíticas (Gharsallaoui et al., 2016).

### **Adición de nisina en productos lácteos**

En la leche, la nisina posee una eficacia de corto tiempo debido a la interacción existente entre la bacteriocina y los glóbulos de la grasa y sus proteínas, pese a esto varios estudios donde la leche fue la matriz estudiada, la nisina tuvo un efecto antilisterial ideal, en la que se redujo la población de *L.monocytogenes* por debajo del límite de detección de 1log UFC/mL en 4 horas, manteniendo este efecto hasta por 7 días a 21°C (Cano-Serna et al., 2015).

Además, otros productos lácteos, como postres refrigerados no pueden someterse a una esterilización completa sin dañar sus cualidades organolépticas, por lo que a veces son conservados con nisina para prolongar su vida útil. La adición de la nisina a la leche está permitida en algunos países debido a problemas de vida útil asociados con el clima por su alta temperatura ambiental, el transporte de larga distancia e inadecuada refrigeración. Sin embargo, no está permitido en la Unión Europea, Estado Unidos y otros países con climas templados (Delves-Broughton, 2014).

### **Análisis fisicoquímicos**

Las características fisicoquímicas de los subproductos de origen lácteo deben ser evaluadas por la industria láctea para determinar el potencial de los distintos tipos de suero para lograr convertirse en ingredientes de otros productos (De Meneses et al., 2020).

### **pH**

El pH del queso influye de manera directa en propiedades estructurales del mismo, se presume que es por las interacciones químicas entre los componentes estructurales que dependen del pH. El contenido total de calcio dentro de la cuajada que se controla por el pH de la leche en el fraguado y el de la cuajada en drenaje del suero, determina el pH de la cuajada (Yazici et al., 2010). El pH del suero se mide para el control de calidad de rutina debido a que es una muestra mucho más representativa que una muestra de cuajada en la elaboración del queso (Yazici et al., 2010).

### **Acidez titulable**

Este parámetro permite la detección de la acidez del suero presentado principalmente como ácido láctico. Cuando este valor incrementa en la acidez

baja indica una mejor calidad del suero debido a que es posible un mejor aprovechamiento determinando así el destino para la producción de otros alimentos (Ramirez, 2010).

### **Unidades formadoras de colonias UFC**

Debido a que cada microorganismo puede originarse como un grupo de células se le añade el término de unidades formadoras de colonia para expresar dicho resultado. Esto permite la determinación del número de microorganismos presenten en una muestra de acuerdo al medio de cultivo empleado (Ramirez, 2010).

### **Grasa**

La cantidad de grasa en el suero depende de la calidad composicional de la leche, así como el tipo de trabajo de carácter mecánico antes y luego de la coagulación del producto lácteo. Cuando existen altos contenidos de grasa y caseína en el suero el rendimiento de queso disminuye (Alava Viteri et al., 2014).

### **Proteína**

La proteína dentro del suero es uno de los elementos más representativos al igual que algunas sales minerales, además, se le atribuye la mayor potencialidad para su posterior aplicación. El suero dulce, por otro lado, es el más empleado para la obtención de proteínas a partir de la coagulación enzimática (Alava Viteri et al., 2014).

### **Ceniza**

La ceniza tiene un gran valor potencial al igual que la proteína para su posterior uso industrial (Ricardo Enrique López Barreto, Mónica Liliana Becerra

Jiménez, 2018). La cantidad de cenizas determina el contenido de minerales neto en el suero lácteo, además, permite conocer la pureza de ciertos ingredientes empleados para elaborar alimentos (Márquez, 2014).

## Capítulo III

### Metodología

#### Ubicación del área de investigación

##### *Ubicación política*

País: Ecuador

Provincia: Santo Domingo de los Tsáchilas

Cantón: Santo Domingo de los Colorados

Parroquias: San Miguel de los Bancos y Santo Domingo

##### *Ubicación geográfica*

Las muestras de procedencia tradicional se obtuvieron en la Agroindustria “El Campirano” ubicada en la vía Chone km 1 ½ en Santo Domingo de los Tsáchilas. Por otro lado, las muestras de procedencia artesanal se obtuvieron de una finca ubicada en Ganaderos Orenses.

La investigación desarrollada en laboratorio tuvo lugar en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas en las instalaciones de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE la misma que se encuentra ubicada en el kilómetro 24 de la vía Santo Domingo- Quevedo, perteneciente a la parroquia Luz de América.

##### *Ubicación Ecológica*

Zona de vida: Bosque húmedo tropical

Altitud: 224 msnm

Temperatura promedio: 24,6 °C

Precipitación: 260 mm/año

|                   |                   |
|-------------------|-------------------|
| Humedad relativa: | 85%               |
| Heliofanía:       | 680 horas luz/año |
| Suelo:            | Franco arenoso    |

## **Materiales**

### ***Adición de las distintas concentraciones de nisina al suero***

#### **Tabla 5**

*Recursos empleados para la aplicación de las distintas concentraciones de nisina a evaluar en el suero.*

| <b>Equipos</b>    | <b>Insumos</b>                | <b>Materiales/reactivos</b>      |
|-------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Balanza analítica | Espátula                      | Nisina A 2,5% marca Lactocomerce |
|                   | Vaso de precipitado de 100 mL | Suero Lácteo                     |
|                   | Vidrio reloj                  |                                  |
|                   | Lienzo                        |                                  |

### ***Determinación de pH***

#### **Tabla 6**

*Recursos utilizados para la determinación de pH en las muestras de suero.*

| <b>Equipos</b> | <b>Insumos</b> | <b>Reactivo</b> |
|----------------|----------------|-----------------|
|----------------|----------------|-----------------|



---

Potenciómetro    Vaso de precipitación de 200 mL    Agua destilada

Agitador de vidrio

---

***Determinación de acidez titulable***

**Tabla 7**

*Recursos empleados para la determinación de acidez titulable en las muestras de suero.*

| <b>Equipos</b>    | <b>Insumos</b>        | <b>Reactivos</b>               |
|-------------------|-----------------------|--------------------------------|
| Balanza analítica | Vaso de precipitación | Hidróxido de Sodio (NaOH)0.1 N |
|                   | Agitador de vidrio    | Fenolftaleína                  |
|                   | Material de limpieza  |                                |
|                   | Bureta de 50 mL       |                                |
|                   | Soporte universal     |                                |

---

***Determinación de ceniza*****Tabla 8***Recursos empleados para la determinación de ceniza en las muestras de suero.*

| <b>Equipos</b>  | <b>Insumos</b>        | <b>Materiales</b> |
|---|-----------------------|-------------------|
| Baño María  | Crisol                | Muestra de suero  |
| Estufa ajustada a $103^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ | Vaso de precipitación |                   |
| Desecador   | Agitador de vidrio    |                   |
| Balanza analítica al 0,1 mg                           | Guantes               |                   |
| Mufla   | Pinzas                |                   |

***Determinación de grasas*****Tabla 9***Recursos empleados para la determinación de grasas en las muestras de suero.*

| <b>Equipos</b>    | <b>Insumos</b>        | <b>Reactivos</b> |
|-------------------|-----------------------|------------------|
| Desecador         | Vaso de precipitación | Hexano           |
| Balanza universal | Agitador de vidrio    |                  |
| Estufa            | Crisol                |                  |
| Baño María        | Soporte universal     |                  |

Extractor de Pipetas graduadas 50 mL

humo/Sorbona o

colector

Aparato de Soxhlet

### ***Determinación de proteína***

#### **Tabla 10**

*Recursos empleados para la determinación de proteínas en las muestras de suero.*

| <b>Equipos</b>                                  | <b>Insumos</b>              | <b>Reactivos</b>  |
|---|-----------------------------|---|
| Unidad digestora                                | Tubos de destilación        | Ácido sulfúrico concentrado al 96%                                  |
| Plancha de calentamiento con agitador magnético | Matraz Erlenmeyer de 250 mL | Solución de Ácido Bórico al 2% ( $\text{HBO}_3$ )                   |
| Equipos de titulación                           | Gotero                      | Solución de Ácido Clorhídrico 0.1N (HCl), debidamente estandarizada |

|  |                              |   |
|--|------------------------------|---|
| Balanza analítica sensible al<br>0,1 mg  | Mortero                      | Tabletas catalizadoras                          |
| Extractor de humos/Sorbona o<br>colector | Bureta de 50 cm <sup>3</sup> | Solución de Hidróxido de<br>Sodio al 35% (NaOH) |
| Unidad de destilación                    |                              | Indicador Kjeldahl                              |
| Termómetro                               |                              | Agua destilada                                  |

---

### ***Determinación de presencia de microorganismos***

#### **Tabla 11**

*Recursos empleados para la determinación de la presencia de microorganismos.*

| <b>Equipos</b> | <b>Insumos</b>                  | <b>Reactivos</b>                         |
|----------------|---------------------------------|--|
| Vórtex         | Vasos de<br>precipitación       | Agua peptonada<br>Petriilm para hongos y |
| Incubadora     | Micropipetas<br>Tubos de ensayo | levaduras<br>Petriilm para aerobios      |

---

## **Métodos**

Para el estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de suero de leche bovina procedente de distintas zonas se desarrollaron dos fases de tal manera que la primera fue la recolección de muestras en las localidades tomadas en cuenta para el estudio y la segunda consistió en el análisis de la muestra aplicada el bioconservante en laboratorio.

### ***Recolección de muestras***

Para la recolección de las muestras de suero lácteo se ha tomado como referencia el instructivo para la toma de muestras de leche cruda y suero de leche INT/CL/010 (Agrocalidad, 2017).

### ***Tratamiento de suero lácteo con bioconservante (nisina)***

Para la conservación del suero lácteo se adicionaron varias concentraciones de nisina (50, 100 y 200 ppm) en 200 mL de suero lácteo siguiendo el detalle de la tabla 12 y tomando como referencia la norma general para los aditivos alimentarios CODEX STAN 192-1995 la cual especifica 12,5 mg/Kg como dosis máxima. Pg 238.(CODEX ALIMENTARIUS, 2019) y se tomó en consideración el procedimiento realizado en el estudio de (Vinicio, 2010).

## **Tabla 12**

### *Datos para tratamiento de suero lácteo con el bioconservante*

| Concentración de nisina (ppm) | Volumen de muestra de suero empleado | Masa soluto de la nisina |
|-------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
|                               |                                      |                          |

|         |        |        |
|---------|--------|--------|
| 50 ppm  | 0,20 L | 10 mg. |
| 100 ppm | 0,20 L | 20 mg  |
| 200 ppm | 0,20 L | 40 mg. |

### Diseño experimental

#### *Factores del experimento*

#### Tabla 13

*Factores y niveles a probar en el estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de suero de leche bovina procedente de distintas zonas.*

| Factores                        | Niveles  |
|---------------------------------|--|
| Concentraciones de nisina (A)   | a0= 50 ppm<br>a1= 100 ppm<br>a2= 200 ppm                 |
| Temperatura de conservación (B) | b0= T. ambiente<br>b1= Refrigeración                     |
| Procedencia del suero (C)       | c0= Elaboración tradicional<br>c1= Elaboración artesanal |

**Tratamientos a comparar****Tabla 14**

*Tratamientos a comparar en el estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de suero de leche bovina procedente de distintas zonas.*

| N° Tratamiento | Tratamientos(interacciones) | Descripción  |
|----------------|-----------------------------|--|
| T1             | a0b0c0                      | 50 ppm+ T. ambiente+Elaboración tradicional        |
| T2             | a1b0c0                      | 100 ppm+ T. ambiente+<br>Elaboración tradicional   |
| T3             | a2b0c0                      | 200 ppm+ T. ambiente+<br>Elaboración tradicional   |
| T4             | a0b1c0                      | 50 ppm+ Refrigeración+<br>Elaboración tradicional  |
| T5             | a1b1c0                      | 100 ppm+ Refrigeración+<br>Elaboración tradicional |
| T6             | a2b1c0                      | 200 ppm+ Refrigeración+<br>Elaboración tradicional |
| T7             | a0b0c1                      | 50 ppm + T. ambiente+ Elaboración artesanal        |
| T8             | a1b0c1                      | 100 ppm + T. ambiente +<br>Elaboración artesanal   |

|     |        |  |
|-----|--------|--|
| T9  | a2b0c1 | 200 ppm + T. ambiente +<br>Elaboración artesanal   |
| T10 | a0b1c1 | 50 ppm + Refrigeración +<br>Elaboración artesanal  |
| T11 | a1b1c1 | 100 ppm + Refrigeración +<br>Elaboración artesanal |
| T12 | a2b1c1 | 200 ppm + Refrigeración +<br>Elaboración artesanal |

---

### ***Tipo de diseño***

Se empleó ANOVA con modelo trifactorial (3x2x2) con un diseño de bloques completamente al azar (D.B.C.A.) donde A corresponde a las concentraciones de nisina aplicada, B a la temperatura a la cual va a estar conservada y C la procedencia de la muestra de suero, cada tratamiento se desarrolló con 3 repeticiones.

### ***Repeticiones***

Los 12 tratamientos incluyeron 3 repeticiones por cada tratamiento, dando un total de 36 unidades experimentales.

### ***Características de las unidades experimentales***

Para esta investigación se aplicó un modelo factorial en la cual se emplearon 12 tratamientos (200 ml cada uno) con tres réplicas para cada uno, de los cuales, 6 fueron de suero de leche de elaboración tradicional y los 6 restantes del sistema artesanal, de estos 3 corresponden a la temperatura de



refrigeración con concentraciones de 50 ppm, 100 ppm y 200 ppm de nisina, de igual manera se realizó en temperatura ambiente.

### **Análisis estadístico**

#### ***Esquema del análisis de varianza***

**Tabla 15**

*Esquema del análisis de varianza del estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de suero de leche bovina procedente de distintas zonas.*

| <b>Fuentes de Variación</b>   |                 | <b>Grados de Libertad</b> |
|-------------------------------|-----------------|---------------------------|
| Concentraciones de nisina (A) | a-1             | 2                         |
| Temperatura (B)               | b-1             | 1                         |
| Procedencia (C)               | c-1             | 1                         |
| AxB                           | (a-1)(b-1)      | 2                         |
| AxC                           | (a-1)(c-1)      | 2                         |
| BxC                           | (b-1)(c-1)      | 1                         |
| AxBxC                         | (a-1)(b-1)(c-1) | 2                         |
| Bloque                        | d-1             | 2                         |
| Error experimental            | abc (n-1)       | 22                        |
| Total                         |                 | 35                        |

### **Análisis funcional**

Para aquellas variables con análisis de varianza significativos, se aplicó la prueba de significancia de Tukey al 5%.

### **VARIABLES EVALUADAS**

Para los análisis físico-químicos del suero lácteo se han tomado como referencia las NTE-INEN 2494-2011 (NTE, 2011).

#### ***pH***

- Calibrar el potenciómetro con los buffer de pH 4 y pH 7.
- En un vaso de precipitación colocar la muestra de suero lácteo.
- Mezclar con el agitador de vidrio
- Introducir el electrodo del potenciómetro para realizar la medición respectiva.

#### ***Acidez titulable***

El procedimiento se desarrolló tomando en cuenta la norma NTE INEN 13

- Colocar la muestra en el vaso de precipitación y añadir 2 0 3 gotas de fenolftaleína, tomando en cuenta que la misma cantidad deben ser añadidas en las demás muestras.
- Agitar el contenido mientras cae por gotas la solución de hidróxido de sodio 0.1 N, hasta que este se torne de color rosa pálido de manera uniforme, mostrándose así la neutralización de ácidos y bases.
- Tomar lectura de la cantidad de solución de NaOH consumida en la bureta, el resultado se expresa en ácido láctico mediante el siguiente cálculo.

$$\% \text{ Ácido Láctico} = \frac{\text{mL de NaOH} * \text{N de NaOH} * 0,090}{\text{mL de la muestra}} * 100$$

Donde,

0,090 = Factor de ácido láctico

mL NaOH = mL de NaOH necesarios para titulación de la muestra

N = Normalidad de NaOH 0.1 N

mL = mL de la muestra usados para titular.

### **Ceniza**

Esta técnica se desarrolló tomando en cuenta la norma NTE INEN 14 (Técnica, 1983).

- Lavar cuidadosamente y secar el crisol en la estufa ajustada a  $103^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. Dejar enfriar en el desecador y pesar
- Trasferir la muestra de suero lácteo al crisol y pesar aproximadamente 5g de muestra.
- Colocar el crisol en el baño María a ebullición por 30 min
- Transferir el crisol a la estufa ajustada a  $103^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 3 h
- Dejar enfriar el crisol con los sólidos totales en el desecador y pesar. Repetir el calentamiento por períodos de 30 min, enfriando y pesando hasta que no haya disminución de masa.
- Introducir el crisol en la mufla a  $530^{\circ}\text{C} \pm 20^{\circ}\text{C}$  hasta la obtención de cenizas libres de partículas de carbón, obteniéndose al cabo de 2 ó 3 h.
- Sacar el crisol con las cenizas, dejar enfriar en el desecador y pesar, repetir el proceso de incineración por períodos de 30 min, enfriando y pesando hasta que no haya disminución de masa.
- Determinar las cenizas mediante el siguiente cálculo.

$$C = \frac{m_3 - m}{m_2 - m} * 100$$

Donde,

m = masa de crisol vacío en g.

m<sub>2</sub> = masa de crisol con suero lácteo (antes de la desecación), en g

m<sub>3</sub> = masa de crisol con cenizas (luego de incineración), en g

C = cantidad de cenizas, en porcentaje de masa

### **Grasas**

Esta técnica se desarrolló de acuerdo a (Pasmay, 2015).

- Desecar la muestra para que el solvente penetre mejor
- Trocear y moler: rompiendo la estructura de la muestra, así el solvente extrae mejor los lípidos.
- Evapora el disolvente y se pesa el residuo y por la diferencia se conocen los datos de cantidad grasa, mediante el siguiente cálculo:

$$\% \text{ Grasa cruda} = \frac{W_1 - W_2}{W} * 100$$

Donde,

W<sub>1</sub> = Peso de matraz con grasa, en g

W<sub>2</sub> = Peso de matraz solo, en g

W = Peso de la muestra, en g

## ***Composición proteica***

### **Preparación de la muestra**

- Llevar la muestra a 20°C y mezclar hasta su homogenización

#### Digestión

- Pesar aproximadamente 0,3 g. de muestra y añadir al microtubo digestor.
- Añadir al microtubo una tableta catalizadora y 5mL de Ácido Sulfúrico concentrado.
- Colocar los tubos de digestión con las muestras en el block -digest con el colector de humos funcionando.
- Realizar la digestión a una temperatura de 420°C y un tiempo que puede variar entre 30 minutos.
- Al finalizar el líquido contenido es de un color verde o azul transparente dependiendo del catalizador utilizado.
- Dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente.
- Evitar la precipitación agitando de vez en cuando.

### **Destilación**

- En cada microtubo adicionar 10 mL de agua destilada.
- Colocar el microtubo y el matraz de recepción con 50 mL de Ácido Bórico al 2% en el sistema de destilación.
- Encender el sistema y adicionar 30 mL de Hidróxido de Sodio al 40%, cuidando que exista un flujo normal de agua.
- Recoger aproximadamente 200 mL de destilado, retirar del sistema de los accesorios y apagar.

### **Titulación**

- Del destilado recogido en la matriz colocar tres gotas del indicador.

- Titular con Ácido Clorhídrico 0.1 N utilizando un agitador mecánico
- Registrar el volumen de ácido consumido mediante la siguiente fórmula.

$$\%PB = \frac{(VHCl - Vb) * 1.401 * NHCl * F}{g. muestra}$$

Donde:

1.401 = Peso atómico del nitrógeno

NHCl = Normalidad de Ácido Clorhídrico 0.1 N

F = Factor de conversión (6.25)

VHCl = Volumen del Ácido Clorhídrico consumido en la titulación

Vb = Volumen del Blanco (0.3)

### ***Recuento de UFC (Ensayo para aerobios y para hongos y levaduras)***

#### **Preparación de la muestra**

- Se preparó una solución de peptona al 5% y se añadió 9 ml de la solución en cada tubo de ensayo empleado en el estudio.
- Se realizaron diluciones de las muestras de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-9}$  con 1 ml de la misma.
- Se realizó vórtex a cada tubo de ensayo con solución de peptona y muestra de suero incluida.

#### **Procedimiento**

- En condiciones asépticas, se colocó 1 ml de la muestra en Petri film para aerobios, de igual forma en los Petri film específicos para hongos y levaduras.

- Posterior a ello se guardaron en la incubadora los Petri film durante 48 horas a una temperatura de 38 °C en el caso de aerobios y para los Petri film específicos para hongos y levaduras se incubó durante 72 horas a temperatura ambiente.
- Con un contador de colonias, se determinó la cantidad de UFC de cada muestra.
- El número de microorganismos se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{UFC}{ml}\right) = \frac{n * f}{v}$$

Donde:

n= número de colonias por placa

f= factor de dilución

v= volumen inoculado en la placa

## Capítulo IV

### Resultados

#### Análisis de varianza para la variable pH DÍA 0

**Tabla 16**

*Resultados de análisis de varianza de pH día 0 de suero lácteo a diferentes concentraciones, temperatura y procedencia.*

| Fuente de variación                   | Suma de cuadrados | gl | Cuadrados medios | F        | Valor-P |
|---------------------------------------|-------------------|----|------------------|----------|---------|
| Concentración                         | 0,022             | 2  | 0,011            | 1,340    | 0,282   |
| Temperatura                           | 0,086             | 1  | 0,086            | 10.501   | 0,004*  |
| Procedencia                           | 16,504            | 1  | 16,504           | 2025,631 | 0,000*  |
| Repetición                            | 0,007             | 2  | 0,004            | 0,430    | 0,656   |
| Concentración *Temperatura            | 0,021             | 2  | 0,010            | 1,263    | 0,302   |
| Concentración*Procedencia             | 0,039             | 2  | 0,020            | 2,408    | 0,113   |
| Temperatura*Procedencia               | 0,278             | 1  | 0,278            | 34,2     | 0,000*  |
| Concentración*Temperatura*Procedencia | 0,029             | 2  | 0,015            | 1,810    | 0,187   |
| Error                                 | 0,179             | 22 | 0,008            |          |         |
| Total                                 | 1170,617          | 36 |                  |          |         |
| Total corregido                       | 17,165            | 35 |                  |          |         |

De acuerdo a la tabla 16 (Resultados de análisis de varianza pH de suero lácteo en día 0) indica, diferencia significativa en: Factor B (temperatura), Factor C (procedencia) y en la interacción entre (B\*C) temperatura y procedencia, mientras que en: Factor A(concentración), e interacciones (A\*B) concentración-temperatura, (A\*C) concentración-procedencia, (A\*B\*C) concentración-procedencia-temperatura y en repetición, no se encontró diferencias significativas.



### Análisis de varianza para la variable pH DÍA 1

**Tabla 17**

*. Resultados de análisis de varianza de pH día 1 de suero lácteo a diferentes concentración, temperatura y procedencia.*

| Fuente de variación                   | Suma de cuadrados | Gl | Cuadrados medios | F      | Valor-P |
|---------------------------------------|-------------------|----|------------------|--------|---------|
| Concentración                         | 0,113             | 2  | 0,057            | 5,90   | 0,009*  |
| Temperatura                           | 11,868            | 1  | 11,868           | 1226,8 | 0,000*  |
| Procedencia                           | 6,477             | 1  | 6,477            | 669,5  | 0,000*  |
| Repetición                            | 0,006             | 2  | 0,003            | 0,3    | 0,712   |
| Concentración *Temperatura            | 0,106             | 2  | 0,053            | 5,50   | 0,012*  |
| Concentración*Procedencia             | 0,098             | 2  | 0,049            | 5,10   | 0,015*  |
| Temperatura*Procedencia               | 1,562             | 1  | 1,562            | 161,5  | 0,000*  |
| Concentración*Temperatura*Procedencia | 0,106             | 2  | 0,053            | 5,50   | 0,011*  |
| Error                                 | 0,213             | 22 | 0,009            |        |         |
| Total                                 | 1003,373          | 36 |                  |        |         |
| Total corregido                       | 20,551            | 35 |                  |        |         |

De acuerdo a la tabla 17 (Resultados de análisis de varianza de pH para día 1) se encontró diferencia significativa en: Factor A (Concentración), Factor B (Temperatura), Factor C (Procedencia), e interacciones A\*B (Concentración\*Temperatura), A\*C (Concentración\*Procedencia), B\*C (Temperatura\*Procedencia) y A\*B\*C (Concentración\*Temperatura\*Procedencia), mientras que en repetición no se encontró diferencia significativa.

## Análisis de varianza para la variable pH DÍA 2

**Tabla 18**

*Resultados de análisis de varianza de pH día 2 de suero lácteo a diferentes concentraciones, temperatura y procedencia.*

| Fuente de variación                   | Suma de cuadrados | Gl | Cuadrados medios | F        | Valor-P |
|---------------------------------------|-------------------|----|------------------|----------|---------|
| Concentración                         | 0,005             | 2  | 0,003            | 0,475    | 0,628   |
| Temperatura                           | 23,168            | 1  | 23,168           | 4094,160 | 0,000*  |
| Procedencia                           | 4,810             | 1  | 4,811            | 850,123  | 0,000*  |
| Repetición                            | 0,022             | 2  | 0,001            | 0,198    | 0,822   |
| Concentración *Temperatura            | 0,039             | 2  | 0,020            | 3,452    | 0,049*  |
| Concentración*Procedencia             | 0,053             | 2  | 0,027            | 4,704    | 0,020*  |
| Temperatura*Procedencia               | 3,324             | 1  | 3,325            | 587,496  | 0,000*  |
| Concentración*Temperatura*Procedencia | 0,004             | 2  | 0,002            | 0,389    | 0,682   |
| Error                                 | 0,124             | 22 | 0,006            |          |         |
| Total                                 | 926,539           | 36 |                  |          |         |
| Total corregido                       | 31,532            | 35 |                  |          |         |

De acuerdo a la tabla 18 (Resultados de análisis de varianza de pH día 2) se encontró diferencia significativa en: Factor B (Temperatura), Factor C (Procedencia) e interacciones A\*B (Concentración\*Temperatura), A\*C (Concentración\*Procedencia) y B\*C (Temperatura\*Procedencia), mientras que en Factor A (Concentración), interacción A\*B\*C (Concentración\*Temperatura\*Procedencia) y repetición no se encontró diferencia significativa.

### Análisis de varianza para la variable pH DÍA 3

**Tabla 19**

*Resultados de análisis de varianza de pH día 3 de suero lácteo a diferentes concentraciones, temperatura y procedencia.*

| Fuente de variación                   | Suma de cuadrados | Gl | Cuadrados medios | F        | Valor-P |
|---------------------------------------|-------------------|----|------------------|----------|---------|
| Concentración                         | 0,016             | 2  | 0,008            | 2,293    | 0,125   |
| Temperatura                           | 18,662            | 1  | 18,662           | 5403,460 | 0,000*  |
| Procedencia                           | 2,576             | 1  | 2,576            | 745,855  | 0,000*  |
| Repetición                            | 0,006             | 2  | 0,003            | 0,871    | 0,432   |
| Concentración *Temperatura            | 0,048             | 2  | 0,024            | 6,954    | 0,005*  |
| Concentración*Procedencia             | 0,028             | 2  | 0,014            | 4,077    | 0,031*  |
| Temperatura*Procedencia               | 1,891             | 1  | 1,891            | 547,406  | 0,000*  |
| Concentración*Temperatura*Procedencia | 0,014             | 2  | 0,007            | 2,043    | 0,154   |
| Error                                 | 0,076             | 22 | 0,003            |          |         |
| Total                                 | 867,801           | 36 |                  |          |         |
| Total corregido                       | 23,317            | 35 |                  |          |         |

De acuerdo a la tabla 19 (Resultados de análisis de varianza de pH día 3) se encontró diferencia significativa en: Factor B (Temperatura), Factor C (Procedencia), e interacciones A\*B (Concentración\*Temperatura), A\*C (Concentración\*Procedencia) y B\*C (Temperatura\*Procedencia), mientras que en: Factor A (Concentración) e interacción A\*B\*C (Concentración\*Temperatura\*Procedencia) y repetición no se encontró diferencia significativa.

### Análisis de varianza para la variable pH DÍA 4

**Tabla 20**

*Resultados de análisis de varianza de pH día 4 de suero lácteo a diferentes concentraciones, temperatura y procedencia.*

| Fuente de variación                   | Suma de cuadrados | Gl | Cuadrados medios | F        | Valor-P |
|---------------------------------------|-------------------|----|------------------|----------|---------|
| Concentración                         | 0,043             | 2  | 0,021            | 4,808    | 0,019*  |
| Temperatura                           | 25,629            | 1  | 25,629           | 5733,196 | 0,000*  |
| Procedencia                           | 5,096             | 1  | 5,096            | 1140,046 | 0,000*  |
| Repetición                            | 0,006             | 2  | 0,003            | 0,638    | 0,538   |
| Concentración *Temperatura            | 0,074             | 2  | 0,037            | 8,317    | 0,002*  |
| Concentración*Procedencia             | 0,068             | 2  | 0,034            | 7,562    | 0,003*  |
| Temperatura*Procedencia               | 3,773             | 1  | 3,773            | 844,090  | 0,000*  |
| Concentración*Temperatura*Procedencia | 0,022             | 2  | 0,011            | 2,420    | 0,112   |
| Error                                 | 0,098             | 22 | 0,004            |          |         |
| Total                                 | 880,892           | 36 |                  |          |         |
| Total corregido                       | 34,809            | 35 |                  |          |         |

De acuerdo a la tabla 20 (Resultados de análisis de varianza de pH día 4) se encontró diferencia significativa en: Factor A (Concentración), Factor B (Temperatura), Factor C (Procedencia) e interacciones A\*C (Concentración\*Temperatura), A\*C (Concentración\*Procedencia) y B\*C (Temperatura\*Procedencia), mientras que en: interacción A\*B\*C (Concentración\*Temperatura\*Procedencia) y repetición no se encontró diferencia significativa.

### Análisis de varianza para la variable pH Día 7

**Tabla 21**

*Resultados de análisis de varianza de pH día 7 de suero lácteo a diferentes concentraciones, temperatura y procedencia.*

| Fuente de variación                   | Suma de cuadrados | Gl | Cuadrados medios | F         | Valor-P |
|---------------------------------------|-------------------|----|------------------|-----------|---------|
| Concentración                         | 0,012             | 2  | 0,006            | 4,119     | 0,030*  |
| Temperatura                           | 20,961            | 1  | 20,961           | 14751,395 | 0,000*  |
| Procedencia                           | 6,093             | 1  | 6,093            | 4287,715  | 0,000*  |
| Repetición                            | 0,002             | 2  | 0,001            | 0,565     | 0,576   |
| Concentración *Temperatura            | 0,066             | 2  | 0,033            | 23,355    | 0,000*  |
| Concentración*Procedencia             | 0,000             | 2  | 0,000            | 0,119     | 0,888   |
| Temperatura*Procedencia               | 0,944             | 1  | 0,944            | 644,436   | 0,000*  |
| Concentración*Temperatura*Procedencia | 0,016             | 2  | 0,008            | 5,515     | 0,011*  |
| Error                                 | 0,031             | 22 | 0,001            |           |         |
| Total                                 | 837,053           | 36 |                  |           |         |
| Total corregido                       | 28,125            | 35 |                  |           |         |

De acuerdo a la tabla 21 (Resultados de análisis de varianza de pH día 7 se encontró diferencia significativa en: Factor A (Concentración), Factor B (Temperatura), Factor C (Procedencia), y en las interacciones entre A\*B (Concentración\*Temperatura), B\*C (Temperatura\*Procedencia) y A\*B\*C (Concentración\*Temperatura\*Procedencia), mientras que en la interacción A\*C (Concentración\*Procedencia) y repetición no se encontró diferencia significativa.

### Análisis de varianza para la variable acidez titulable día 0

**Tabla 22**

*Resultados de análisis de varianza de acidez día 0 de suero lácteo a diferentes concentraciones, temperaturas y procedencias.*

| Fuente de variación                   | Suma de cuadrados | gl | Cuadrados medios | F       | Sig       |
|---------------------------------------|-------------------|----|------------------|---------|-----------|
| Concentración                         | 0,000697          | 2  | 0,000348         | 5,16    | 0,015*    |
| Temperatura                           | 0,003721          | 1  | 0,003721         | 55,07   | 0,000*    |
| Procedencia                           | 0,379867          | 1  | 0,379867         | 5622,19 | 0,000*    |
| Repetición                            | 0,000014          | 2  | 0,000007         | 0,10    | 0,905     |
| Concentración *Temperatura            | 0,001118          | 2  | 0,000559         | 8,27    | 0,002*    |
| Concentración*Procedencia             | 0,000337          | 2  | 0,000168         | 2,49    | 0,106     |
| Temperatura*Procedencia               | 0,001118          | 1  | 0,001849         | 27,37   | 0,000030* |
| Concentración*Temperatura*Procedencia | 0,001154          | 2  | 0,000577         | 8,54    | 0,0018*   |
| Error                                 | 0,001486          | 22 | 0,000068         |         |           |
| Total                                 | 0,39              | 35 |                  |         |           |

De acuerdo a la tabla 22 (Resultados de análisis de varianza de acidez día 0) se encontró diferencia significativa en: Factor A (Concentración), Factor B (Temperatura), Factor C (Procedencia), y en las interacciones entre A\*B (Concentración\*Temperatura), B\*C (Temperatura\*Procedencia) y A\*B\*C (Concentración\*Temperatura\*Procedencia), mientras que en la interacción A\*C (Concentración\*Procedencia) y repetición no se encontró diferencia significativa.

### Análisis de varianza para la variable acidez titulable día 1

**Tabla 23**

*Resultados de análisis de varianza para la variable acidez titulable día 1.*

| Fuente de variación                   | Suma de cuadrados | gl | Cuadrados medios | F       | Sig    |
|---------------------------------------|-------------------|----|------------------|---------|--------|
| Concentración                         | 0,007353          | 2  | 0,003676         | 5,139   | 0,015* |
| Temperatura                           | 0,417101          | 1  | 0,417101         | 582,995 | 0,000* |
| Procedencia                           | 0,438023          | 1  | 0,438023         | 612,240 | 0,000* |
| Repetición                            | 0,000171          | 2  | 0,000085         | 0,119   | 0,888  |
| Concentración *Temperatura            | 0,010311          | 2  | 0,005155         | 7,206   | 0,004* |
| Concentración*Procedencia             | 0,006003          | 2  | 0,003002         | 4,196   | 0,029* |
| Temperatura*Procedencia               | 0,020688          | 1  | 0,020688         | 28,916  | 0,000* |
| Concentración*Temperatura*Procedencia | 0,005817          | 2  | 0,002909         | 4,066   | 0,031* |
| Error                                 | 0,015740          | 22 | 0,000715         |         |        |
| Total                                 | 0,92              | 35 |                  |         |        |

De acuerdo a la tabla 23 (Resultados de análisis de varianza de acidez día 1) se encontró diferencia significativa en: Factor A (Concentración), Factor B (Temperatura), Factor C (Procedencia) y en las interacciones A\*B (Concentración\*Temperatura), A\*C (Concentración\*Procedencia), B\*C (Temperatura\*Procedencia) y A\*B\*C (Concentración\*Temperatura\*Procedencia). En la repetición no se evidenció diferencia significativa.

## Análisis de varianza para la variable acidez titulable día 2

**Tabla 24**

*Resultados de análisis de varianza para la variable acidez titulable día 2.*

| Fuente de variación                   | Suma de cuadrados | gl | Cuadrados medios | F       | Sig    |
|---------------------------------------|-------------------|----|------------------|---------|--------|
| Concentración                         | 0,010015          | 2  | 0,005008         | 6,248   | 0,007* |
| Temperatura                           | 0,912662          | 1  | 0,912662         | 1138, 8 | 0,000* |
| Procedencia                           | 0,275975          | 1  | 0,275975         | 344,357 | 0,000* |
| Repetición                            | 0,002543          | 2  | 0,001271         | 1,586   | 0,227  |
| Concentración *Temperatura            | 0,007609          | 2  | 0,00304          | 4,747   | 0,019* |
| Concentración*Procedencia             | 0,011737          | 2  | 0,005869         | 7,323   | 0,004* |
| Temperatura*Procedencia               | 0,01496           | 1  | 0,018496         | 23,079  | 0,000* |
| Concentración*Temperatura*Procedencia | 0,004265          | 2  | 0,002133         | 2,661   | 0,092* |
| Error                                 | 0,017631          | 22 | 0,000801         |         |        |
| Total                                 | 1,260933          | 35 |                  |         |        |

De acuerdo a la tabla 24 (Resultados de análisis de varianza de acidez día 2) se encontró diferencia significativa en: Factor A (Concentración), Factor B (Temperatura), Factor C (Procedencia) y en las interacciones A\*B (Concentración\*Temperatura), A\*C (Concentración\*Procedencia), B\*C (Temperatura\*Procedencia) y en interacción A\*B\*C (Concentración\*Temperatura\*Procedencia). En las repeticiones no se evidenció diferencia significativa.



### Análisis de varianza para la variable acidez titulable día 3

**Tabla 25**

*Resultados de análisis de varianza para la variable acidez titulable día 3.*

| Fuente de variación                   | Suma de cuadrados | gl | Cuadrados medios | F        | Sig    |
|---------------------------------------|-------------------|----|------------------|----------|--------|
| Concentración                         | 0,000637          | 2  | 0,000318         | 0,387    | 0,684  |
| Temperatura                           | 1,156700          | 1  | 1,156700         | 1406,249 | 0,000* |
| Procedencia                           | 0,196397          | 1  | 0,196397         | 238,768  | 0,000* |
| Repetición                            | 0,003481          | 2  | 0,001740         | 2,116    | 0,144  |
| Concentración *Temperatura            | 0,000386          | 2  | 0,000193         | 0,235    | 0,793  |
| Concentración*Procedencia             | 0,016892          | 2  | 0,008446         | 10,268   | 0,001* |
| Temperatura*Procedencia               | 0,021365          | 1  | 0,021365         | 25,974   | 0,000* |
| Concentración*Temperatura*Procedencia | 0,009947          | 2  | 0,004973         | 6,046    | 0,008* |
| Error                                 | 0,018096          | 22 | 0,000823         |          |        |
| Total                                 | 1,423900          | 35 |                  |          |        |

De acuerdo a la tabla 25 (Resultados de análisis de varianza de la variable acidez titulable día 3 se encontró diferencia significativa en: Temperatura (Factor B), Procedencia (Factor C) y en las interacciones: A\*C (Concentración\*Procedencia), B\*C (Temperatura\*Procedencia) y A\*B\*C (Concentración\*Temperatura\*Procedencia. En la concentración (Factor A), repeticiones e interacción A\*B (Concentración\*Temperatura) no existió diferencia significativa.

### Análisis de varianza para la variable acidez titulable día 4

**Tabla 26**

*Resultados de análisis de varianza para la variable acidez titulable día 4*

| Fuente de variación                   | Suma de cuadrados | gl | Cuadrados medios | F       | Sig    |
|---------------------------------------|-------------------|----|------------------|---------|--------|
| Concentración                         | 0,001444          | 2  | 0,000722         | 0,93    | 0,409  |
| Temperatura                           | 1,676593          | 1  | 1,676593         | 2163,65 | 0,000* |
| Procedencia                           | 0,320545          | 1  | 0,320545         | 413,66  | 0,000* |
| Repetición                            | 0,000140          | 2  | 0,000070         | 0,09    | 0,914  |
| Concentración *Temperatura            | 0,002915          | 2  | 0,001458         | 1,88    | 0,176  |
| Concentración*Procedencia             | 0,007924          | 2  | 0,003962         | 5,11    | 0,015* |
| Temperatura*Procedencia               | 0,027390          | 1  | 0,027390         | 35,35   | 0,000* |
| Concentración*Temperatura*Procedencia | 0,000678          | 2  | 0,000339         | 0,44    | 0,651  |
| Error                                 | 0,017048          | 22 | 0,000775         |         |        |
| Total                                 | 2,054678          | 35 |                  |         |        |

De acuerdo a la tabla 26 (Resultados de análisis de varianza para la variable acidez titulable día 4) se encontró diferencia significativa en: Factor B (Temperatura), Factor C (Procedencia) y en las interacciones: Concentración\*Procedencia (A\*C), Temperatura\*Procedencia (B\*C). En el factor A (Concentración), repeticiones e interacciones Concentración\*Temperatura (A\*B), Concentración\*Temperatura\*Procedencia (A\*B\*C) no existió diferencia significativa.

### Análisis de varianza para la variable acidez titulable día 7

**Tabla 27**

*Resultados de análisis de varianza para la variable acidez titulable día 7*

| Fuente de variación                   | Suma de cuadrados | gl | Cuadrados medios | F        | Sig    |
|---------------------------------------|-------------------|----|------------------|----------|--------|
| Concentración                         | 0,013485          | 2  | 0,006742         | 2,693    | 0,899  |
| Temperatura                           | 2,526510          | 1  | 2,526510         | 1009,290 | 0,000* |
| Procedencia                           | 0,796556          | 1  | 0,796556         | 318,208  | 0,000* |
| Repetición                            | 0,001998          | 2  | 0,000999         | 0,399    | 0,676  |
| Concentración *Temperatura            | 0,010592          | 2  | 0,005296         | 2,116    | 0,144  |
| Concentración*Procedencia             | 0,002177          | 2  | 0,001089         | 0,435    | 0,653  |
| Temperatura*Procedencia               | 0,064093          | 1  | 0,064093         | 25,604   | 0,000* |
| Concentración*Temperatura*Procedencia | 0,006228          | 2  | 0,003114         | 1,244    | 0,308  |
| Error                                 | 0,055072          | 22 | 0,002503         |          |        |
| Total                                 | 3,476712          | 35 |                  |          |        |

De acuerdo a la tabla 27 (Resultados de análisis de varianza de la variable acidez titulable día 7) se encontró diferencia significativa en: Factor B (Temperatura), Factor C (Procedencia) y en la interacción B\*C (Temperatura\*Procedencia). Por otro lado, en el factor A (Concentración), repeticiones e interacciones Concentración\*Temperatura (A\*B), Concentración\*Procedencia (A\*C) y Concentración\*Temperatura\*Procedencia (A\*B\*C) no existió diferencia significativa.

**Análisis de varianza de bacterias día 0 de suero lácteo a diferentes concentraciones, temperatura y procedencia.**

**Tabla 28**

Resultados de *análisis de varianza de bacterias día 0 de suero lácteo a diferentes concentraciones, temperatura y procedencia.*

| Fuente de variación                   | Suma de cuadrados | Gl | Cuadrados medios | F       | Valor-P   |
|---------------------------------------|-------------------|----|------------------|---------|-----------|
| Concentración                         | 1,659E+17         | 2  | 8,293E+16        | 4,184   | 0,029*    |
| Temperatura                           | 3,306E+17         | 1  | 3,306E+17        | 16,681  | 0,0004*   |
| Procedencia                           | 1,340E+19         | 1  | 1,340E+19        | 675,847 | 5,21E-18* |
| Repetición                            | 7,935E+16         | 2  | 3,967E+16        | 2,002   | 0,159     |
| Concentración *Temperatura            | 2,049E+18         | 2  | 1,024E+18        | 51,680  | 4,86E-09* |
| Concentración*Procedencia             | 7,360E+17         | 2  | 3,680E+17        | 18,567  | 0,0000*   |
| Temperatura*Procedencia               | 7,569E+17         | 1  | 7,569E+17        | 38,188  | 0,0000*   |
| Concentración*Temperatura*Procedencia | 2,515E+18         | 2  | 1,257E+18        | 63,435  | 7,34E-10* |
| Error                                 | 4,361E+17         | 22 | 1,982E+16        |         |           |
| Total corregido                       | 2,046E+19         | 35 |                  |         |           |

De acuerdo a la tabla 28 (Resultados de análisis de varianza de UFC de bacterias del suero lácteo en día 0) indica diferencia significativa en: Factor A (concentraciones de nisina), Factor B (temperatura), Factor C (procedencia) y en las interacciones entre (A\*B) concentración-temperatura, (A\*C) concentración-procedencia, (B\*C) temperatura- procedencia y (A\*B\*C) concentración-

procedencia-temperatura, mientras que, en repeticiones, no se encontró diferencia significativa.

**Análisis de varianza de bacterias día 7 de suero lácteo a diferentes concentraciones, temperatura y procedencia.**

**Tabla 29**

*Resultados de análisis de varianza de bacterias día 7 de suero lácteo a diferentes concentraciones, temperatura y procedencia.*

| Fuente de variación                   | Suma de cuadrados | Gl | Cuadrados medios | F        | Valor-P |
|---------------------------------------|-------------------|----|------------------|----------|---------|
| Concentración                         | 2,81E+15          | 2  | 1,41E+15         | 1767,93  | 0,000*  |
| Temperatura                           | 5,54E+15          | 1  | 5,54E+15         | 69,72,74 | 0,000*  |
| Procedencia                           | 4,00E+15          | 1  | 4,01E+15         | 5040,59  | 0,000*  |
| Repetición                            | 6,02E+11          | 2  | 3,01E+11         | 0,38     | 0,6893  |
| Concentración *Temperatura            | 1,65E+15          | 2  | 8,28E+14         | 1042,44  | 0,000*  |
| Concentración*Procedencia             | 1,64E+15          | 2  | 8,20E+14         | 1032,74  | 0,000*  |
| Temperatura*Procedencia               | 2,42E+15          | 1  | 2,42E+15         | 3045,12  | 0,000*  |
| Concentración*Temperatura*Procedencia | 1,87E+15          | 2  | 9,35E+14         | 1176,43  | 0,000*  |
| Error                                 | 1,75E+13          | 22 | 7,94E+11         |          |         |
| Total corregido                       | 1,99E+16          | 35 |                  |          |         |

De acuerdo a la tabla 29 (Resultados de análisis de varianza de UFC de bacterias de suero lácteo en día 7) indica diferencia significativa en: Factor A (concentraciones de nisina), Factor B (temperatura), Factor C (procedencia) y en las interacciones entre (A\*B) concentración-temperatura, (A\*C) concentración-procedencia, (B\*C) temperatura- procedencia y (A\*B\*C) concentración-

procedencia-temperatura, mientras que, en repeticiones, no se encontró diferencia significativa.

**Análisis de varianza de levaduras y hongos día 0, de suero lácteo a diferentes concentraciones, temperatura y procedencia**

**Tabla 30**

*Resultados de análisis de varianza de levaduras y hongos día 0, de suero lácteo a diferentes concentraciones, temperatura y procedencia*

| Fuente de variación                   | Suma de cuadrados | Gl | Cuadrados medios | F       | Valor-P |
|---------------------------------------|-------------------|----|------------------|---------|---------|
| Concentración                         | 1,10E+22          | 2  | 5,51E+21         | 2,6669  | 0,092   |
| Temperatura                           | 1,45E+23          | 1  | 1,44E+23         | 70,0144 | 0,000*  |
| Procedencia                           | 9,11E+21          | 1  | 9,11E+21         | 4,4107  | 0,047*  |
| Repetición                            | 1,39E+22          | 2  | 6,97E+21         | 3,3737  | 0,052   |
| Concentración *Temperatura            | 4,41E+21          | 2  | 2,21E+21         | 1,0685  | 0,3606  |
| Concentración*Procedencia             | 2,19E+22          | 2  | 1,09E+22         | 5,3090  | 0,0131* |
| Temperatura*Procedencia               | 3,49E+22          | 1  | 3,49E+22         | 16,900  | 0,0004* |
| Concentración*Temperatura*Procedencia | 2,35E+22          | 2  | 1,17E+22         | 5,7077  | 0,0100* |
| Error                                 | 4,55E+22          | 22 | 2,07E+21         |         |         |
| Total corregido                       | 3,09E+23          | 35 |                  |         |         |

De acuerdo a la tabla 30 (Resultados de análisis de varianza de UFC de levaduras y hongos del suero lácteo en día 0) indica diferencia significativa en:

Factor B (temperatura), Factor C (procedencia) y en las interacciones entre, (A\*C) concentración-procedencia, (B\*C) temperatura- procedencia y (A\*B\*C) concentración-procedencia-temperatura, mientras que, en el Factor A (concentraciones de nisina), en interacciones entre (A\*B) concentración-temperatura y en repeticiones, no se encontró diferencia significativa.

**Análisis de varianza de levaduras y hongos día 7, de suero lácteo a diferentes concentraciones, temperatura y procedencia**

**Tabla 31**

*Resultados de análisis de varianza de levaduras y hongos día 7, de suero lácteo a diferentes concentraciones, temperatura y procedencia.*

| Fuente de variación                 | Suma de cuadrados | Gl | Cuadrado medio | F       | Valor-P |
|-------------------------------------|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| Concentración                       | 5,43E+18          | 2  | 2,72E+18       | 253259  | 0,0001* |
| Temperatura                         | 1,19E+19          | 1  | 1,19E+19       | 1112702 | 0,0001* |
| Procedencia                         | 1,14E+18          | 1  | 1,14E+18       | 106724  | 0,0001* |
| Repetición                          | 6,60E+13          | 2  | 3,30E+13       | 3,0     | 0,0664  |
| Concentración *Temperatura          | 8,71E+18          | 2  | 4,35E+18       | 405740  | 0,0001* |
| Concentración*Procedencia           | 1,52E+18          | 2  | 7,60E+17       | 70825   | 0,0001* |
| Temperatura*Procedencia             | 1,02E+18          | 1  | 1,02E+18       | 94903   | 0,0001* |
| Concentración*Temperatura*Proceden. | 1,51E+18          | 2  | 7,57E+17       | 70551   | 0,0001* |
| Error                               | 2,36E+14          | 22 | 1,07E+13       |         |         |
| Total corregido                     | 3,13E+19          | 35 |                |         |         |

De acuerdo a la tabla 31 (Resultados de análisis de varianza de UFC de levaduras y hongos del suero lácteo en día 7) indica diferencia significativa en: Factor A (concentraciones de nisina), Factor B (temperatura), Factor C (procedencia) y en las interacciones entre (A\*B) concentración-temperatura, (A\*C) concentración-procedencia, (B\*C) temperatura- procedencia y (A\*B\*C) concentración-procedencia-temperatura, mientras que, en repeticiones, no se encontró diferencia significativa.

**Resultados de las pruebas fisicoquímicas (ceniza, grasa y proteína) de los sueros de las dos procedencias estudiadas.**

**Tabla 32**

*Resultados de las pruebas fisicoquímicas (ceniza, grasa y proteína) de los sueros de las dos procedencias estudiadas.*

| Parámetro                | Procedencia |           | Norma              |     |
|--------------------------|-------------|-----------|--------------------|-----|
|                          | Tradicional | Artesanal | NTE INEN 2594:2011 |     |
|                          |             |           | Min                | Max |
| Cenizas % (m/m)          | 0,060       | 0,295     | ---                | 0,7 |
| Proteína láctea, % (m/m) | 1,22        | 0,91      | 0,8                | --- |
| Grasa láctea, % (m/m)    | 0,042       | 0,294     | ---                | 0,3 |

En la tabla 32 se indica los resultados de las pruebas fisicoquímicas de los sueros de las dos procedencias estudiadas. En cuanto a la ceniza la procedencia tradicional indicó un valor promedio menor que la procedencia



artesanal 0,060% y 0,295% respectivamente. En cuanto a la grasa la procedencia tradicional presentó un valor menor (0,042%) en comparación con la procedencia artesanal (0,294%). Con respecto a la proteína la procedencia tradicional presentó un valor de 1,22% en tanto que la procedencia artesanal presentó un valor de 0,91%.

**Prueba de significancia de Tukey de pH del estudio de tres concentraciones de nisina, aplicados al suero de leche.**

**Tabla 33**

*Resultados de variable pH de Factor A (concentración) (Tukey  $P>0,05$ ).*

|    | Factor A | pH       |           |          |          |           |           |
|----|----------|----------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|
|    |          | Día 0    | Día 1     | Día 2    | Día 3    | Día 4     | Día 7     |
| a0 | 50 ppm   | 5,65 (a) | 5,29 (b)  | 4,97 (a) | 4,82 (a) | 4,80 (a)  | 4,75 (ab) |
| a1 | 100 ppm  | 5,63 (a) | 5,16 (a)  | 4,99 (a) | 4,84 (a) | 4,88 (b)  | 4,76 (b)  |
| a2 | 200 ppm  | 5,69 (a) | 5,23 (ab) | 4,99 (a) | 4,87 (a) | 4,85 (ab) | 4,71 (a)  |

La tabla 33 muestra los resultados de la variable pH desde el día 0 hasta el día 7 del factor A (concentraciones de nisina) aplicados al suero lácteo que tuvieron diferencia significativa.

Respecto al día 1 el pH fue mayor con la concentración de 50 ppm con 5,29 (grupo b), seguido de la concentración 200 ppm con 5,23 (grupo ab), frente a la concentración de 100 ppm con 5,16 (grupo a) con el valor más bajo.

En el día 4 se obtuvo que el pH más alto correspondió a la concentración de 100 ppm con 4,88(grupo b), seguido de la concentración 200 ppm con 4,85 (grupo ab) y el valor más bajo fue de la concentración de 50 ppm con 4,80 (grupo a),

En el día 7 el pH fue mayor con la concentración de 100 ppm con 4,76 (grupo b), seguido de la concentración de 50 ppm con 4,75 ppm (grupo ab), frente a la concentración de 200 ppm con 4,71 (grupo a) con el valor más bajo.

Con respecto a los días 0, 2 y 3 no se obtuvo diferencia significativa en las diferentes concentraciones de nisina aplicadas al suero lácteo.

**Tabla 34**

*Resultados de variable acidez titulable de Factor A (concentración) (Tukey  $P>0,05$ ).*

|    |          | Acidez    |          |          |         |         |         |
|----|----------|-----------|----------|----------|---------|---------|---------|
|    | Factor A | Día 0     | Día 1    | Día 2    | Día 3   | Día 4   | Día 7   |
| a0 | 50 ppm   | 0,23 (a)  | 0,32(a)  | 0,38(a)  | 0,41(a) | 0,47(a) | 0,49(a) |
| a1 | 100 ppm  | 0,23 (ab) | 0,34(ab) | 0,41(ab) | 0,41(a) | 0,47(a) | 0,52(a) |
| a2 | 200 ppm  | 0,24 (b)  | 0,36(b)  | 0,42(b)  | 0,42(a) | 0,48(a) | 0,53(a) |

En la tabla 34 muestra los resultados de la variable acidez desde el día 0 hasta el día 7 del factor A (concentración) aplicados al suero lácteo que obtuvieron diferencia significativa.

En el día 0 la acidez fue mayor con una concentración de 200 ppm con 0,24% de acidez (grupo b), seguido de la concentración 100 ppm y 50 ppm con 0,23% (grupo ab y a respectivamente).

En el día 1 la acidez fue mayor con una concentración de 200 ppm con 0,36% de acidez (grupo b), seguido de la concentración 100 ppm 0,34% (grupo ab) y 50 ppm con 0,32% (grupo a).

En el día 2, la acidez fue mayor con una concentración de 200 ppm con 0,42% de acidez (grupo b), seguido de la concentración 100 y 50 ppm (0,41 y 0,38% respectivamente) perteneciendo a los grupos ab y a.

Con respecto a los días 3, 4 y 7 no se obtuvo diferencia significativa en las diferentes concentraciones de nisina aplicadas al suero lácteo.

**Tabla 35**

*Resultados de UFC Factor A (concentración) (Tukey  $P > 0,05\%$ ).*

|    | Factor A | UFC/mL Bacterias |             | UFC/mL Levaduras | Y hongos     |
|----|----------|------------------|-------------|------------------|--------------|
|    |          | Día 0            | Día 7       | Día 0            | Día 7        |
| a0 | 50 ppm   | 9,90E+08 (b)     | 4,13E+07(c) | 1,2E+11(a)       | 4,17E+08 (a) |
| a1 | 100 ppm  | 8,24E+08 (a)     | 2,04E+07(a) | 8,4E+10(a)       | 1,34E+09 (c) |
| a2 | 200 ppm  | 9,08E+08 (ab)    | 3,59E+07(b) | 8,5E+10(a)       | 6,91E+08 (b) |

La tabla 35, se muestran los resultados de las UFC/mL (bacterias, levaduras y hongos) del día 0 y día 7 del factor A (concentraciones de nisina) aplicados al suero lácteo que tuvieron diferencia significativa.

Respecto al día 0 en la UFC/mL de bacterias, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de 9,90E+08 (grupo b) con una concentración de nisina de 50 ppm, seguido por aquellas a las que se trató con una concentración de nisina de 200 ppm con 9,08E+08 (grupo ab), frente a las que se aplicó concentración de nisina de 100 ppm con 8,24E+08 (grupo a) el cual indicó el valor más bajo de microorganismos por mL.

En la UFC/mL de levaduras y hongos, no se encontró diferencia significativa entre las concentraciones de nisina aplicadas al suero

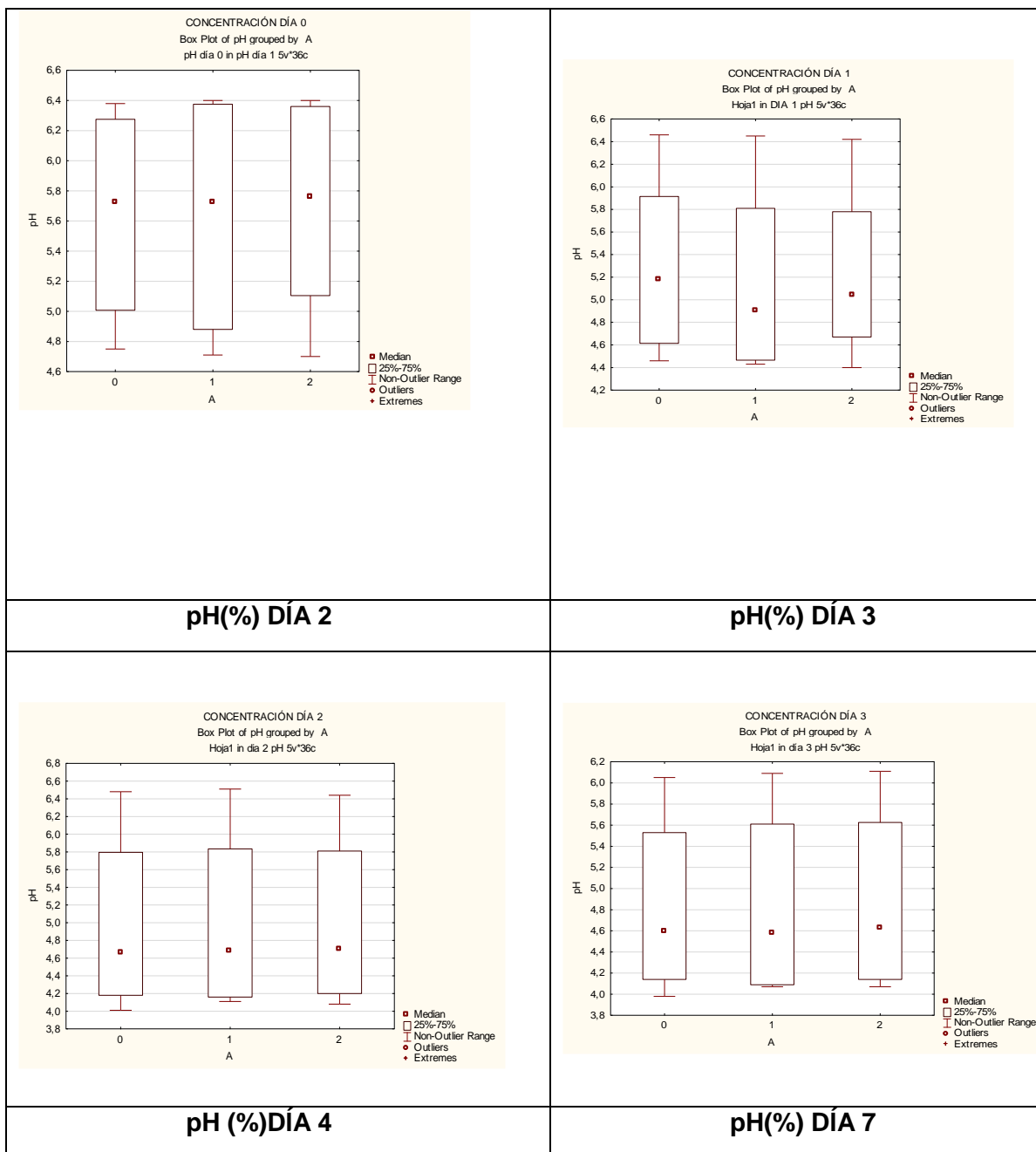
En el día 7 en la UFC/mL de bacterias, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de  $4,13E+07$  (grupo c) con una concentración de nisina de 50 ppm, seguido por aquellas a las que se trató con una concentración de nisina de 200 ppm con  $3,59E+07$  (grupo b), frente a las que se aplicó concentración de nisina de 100 ppm con  $2,04E+07$  (grupo a) el cual indicó el valor más bajo de microorganismos por mL.

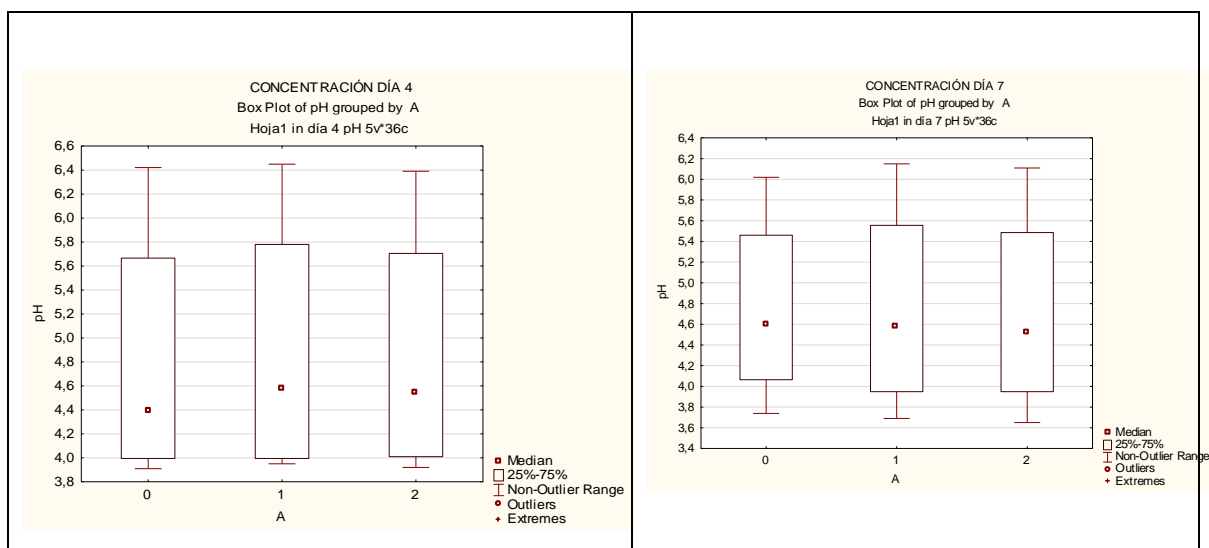
En la UFC/mL de levaduras y hongos, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de  $1,34E+09$  (grupo c) con la aplicación de nisina a una concentración de 100 ppm, seguido de las tratadas a una concentración de nisina de 200 ppm con una cantidad de población microbiana/mL de  $6,91E+08$  (grupo b) por otro lado, hubo una menor cantidad de población microbiana/mL de  $4,17E+08$  (grupo a) en las que fueron tratadas con una concentración de nisina de 50 ppm.

### Figura 3

*Resumen de resultados de pH Factor A (concentración), para prueba de significancia de Tukey.*

| pH (%) DÍA 0 | pH(%) DÍA 1 |
|--------------|-------------|
|--------------|-------------|

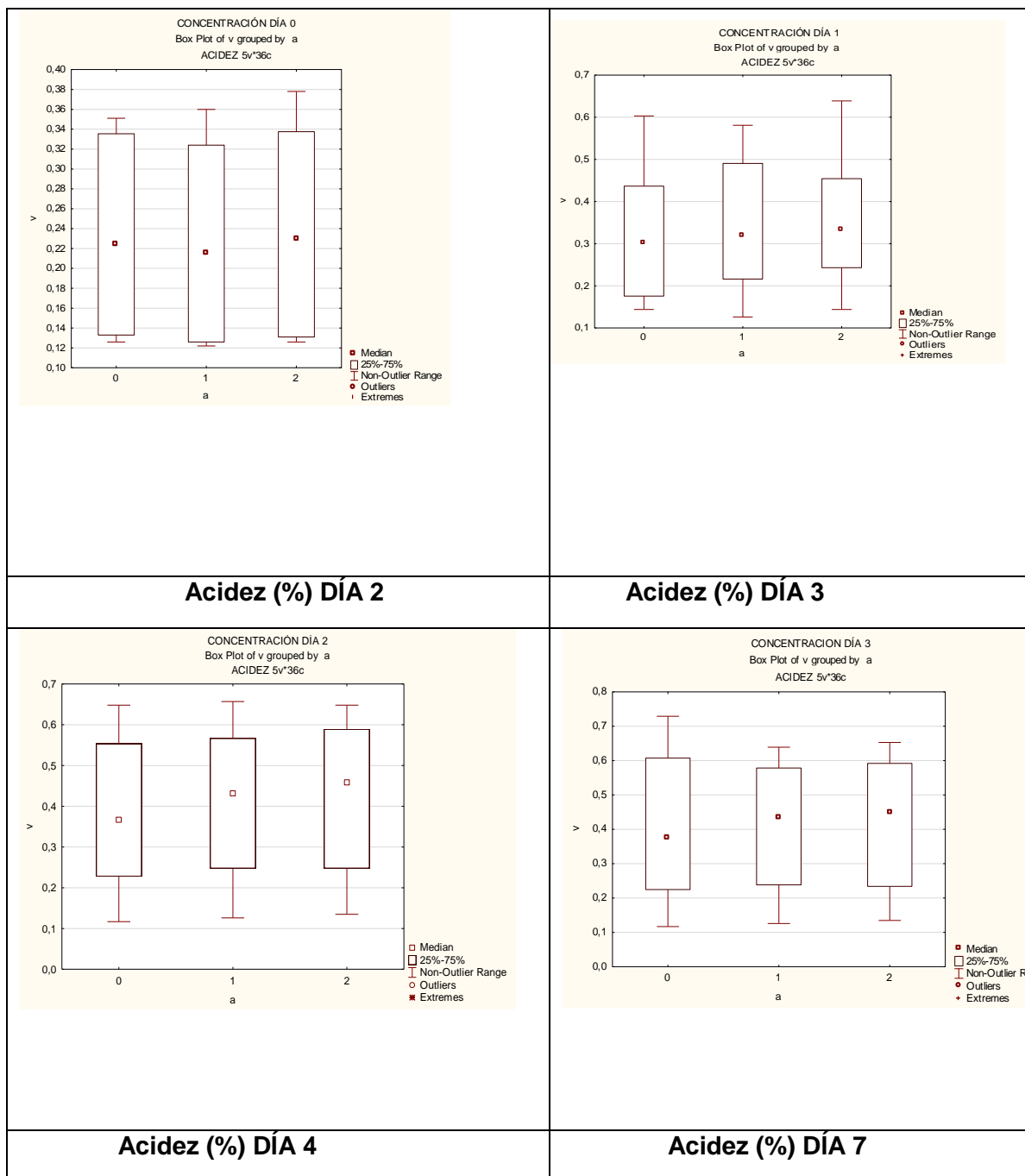


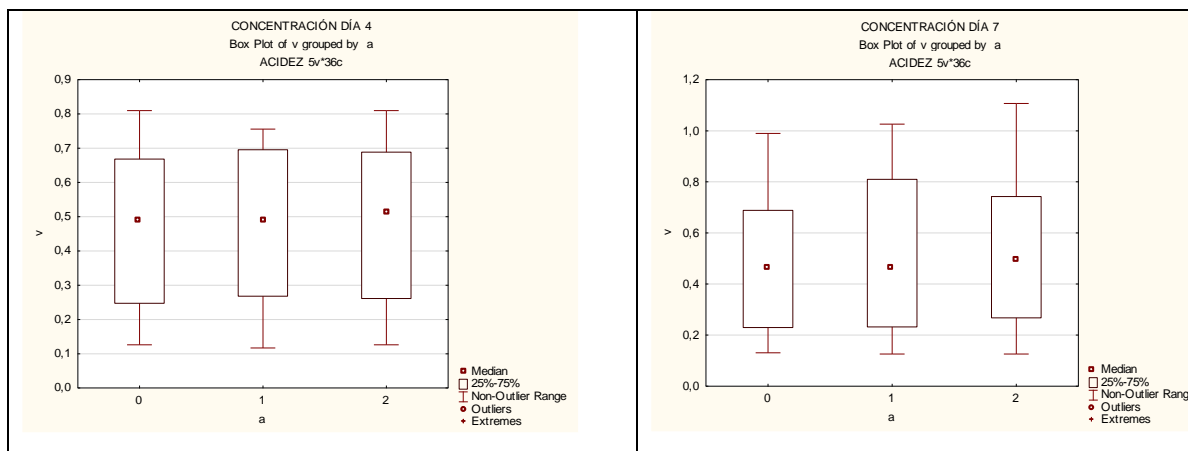


**Figura 4**

*Resumen de resultados de pH Factor A (concentración), para prueba de significancia de Tukey.*

| Acidez (%) DÍA 0 | Acidez (%) DÍA 1 |
|------------------|------------------|
|------------------|------------------|

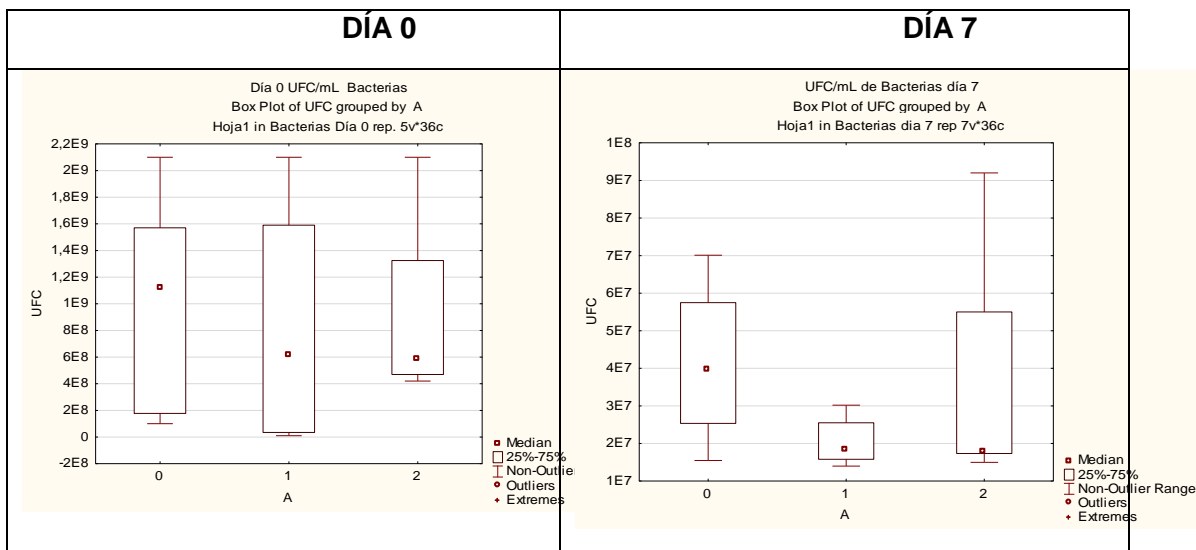




**Figura 5**

*Resumen de resultados de Bacterias Factor A (concentración), para prueba de significancia de Tukey*

## BACTERIAS

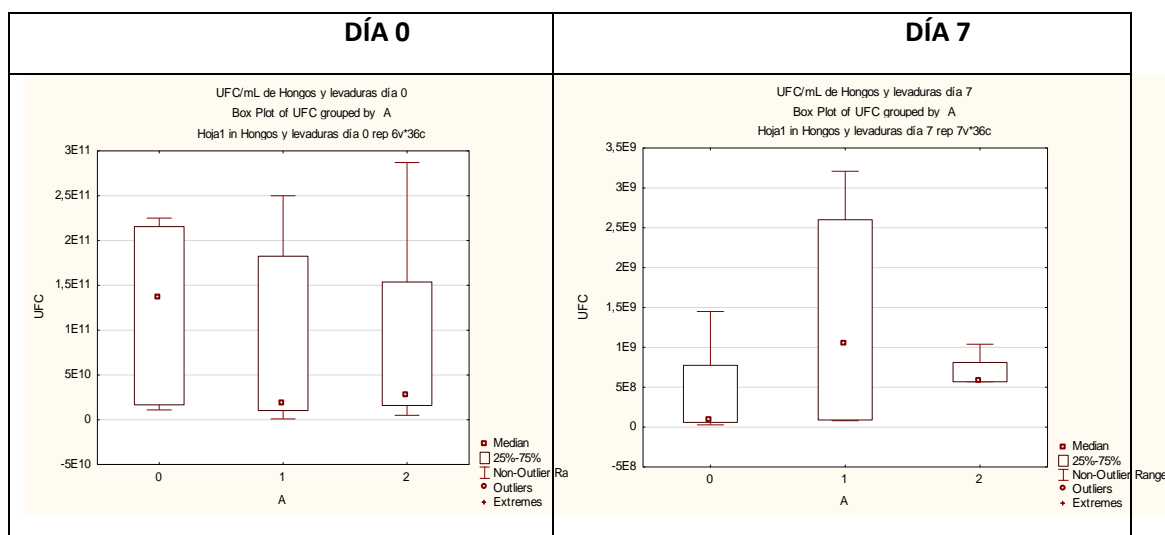


**Figura 6**

*Resumen de resultados de Levaduras y hongos Factor A (concentración), para prueba de significancia de Tukey.*

## LEVADURAS Y HONGOS





**Prueba de significancia de Tukey de pH de la temperatura (T. ambiente y T. refrigeración) del estudio de estudio de distintas concentraciones de nisina aplicada en suero lácteo.**

**Tabla 36**

*Resultados de variable pH de Factor B (Temperatura) (Tukey  $P > 0,05$ )*

|          |               | pH       |          |          |          |          |          |
|----------|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Factor B |               | Día 0    | Día 1    | Día 2    | Día 3    | Día 4    | Día 7    |
| b0       | T. ambiente   | 5,61 (a) | 4,65 (a) | 4,18 (a) | 4,12 (a) | 4,00 (a) | 3,98 (a) |
| b1       | Refrigeración | 5,71 (b) | 5,80 (b) | 5,79 (b) | 5,56 (b) | 5,69 (b) | 5,50 (b) |

La tabla 36 muestra los resultados de la variable pH desde el día 0 hasta el día 7 del factor B que corresponde a la temperatura del estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de suero de leche bovina procedente de distintas zonas.

Respecto al día 0 el pH fue mayor a Temperatura de refrigeración con 5,71 (grupo b) frente al pH más bajo a temperatura ambiente con 5,61 (grupo a).

En el día 1 se obtuvo que el pH más alto se presentó a temperatura de refrigeración con 5,80 (grupo b) frente al pH más bajo dado a temperatura ambiente con 4,65 (grupo a).

En el día 2 el pH fue mayor a temperatura de refrigeración con 5,79 (grupo b), frente al pH más bajo a temperatura ambiente con 4,18 (grupo a).

En el día 3 se obtuvo que el pH más alto correspondió al de temperatura de refrigeración con 5,56 (grupo b), frente al valor más bajo de pH dado a temperatura ambiente con 4,12 grupo (a).

En el día 4 se obtuvo que el pH más alto correspondió al de temperatura a temperatura de refrigeración con 5,69 (grupo b) y el valor más bajo fue a temperatura ambiente con 4,00 (grupo a).

En el día 7 el pH fue mayor a temperatura de refrigeración con 5,50 (grupo b), frente a la temperatura ambiente con 3,98 (grupo a) con el valor más bajo.

### Tabla 37

*Resultados de variable acidez de Factor B (Temperatura) (Tukey  $P > 0,05$ )*

| Factor B         | Acidez   |         |         |         |         |         |  |
|------------------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|--|
|                  | Día 0    | Día 1   | Día 2   | Día 3   | Día 4   | Día 7   |  |
| b1 Refrigeración | 0,22 (a) | 0,23(a) | 0,25(a) | 0,23(a) | 0,26(a) | 0,25(a) |  |
| b0 T.ambiente    | 0,24 (b) | 0,45(b) | 0,56(b) | 0,59(b) | 0,69(b) | 0,78(b) |  |

En la tabla 37 muestra los resultados de la variable acidez desde el día 0 hasta el día 7 del factor B que corresponde a la temperatura del estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de suero de leche bovina procedente de distintas zonas.

En el día 0 la mayor acidez se presentó en temperatura ambiente (0,24%, grupo b) frente al valor más bajo a temperatura de refrigeración (0,22%, grupo a).

En el día 1 la mayor acidez se presentó en temperatura ambiente (0,45%, grupo b) frente al valor más bajo a temperatura de refrigeración (0,23%, grupo a).

En el día 2 la mayor acidez se presentó en temperatura ambiente (0,56%, grupo b) frente al valor más bajo a temperatura de refrigeración (0,25%, grupo a).

En el día 3 la mayor acidez se presentó en temperatura ambiente (0,59%, grupo b) frente al valor más bajo a temperatura de refrigeración (0,23%, grupo a).

En el día 4 la mayor acidez se presentó en temperatura ambiente (0,69%, grupo b) frente al valor más bajo a temperatura de refrigeración (0,26%, grupo a).

En el día 7 la mayor acidez se presentó en temperatura ambiente (0,78%, grupo b) frente al valor más bajo a temperatura de refrigeración (0,25%, grupo a).

**Tabla 38**

*Resultados de UFC Factor B (Temperatura) (Tukey  $P > 0,05$ )*

|    | Factor B        | BACTERIAS    |             | LEVADURAS   | Y HONGOS    |
|----|-----------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
|    |                 | Día 0        | Día 7       | Día 0       | Día 7       |
| b0 | T.ambiente      | 1,00E+09 (b) | 4,50E+07(b) | 1,6E+11 (b) | 1,4E+09 (b) |
| b1 | T.refrigeración | 8,11E+08 (a) | 2,01E+07(a) | 3,4E+10 (a) | 2,4E+08 (a) |

La tabla 38 indica los resultados de las UFC/mL de bacterias, levaduras y hongos del día 0 y día 7 del factor B que corresponde al Factor B (temperatura) del estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de suero de leche bovina procedente de distintas zonas que tuvieron diferencia significativa.

Respecto al día 0 en la UFC de bacterias, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de 1,00E+09 (grupo b) en las que fueron tratadas a temperatura de ambiente, frente a las que fueron conservadas a temperatura de refrigeración con una cantidad de población microbiana/mL de 8,11E+08 (grupo a) siendo este el valor más bajo de microorganismos/mL.

En la UFC de levaduras y hongos, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de 1,6E+11 (grupo b) en las que fueron tratadas a temperatura ambiente; por otro lado, hubo una menor cantidad de población microbiana/mL de 3.4E+10 (grupo a) en las que fueron conservadas a temperatura de refrigeración.

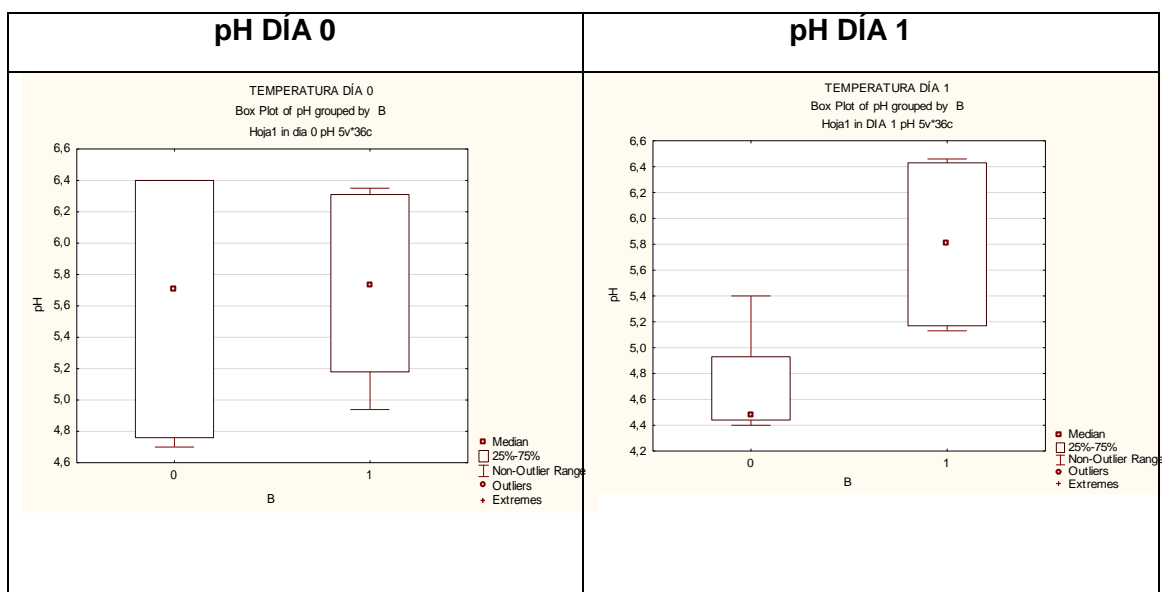
En el día 7 en la UFC de bacterias, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de 4,5E+07 (grupo b) en las que se trataron a temperatura ambiente, frente a las que fueron conservadas a temperatura de

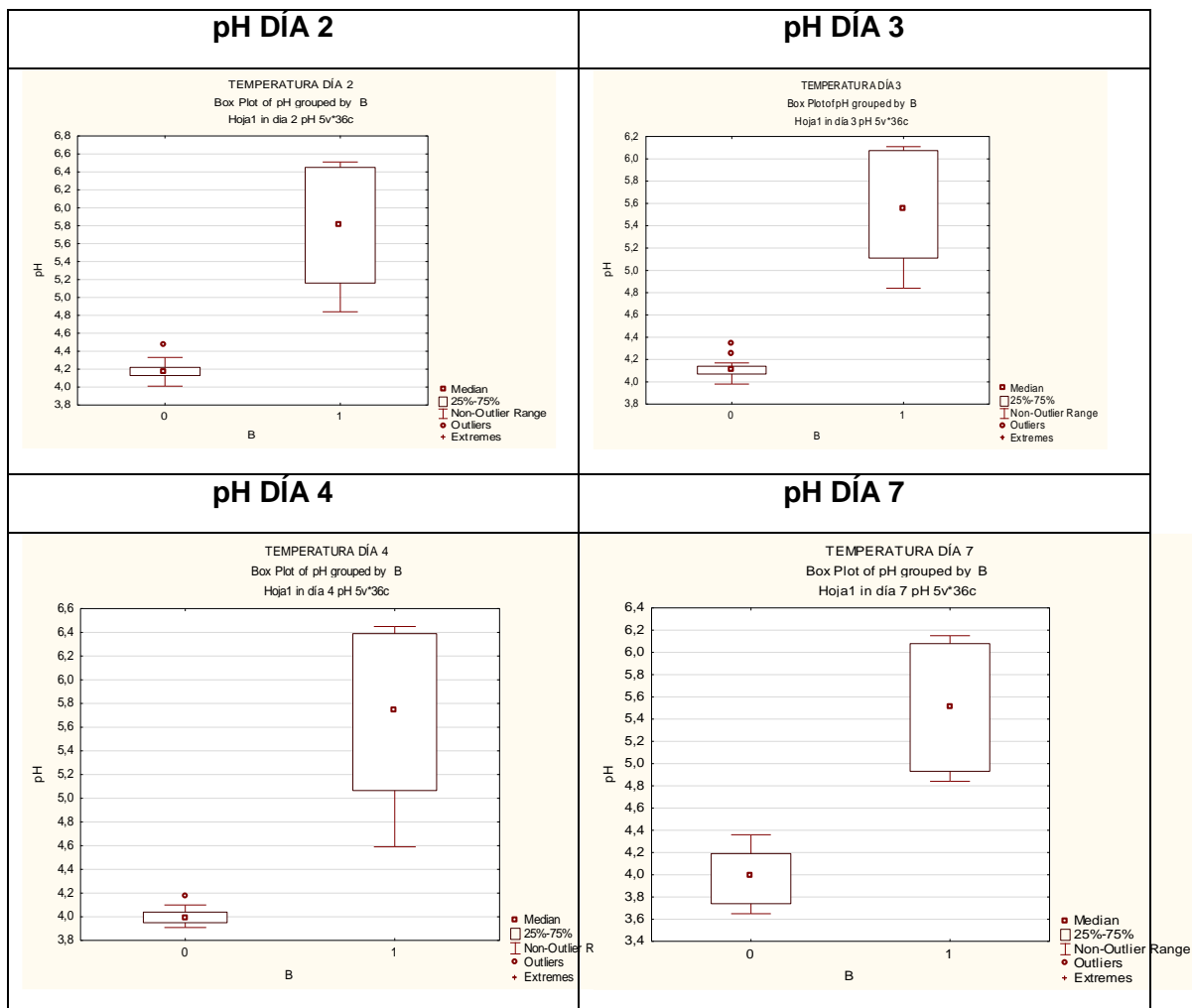
refrigeración con  $2,01E+07$  (grupo a) el cual indicó el valor más bajo de microorganismos/mL.

En la UFC de levaduras y hongos, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de  $1,4E+09$  (grupo b) en las conservadas a temperatura ambiente; por otro lado, hubo una menor cantidad de población microbiana/mL de  $2,4E+08$  (grupo a) en las que fueron tratadas a temperatura de refrigeración.

### Figura 7

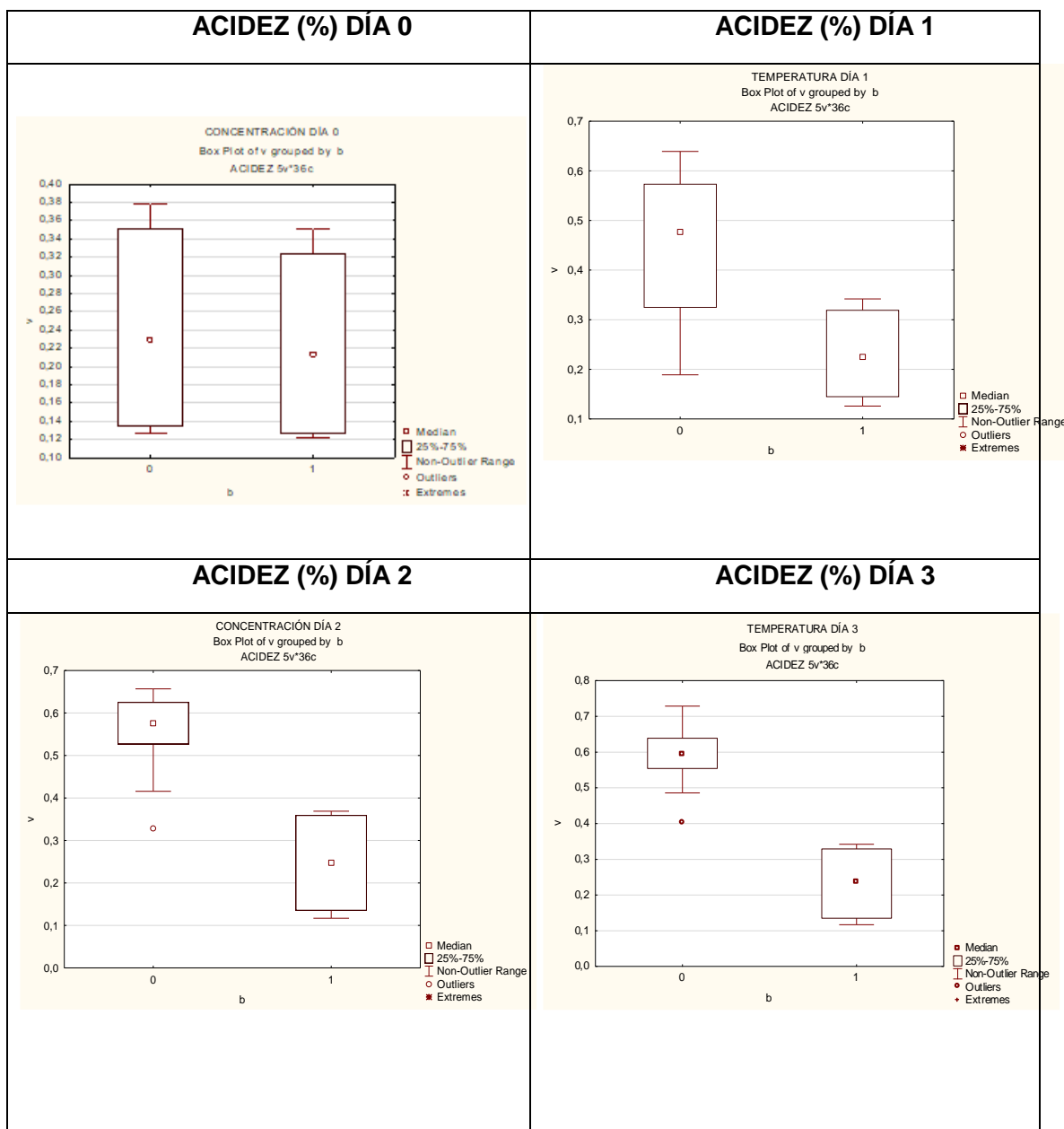
*Resumen de resultados de pH del Factor B (Temperatura), para prueba de significancia de Tukey.*

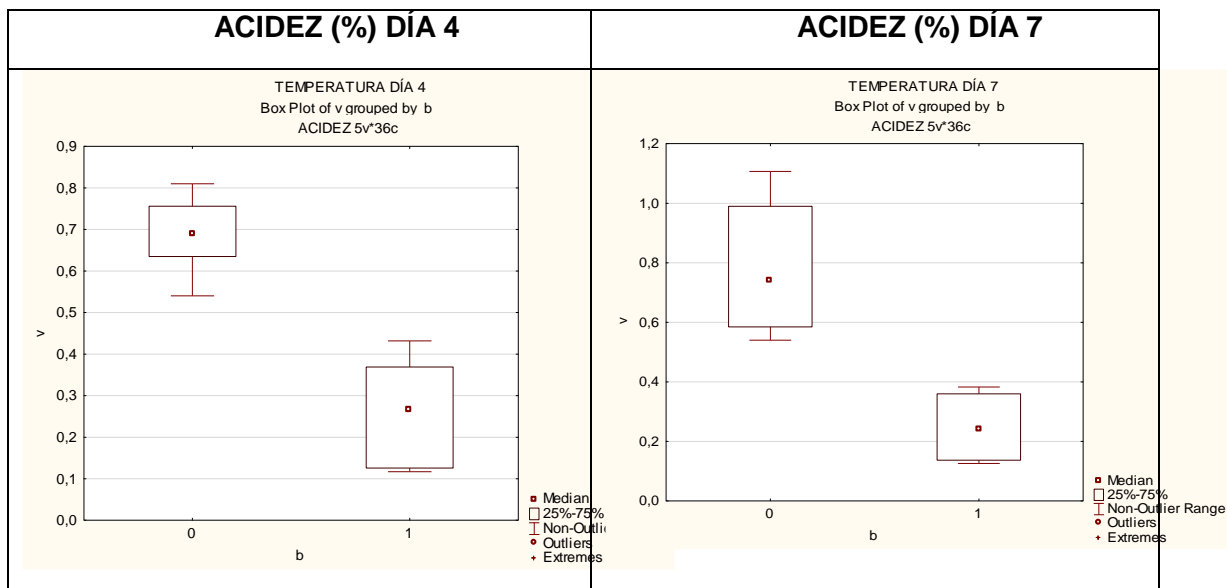




**Figura 8**

*Resumen de resultados de acidez del Factor B (Temperatura), para prueba de significancia de Tukey.*

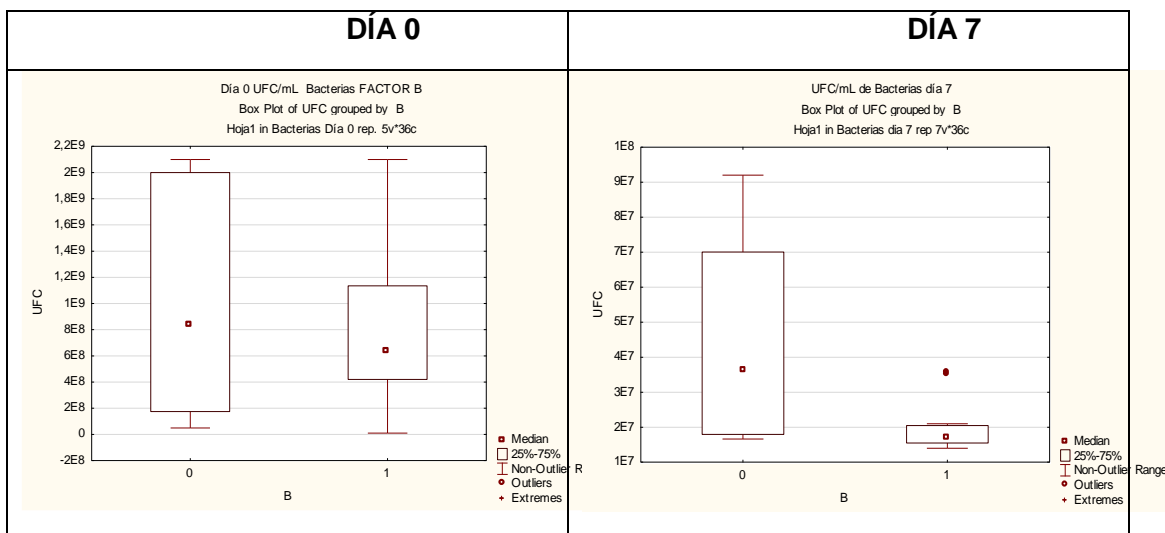




**Figura 9**

*Resumen de resultados de acidez del Factor B (Temperatura), para prueba de significancia de Tukey.*

**BACTERIAS**

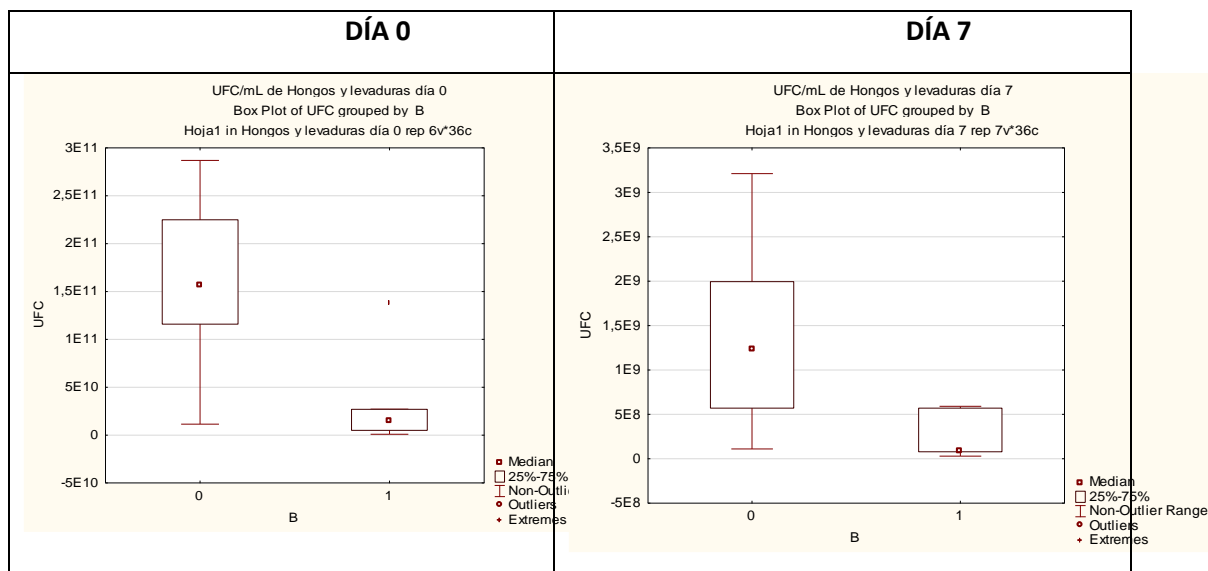




**Figura 10**

*Resumen de resultados de Levaduras y Hongos Factor B (temperatura), para prueba de significancia de Tukey*

### LEVADURAS Y HONGOS



**Prueba de significancia de Tukey de la procedencia (p.artesanal y p.tradicional) del estudio de distintas concentraciones de nisina aplicadas en suero lácteo.**

**Tabla 39**

*Resultados de variable pH de Factor C (Procedencia) (Tukey  $P > 0,05$ )*

| Factor C       | Día 0    | Día 1    | pH       |          |          |          | Día 7 |
|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------|
|                |          |          | Día 2    | Día 3    | Día 4    |          |       |
| c0 Tradicional | 6,34 (b) | 5,65 (b) | 5,35 (b) | 5,11 (b) | 5,22 (b) | 5,15 (b) |       |
| c1 Artesanal   | 4,98 (a) | 4,80 (a) | 4,62 (a) | 4,58 (a) | 4,47 (a) | 4,33 (a) |       |

La tabla 39 muestra los resultados de la variable pH desde el día 0 hasta el día 7 del factor C que corresponde a la procedencia de elaboración del estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de suero de leche bovina procedente de distintas zonas.

Respecto al día 0 el pH fue mayor desde procedencia tradicional con 6,34 (grupo b) frente al pH más bajo desde procedencia artesanal con 4,98 (grupo a).

En el día 1 se obtuvo que el pH más alto fue de procedencia tradicional con 5,65 (grupo b) frente al pH más bajo de procedencia artesanal con 4,80 (grupo a).

En el día 2 el pH fue mayor desde procedencia tradicional con 5,35 (grupo b), frente al pH más bajo desde procedencia artesanal con 4,62 (grupo a).

En el día 3 se obtuvo que el pH más alto correspondió al de procedencia tradicional con 5,11 (grupo b), frente al valor más bajo de pH dado con procedencia artesanal con 4,58 grupo (a).

En el día 4 se obtuvo que el pH más alto correspondió al de procedencia tradicional con 5,22 (grupo b) y el valor más bajo fue el de procedencia artesanal con 4,47 (grupo a).

En el día 7 el pH fue mayor desde procedencia tradicional con 5,15 (grupo b), frente al de procedencia artesanal con 4,33 (grupo a) con el valor más bajo.

**Tabla 40**

*Resultados de variable acidez titulable de Factor C (Procedencia) (Tukey  
P>0,05)*

|    | Factor C    | Día 0    | Día 1   | Acidez  |         |         |         |
|----|-------------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|
|    |             |          |         | Día 2   | Día 3   | Día 4   | Día 7   |
| c0 | Tradicional | 0,13 (a) | 0,23(a) | 0,32(a) | 0,34(a) | 0,38(a) | 0,36(a) |
| c1 | Artisanal   | 0,34 (b) | 0,45(b) | 0,49(b) | 0,49(b) | 0,57(b) | 0,66(b) |

La tabla 40 muestra los resultados de la variable acidez desde el día 0 hasta el día 7 del factor C que corresponde a la procedencia de elaboración del estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de suero de leche bovina procedente de distintas zonas.

En el día 0 se obtuvo que el valor de acidez más alto correspondió al de procedencia artesanal con un porcentaje de 0,34% (grupo b) frente al valor más bajo de acidez dado por la procedencia tradicional con 0,13% (grupo a).

En el día 1 se obtuvo un valor de acidez más alto en la procedencia artesanal con un porcentaje del 0,45% (grupo b) frente al valor más bajo de acidez dado por la procedencia tradicional con 0,23% (grupo a).

En el día 2 se obtuvo un valor de acidez más alto en la procedencia artesanal con un porcentaje de 0,49% (grupo b) frente al valor más bajo de acidez dado por la procedencia tradicional con 0,32% (grupo a).

En el día 3 se obtuvo un valor de acidez más alto en la procedencia artesanal con un porcentaje de 0,49% (grupo b) frente al valor más bajo de acidez dado por la procedencia tradicional con 0,34% (grupo a).

En el día 4 se obtuvo un valor de acidez más alto en la procedencia artesanal con un porcentaje de 0,57% (grupo b) frente al valor más bajo de acidez dado por la procedencia tradicional con 0,38% (grupo a).

En el día 7 se obtuvo un valor de acidez más alto en la procedencia artesanal con un porcentaje de 0,66% (grupo b) frente al valor más bajo de acidez dado por la procedencia tradicional con 0,36% (grupo a).

**Tabla 41**

*Resultados de variable UFC de Factor C (Procedencia) (Tukey  $P>0,05$ )*

|    | Factor C    | BACTERIAS    |             | LEVADURAS   | Y HONGOS    |
|----|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
|    |             | Día 0        | Día 7       | Día 0       | Día 7       |
| c0 | Tradicional | 2,97E+08 (a) | 4,31E+07(b) | 8,1E+10 (a) | 9,9E+08 (b) |
| c1 | Artesanal   | 1,52E+09 (b) | 2,20E+07(a) | 1,1E+11 (b) | 6,4E+08 (a) |

La tabla 41 indica los resultados de las UFC/mL de bacterias, levaduras y hongos del día 0 y día 7 del factor B que corresponde al Factor C (procedencia del suero), del estudio del efecto de distintas concentraciones de nisina como bioconservante de suero de leche bovina procedente de distintas zonas que tuvieron diferencia significativa.

Respecto al día 0 en la UFC/mL de bacterias, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de 1,52E+09 (grupo b) del suero de leche con procedencia artesanal, frente al de procedencia tradicional con una cantidad de población microbiana/mL de 2,97E+08 (grupo a) siendo este el valor más bajo de microorganismos/mL.

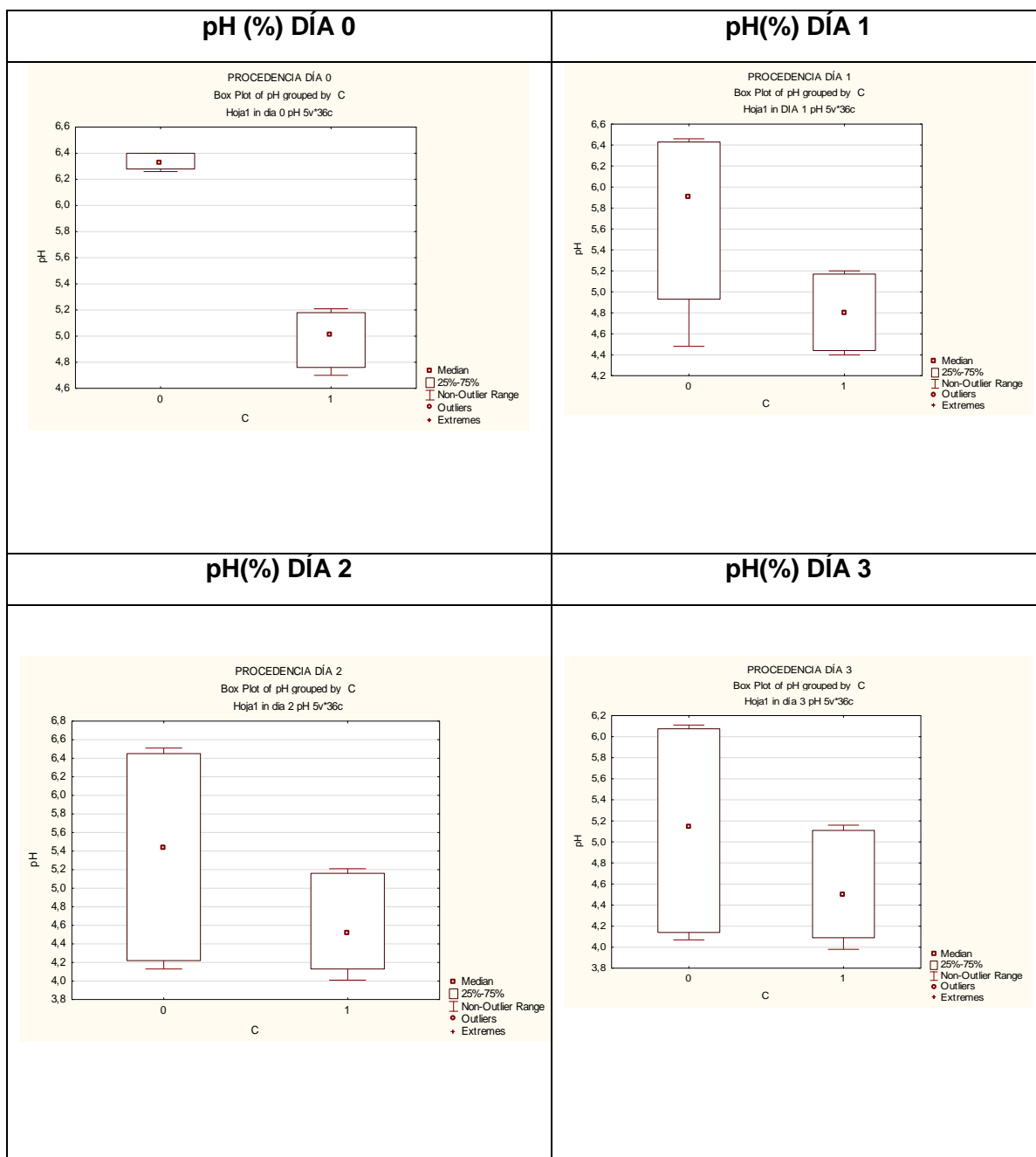
En la UFC de levaduras y hongos, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de  $1,1E+11$  (grupo b) del suero de leche de procedencia artesanal; por otro lado, hubo una menor cantidad de población microbiana/ml de  $8,1E+10$  (grupo a) en el suero de leche de procedencia tradicional.

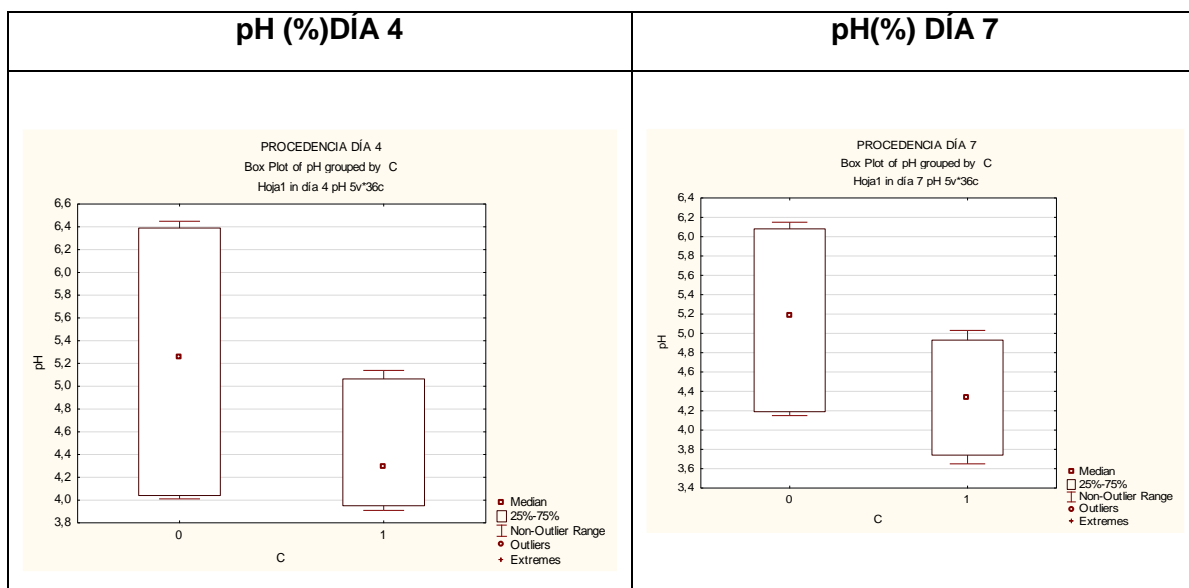
En el día 7 en la UFC/mL de bacterias, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de  $4,31E+07$  (grupo b) presente en el suero de leche de procedencia tradicional, frente a la población microbiana presente en el suero de leche de procedencia artesanal con  $2,20E+07$  (grupo a) el cual indicó el valor más bajo de microorganismos.

En la UFC de levaduras y hongos, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de  $9,9E+08$  (grupo b) en el suero de leche con procedencia tradicional; por otro lado, se encontró una menor cantidad de población microbiana de  $6,4E+08$  (grupo a) en el suero de leche de procedencia artesanal.

Figura 11

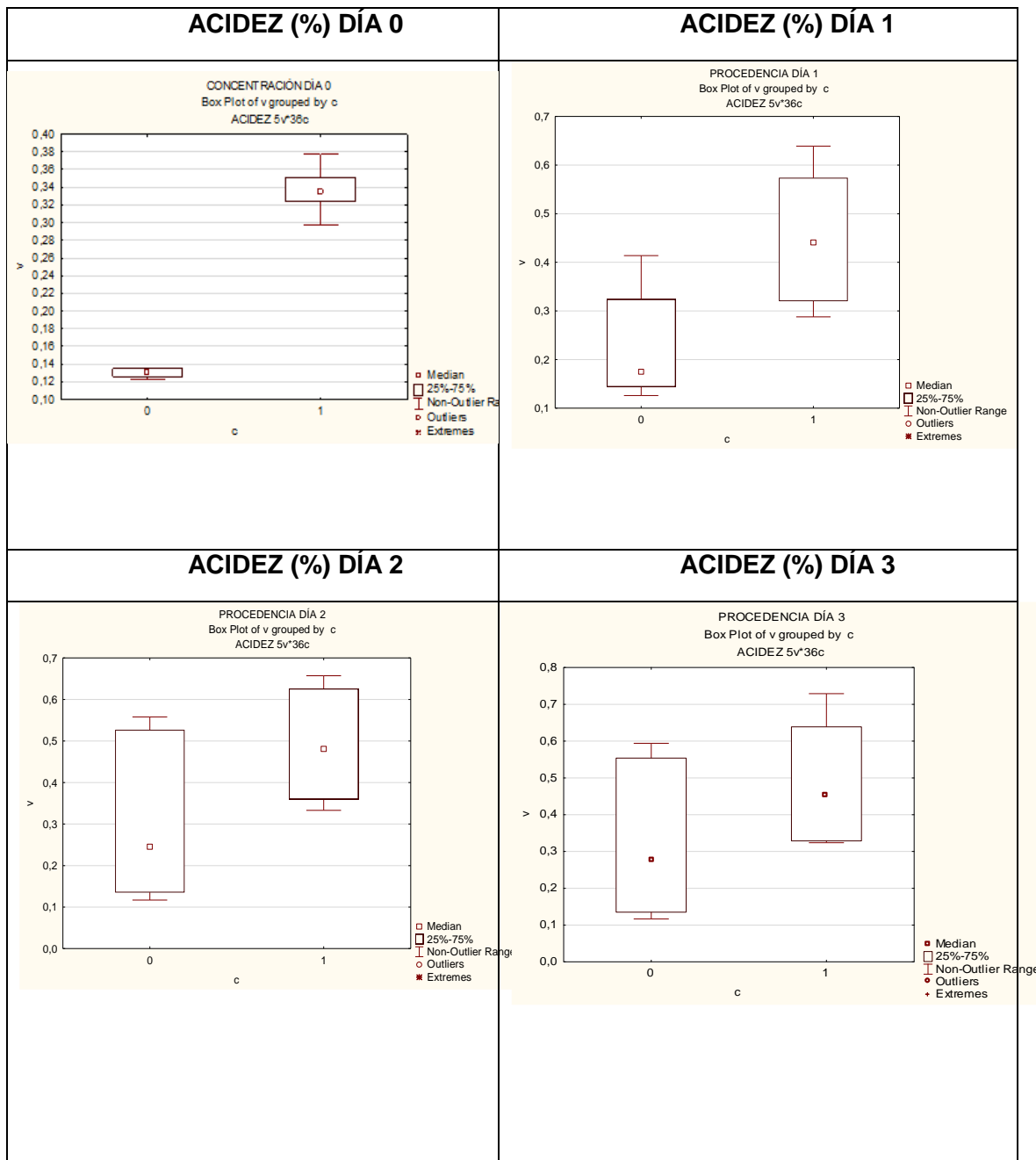
Resumen de resultados de pH del Factor C (Procedencia), para prueba de significancia de Tukey.





**Figura 12**

*Resumen de resultados de acidez del Factor C (Procedencia), para prueba de significancia de Tukey*





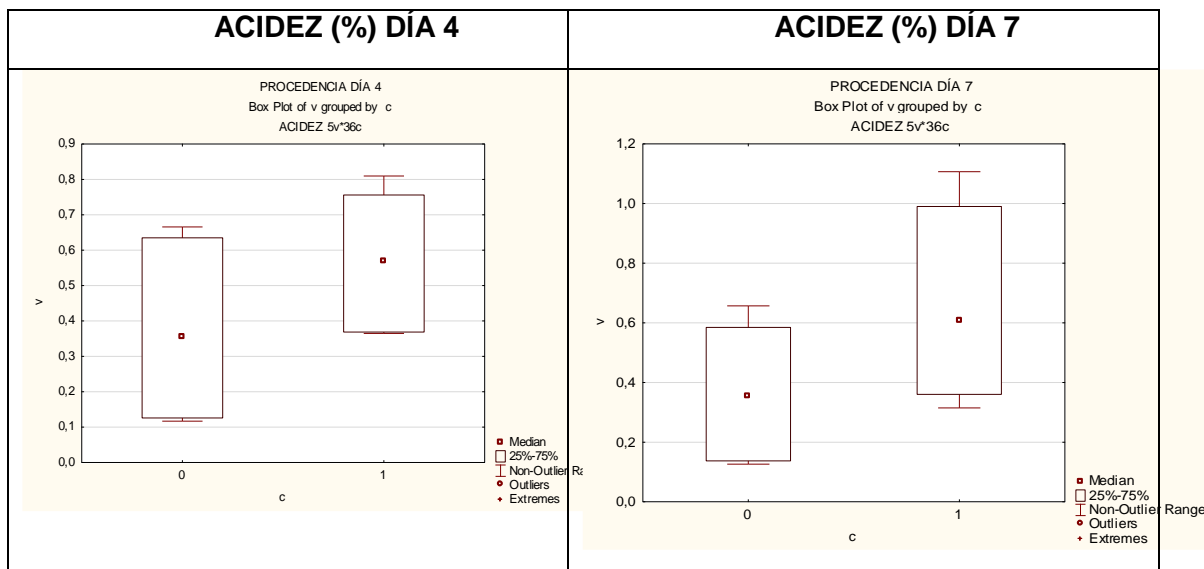
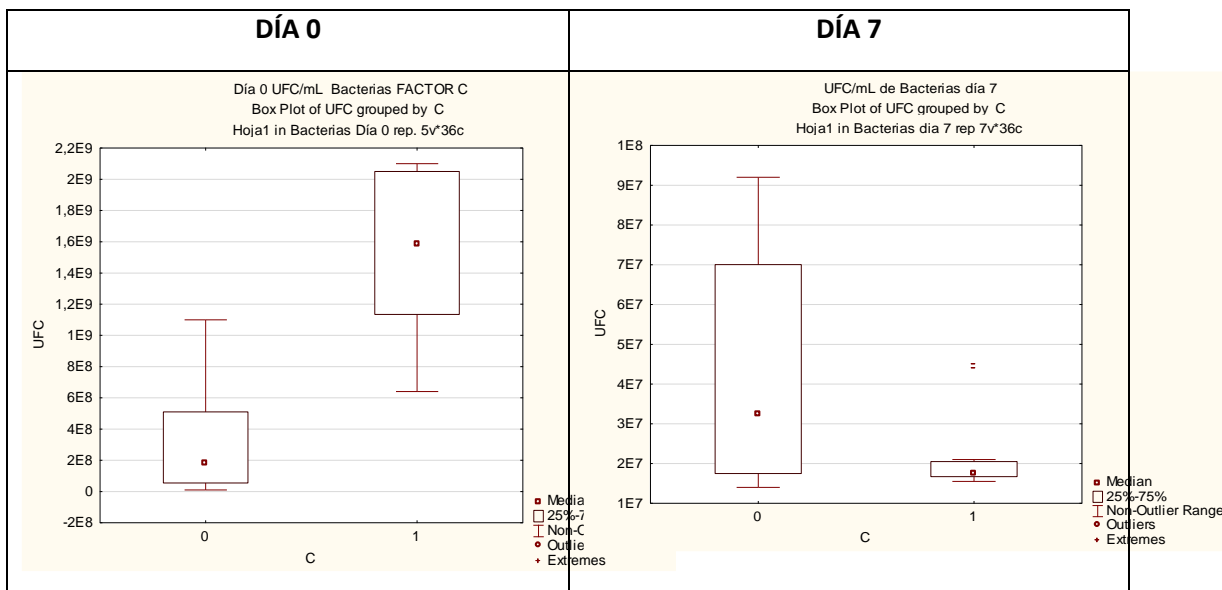


Figura 13

Resumen de resultados de Bacterias Factor C (procedencia), para prueba de significancia de Tukey

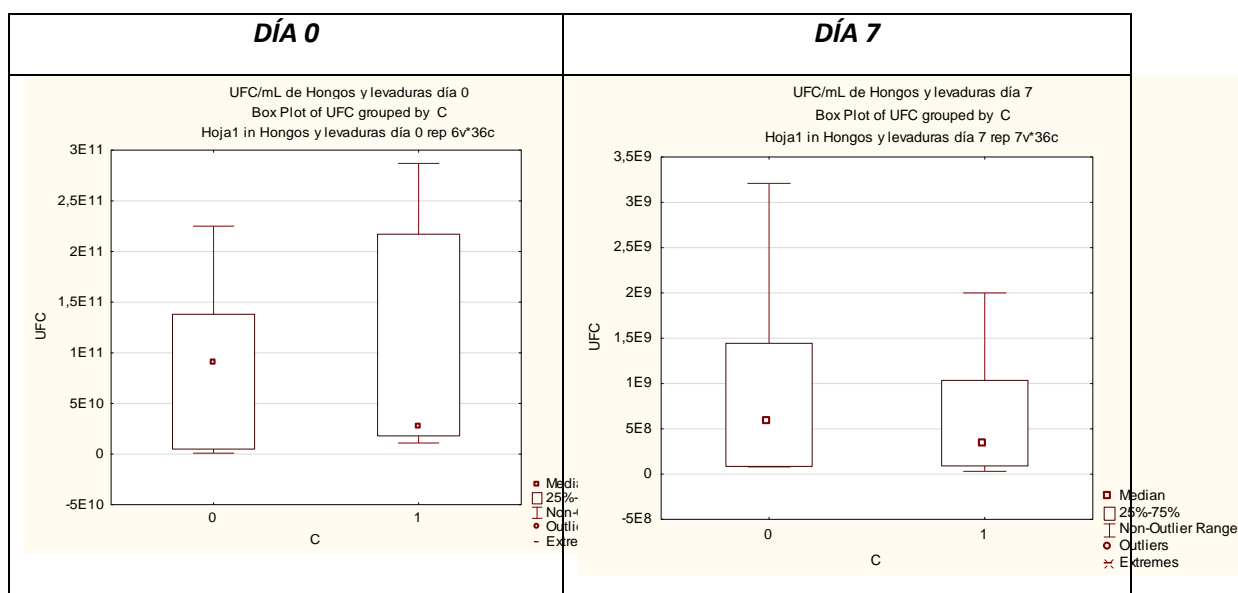
BACTERIAS



**Figura 14**

*Resumen de resultados de Levaduras y hongos Factor C (procedencia), para prueba de significancia de Tukey.*

### LEVADURAS Y HONGOS



### Prueba de significancia de Tukey de pH de la interacción AxB

**(concentración/temperatura) del estudio de distintas concentraciones de nisina aplicadas en suero lácteo, con diferente temperatura y procedencia.**

**Tabla 42**

*Pruebas de significancia (Tukey) de pH de interacción AxB*

*(concentración/temperatura)*

| Conc.   | Temperatura     | Día 0     | Día 1     | Día 2    | Día 3     | Día 4    | Día 7    |
|---------|-----------------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|----------|
| 100 ppm | T. ambiente     | 5,57 (a)  | 4,51 (a)  | 4,16 (a) | 4,09 (a)  | 3,99 (a) | 3,94 (a) |
| 200 ppm | T. ambiente     | 5,63 (ab) | 4,67 (ab) | 4,18 (a) | 4,13 (a)  | 3,99 (a) | 3,94 (a) |
| 50 ppm  | T. ambiente     | 5,64 (ab) | 4,77 (b)  | 4,21 (a) | 4,15 (a)  | 4,02 (a) | 4,05 (b) |
| 50 ppm  | T.refrigeración | 5,67 (ab) | 5,82 (c)  | 5,73 (b) | 5,49 (b)  | 5,59 (b) | 5,46 (c) |
| 100 ppm | T.refrigeración | 5,70 (ab) | 5,81 (c)  | 5,84 (b) | 5,59 (bc) | 5,78 (c) | 5,56 (d) |
| 200 ppm | T.refrigeración | 5,76 (b)  | 5,78 (c)  | 5,80 (b) | 5,61 (c)  | 5,71 (c) | 5,49 (c) |

En la tabla 42 se muestra la interacción A\*B de la variable pH de las cuales se obtuvo diferencia significativa en los siguientes días:

Día 0 se obtuvo el mayor valor de pH en la interacción entre la concentración de 200 ppm y temperatura de refrigeración con 5,76 (grupo b) y el menor valor con la interacción entre la concentración de 100 ppm a una temperatura ambiente con 5,57 (grupo a).

Día 1 se encontró un valor alto de pH en interacciones entre una concentración de 50 ppm a una temperatura de refrigeración con 5,82 (grupo c), frente al menor valor de pH presente en la interacción entre una concentración de 100 ppm a temperatura ambiente con 4,51 (grupo a).

Día 2 se obtuvo un valor alto de pH en la interacción entre concentración de 100 ppm a una temperatura de refrigeración con 5,84 (grupo b), frente al menor valor de pH presente en la interacción entre la concentración de 100 ppm a temperatura ambiente con 4,16 (grupo a).

Día 3 se encontró un valor alto de pH en la interacción entre una concentración de 200 ppm a temperatura de refrigeración con 5,61 (grupo c), mientras que se obtuvo el menor valor de pH en la interacción entre la concentración de 100 ppm a temperatura ambiente con 4,09 (grupo a).

Día 4 se obtuvo un valor mayor de pH presente en la interacción entre una concentración de 100 ppm a temperatura de refrigeración con 5,78 (grupo c), frente a un menor valor de pH presente en la interacción entre la concentración 100 ppm a temperatura ambiente y la concentración a 200 ppm a temperatura ambiente, ambas con 3,99 (grupo a).

Día 7 se encontró un valor alto de pH en la interacción entre una concentración de 100 ppm a temperatura de refrigeración con 5,56 (grupo d), frente a un menor valor de pH presente en la interacción entre la concentración 100 ppm a temperatura ambiente y la concentración 200 a temperatura ambiente ambas con 3,94 (grupo a).

**Tabla 43**

*Prueba de significancia de Tukey de acidez titulable la interacción AxB (concentración/temperatura)*

| Conc.   | Temperatura   | Día 0     | Día 1   | Día 2   | Día 3   | Día 4   | Día 7   |
|---------|---------------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 100 ppm | Refrigeración | 0,21 (a)  | 0,20(a) | 0,24(a) | 0,23(a) | 0,26(a) | 0,24(a) |
| 200 ppm | Refrigeración | 0,23(b)   | 0,25(a) | 0,25(a) | 0,23(a) | 0,26(a) | 0,26(a) |
| 50 ppm  | Refrigeración | 0,23 (bc) | 0,24(a) | 0,24(a) | 0,23(a) | 0,26(a) | 0,24(a) |
| 50 ppm  | T.ambiente    | 0,24(bcd) | 0,41(b) | 0,52(b) | 0,59(b) | 0,67(b) | 0,73(b) |
| 100 ppm | T.ambiente    | 0,24(cd)  | 0,47(c) | 0,58(c) | 0,58(b) | 0,69(b) | 0,80(b) |
| 200 ppm | T.ambiente    | 0,25(d)   | 0,47(c) | 0,59(c) | 0,60(b) | 0,71(b) | 0,80(b) |

En la tabla 43 se muestra la interacción A\*B de la variable acidez obteniéndose diferencia significativa en los siguientes días:

En el día 0 se obtuvo el mayor valor de acidez en la interacción entre la concentración de 200 ppm y temperatura ambiente con 0,25% (grupo d) y el menor valor con la interacción entre la concentración de 100 ppm a una temperatura de refrigeración con 0,21% (grupo a).

En el día 1 se obtuvo un valor menor de acidez en las interacciones del grupo a: 50 ppm\* temperatura de refrigeración (0,24%), 100 ppm\* temperatura de refrigeración (0,20%), 200 ppm\* temperatura de refrigeración (0,25%). Las de valores mayor formaron parte del grupo b cuyas interacciones fueron 100

ppm\*temperatura ambiente y 200 ppm\* temperatura ambiente con un porcentaje de acidez del 0,47%.

En el día 2 se obtuvo un valor mayor de acidez en las interacciones pertenecientes al grupo c: 100 ppm\*temperatura ambiente (0,58%) y 200 ppm\*temperatura ambiente (0,59%). Los valores menores formaron parte del grupo a y fueron los siguientes: 50 ppm\*temperatura de refrigeración y 100 ppm\* temperatura de refrigeración con un porcentaje de 0,24% y 200 ppm\* temperatura de refrigeración con un porcentaje de 0,25%.

En los días 3,4 y 7 no obtuvieron diferencia significativa en esta variable.

**Tabla 44**

*Pruebas de significancia Tukey de UFC de la interacción AxB  
(concentración/temperatura)*

| Conc.   | Temperatura     | BACTERIAS    |              | LEVADURAS    |       | Y HONGOS     |       |
|---------|-----------------|--------------|--------------|--------------|-------|--------------|-------|
|         |                 | Día 0        | Día 7        | Día 0        | Día 7 | Día 0        | Día 7 |
| 100 ppm | T. ambiente     | 6,15E+08(ab) | 2,34E+07(b)  | 1,57E+11(c)  |       | 2,60E+09 (f) |       |
| 200 ppm | T. ambiente     | 1,28E+09(d)  | 5,45E+07(d)  | 1,56E+11(bc) |       | 8,02E+08 (e) |       |
| 50 ppm  | T. ambiente     | 1,11E+09(cd) | 5,70E+07 (e) | 1,70E+11(c)  |       | 7,78E+08 (d) |       |
| 50 ppm  | T.refrigeración | 8,68E+08(bc) | 2,55E+07 (c) | 7,42E+10(ab) |       | 5,75E+07 (a) |       |
| 100 ppm | T.refrigeración | 1,03E+09(cd) | 1,75E+07 (a) | 1,15E+10(a)  |       | 8,75E+07 (b) |       |
| 200 ppm | T.refrigeración | 5,35E+08 (a) | 1,74E+07 (a) | 1,60E+10(a)  |       | 5,80E+08 (c) |       |

La tabla 44 indica la interacción A\*B (concentración-temperatura) de las UFC/mL de bacterias, levaduras y hongos de las cuales se obtuvo diferencia significativa en los siguientes días:

Respecto al día 0 en la UFC/mL de bacterias, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de 1,28E+09 (grupo d) en la interacción entre una concentración de nisina de 200 ppm y la temperatura ambiente, frente a la interacción entre la concentración de nisina de 200 ppm y temperatura de

refrigeración con una cantidad de población microbiana/ml de  $5,35E+08$  (grupo a) siendo este el valor más bajo de microorganismos/mL.

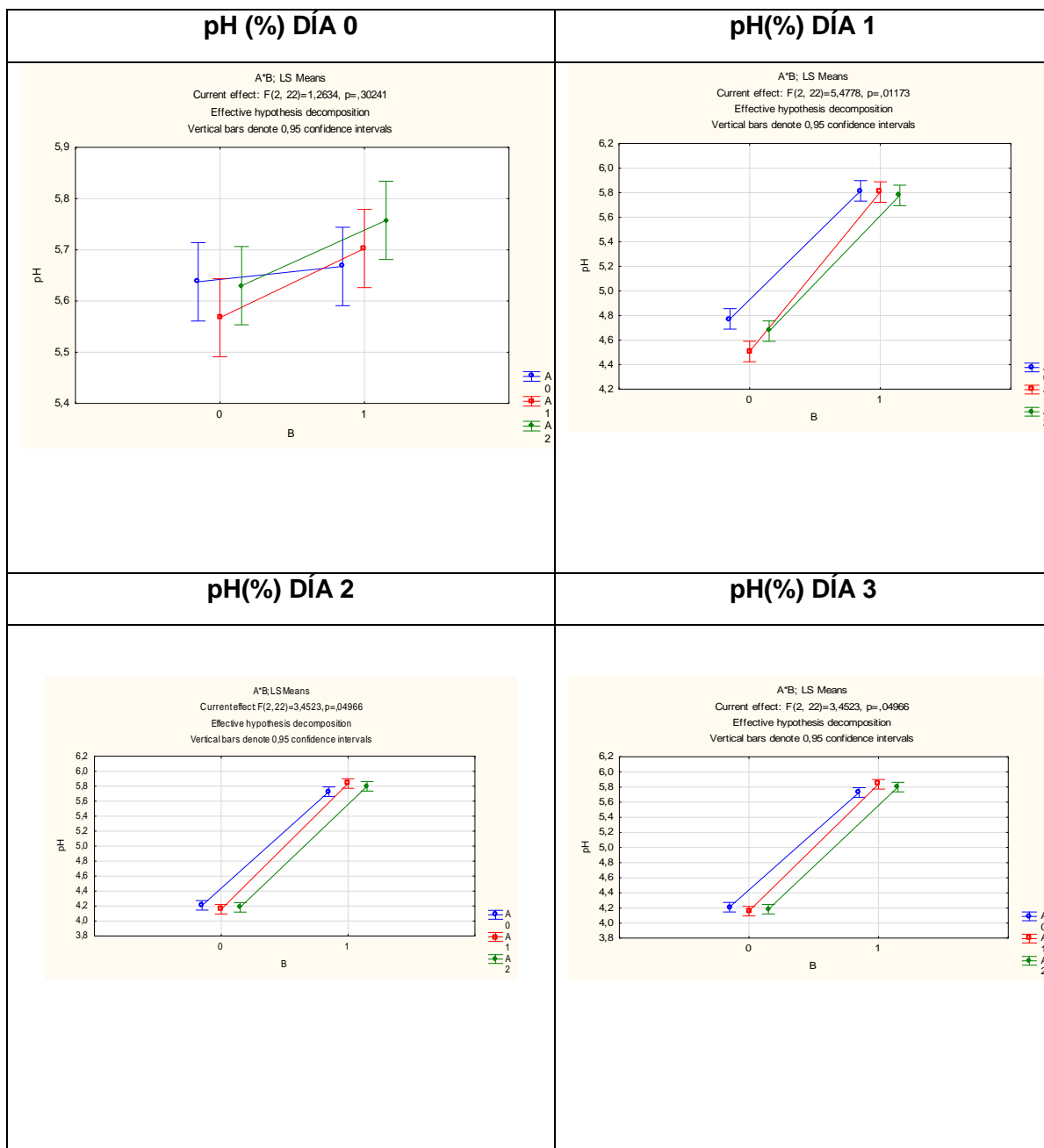
En la UFC/mL de levaduras y hongos, hubo una mayor cantidad de población microbiana de  $1,70E+11$  (grupo c) en las interacciones entre la concentración de nisina de 50 ppm- temperatura ambiente; por otro lado, hubo una menor cantidad de población microbiana/mL de  $1,15E+10$  (grupo a) en la interacción entre la concentración de nisina de 100 ppm y temperatura de refrigeración.

En el día 7 en la UFC/mL de bacterias, hubo una mayor cantidad de población microbiana de  $5,70E+07$  (grupo e) en la interacción entre la concentración de nisina de 50 ppm y temperatura ambiente, frente a la población microbiana/mL de  $1,74E+07$ (grupo a), de la interacción entre la concentración de 200 ppm y temperatura de refrigeración, el cual indicó el valor más bajo de microorganismos/mL.

En la UFC de levaduras y hongos, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de  $8,02E+08$  (grupo e) en la interacción entre la concentración de nisina de 200 ppm y temperatura ambiente; por otro lado, se encontró una menor cantidad de población microbiana/mL de  $5,75E+07$  (grupo a) en la interacción entre la concentración de 50 ppm y temperatura de refrigeración.

Figura 15

Resumen de resultados de pH de interacción AxB (concentración/temperatura), para prueba de significancia de Tukey.



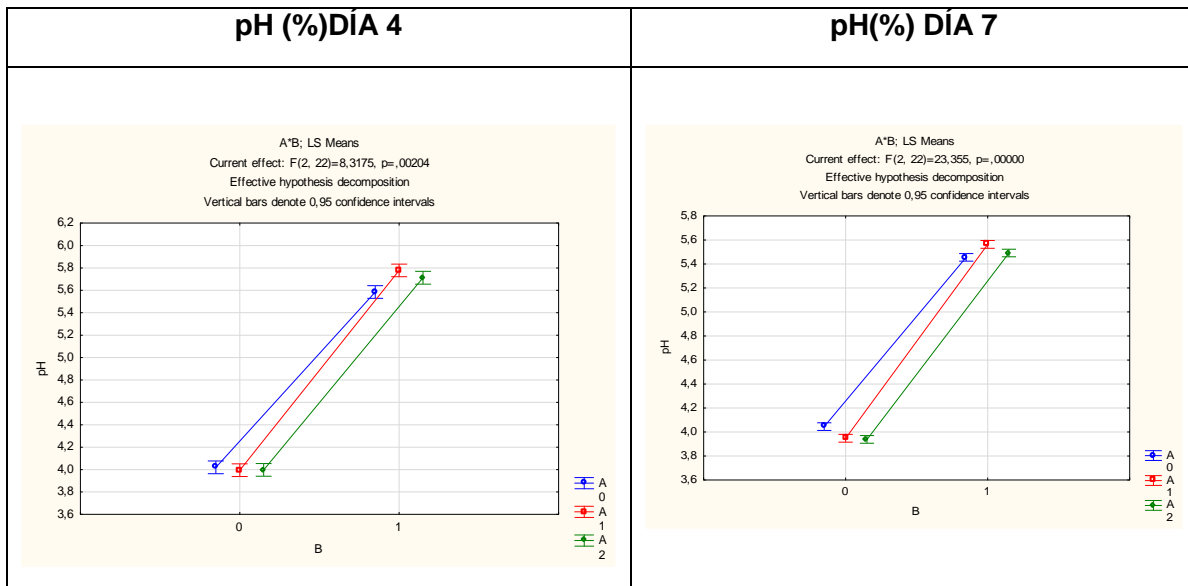
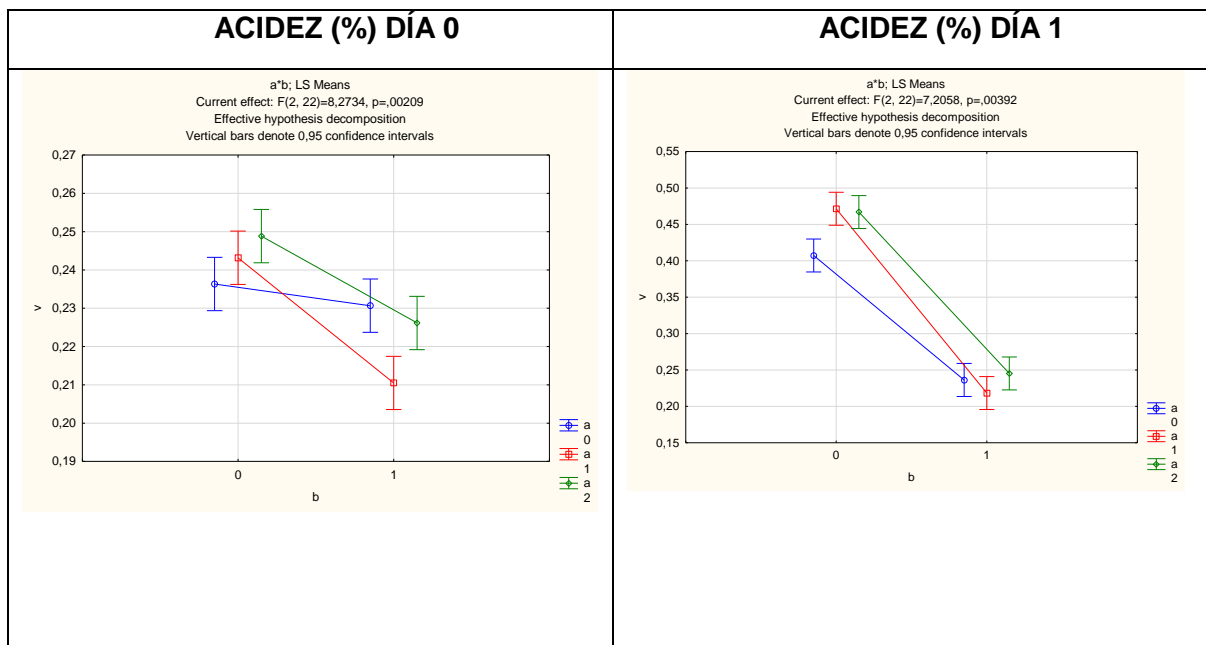


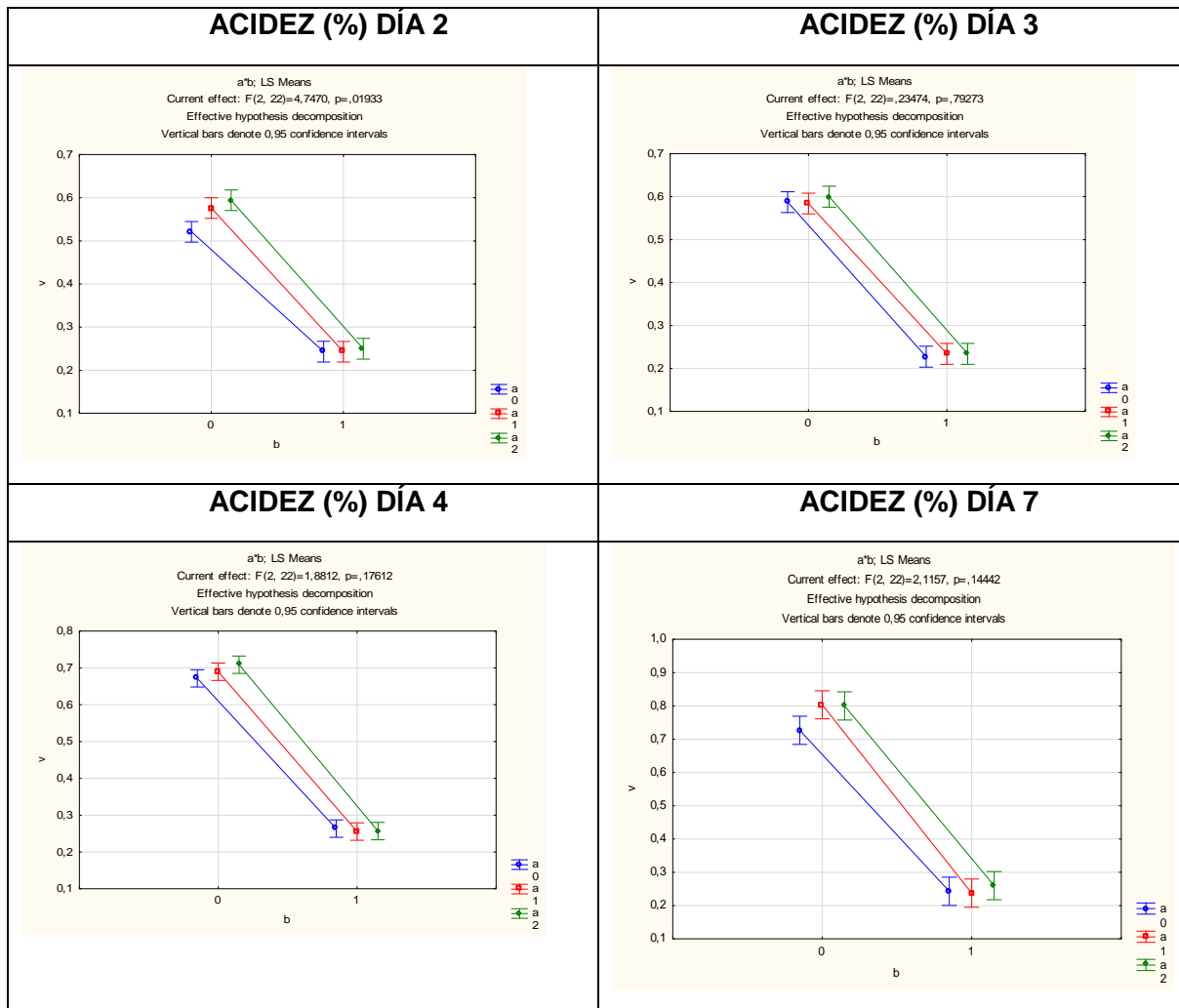
Figura 16

Resumen de resultados de acidez de interacción AxB

(concentración/temperatura), para prueba de significancia de Tukey



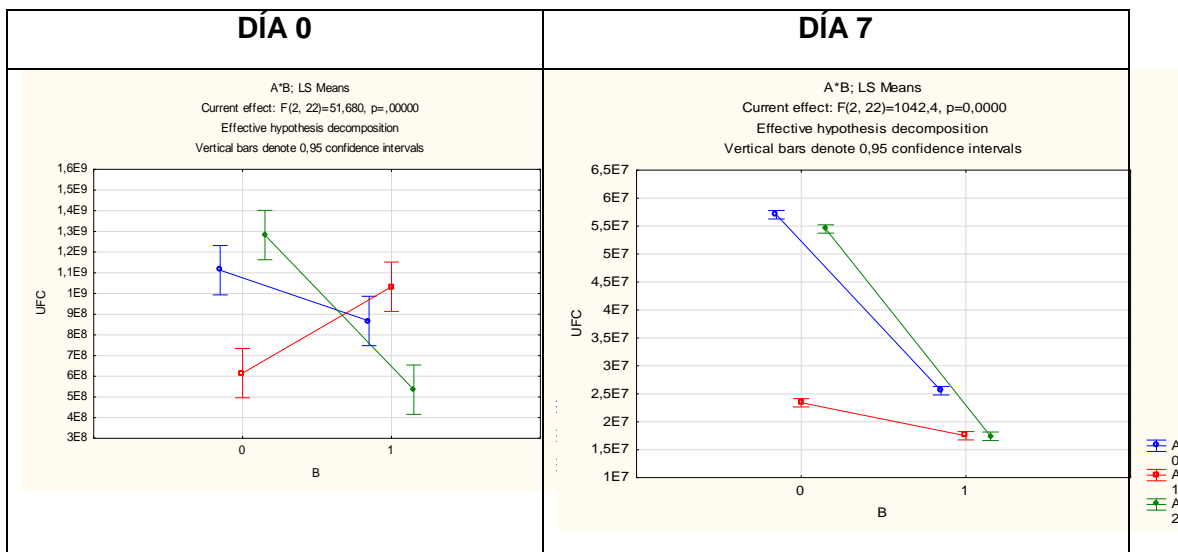




**Figura 17**

*Resumen de resultados de la interacción AxB (concentración/temperatura) de bacterias, para prueba de significancia de Tukey*

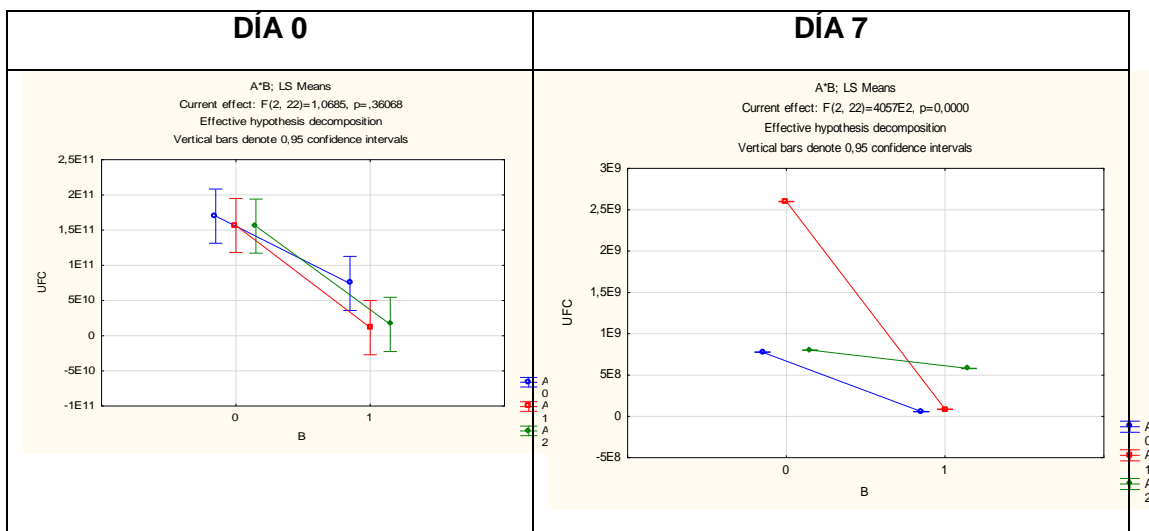
### BACTERIAS



**Figura 18**

*Resumen de resultados de la interacción AxB (concentración/temperatura) de bacterias, para prueba de significancia de Tukey.*

### LEVADURAS Y HONGOS



**Prueba de significancia de Tukey de pH de la interacción AxC**

**(concentración/procedencia) del estudio de distintas concentraciones de nisina aplicadas en suero lácteo, con diferente temperatura y procedencia.**

**Tabla 45**

*Pruebas de significancia (Tukey) de pH de interacción AxC  
(concentración/procedencia)*

| Conc.   | Procedencia | Día 0    | Día 1     | Día 2    | Día 3    | Día 4    | Día 7    |
|---------|-------------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------|
| 100 ppm | Artesanal   | 4,91 (a) | 4,80 (a)  | 4,67 (a) | 4,60 (a) | 4,54 (b) | 4,35 (a) |
| 50 ppm  | Artesanal   | 5,00 (a) | 4,82 (a)  | 4,55 (a) | 4,51 (a) | 4,36 (a) | 4,34 (a) |
| 200 ppm | Artesanal   | 5,03 (a) | 4,77 (a)  | 4,64 (a) | 4,61 (a) | 4,51 (b) | 4,30 (a) |
| 50 ppm  | Tradicional | 6,30 (b) | 5,76 (c)  | 5,39 (b) | 5,12 (b) | 5,24 (c) | 5,17 (b) |
| 200 ppm | Tradicional | 6,36 (b) | 5,67 (bc) | 5,34 (b) | 5,12 (b) | 5,20 (c) | 5,13 (b) |
| 100 ppm | Tradicional | 6,36 (b) | 5,51 (b)  | 5,33 (b) | 5,08 (b) | 5,23 (c) | 5,16 (b) |

En la tabla 45 se muestra la interacción A\*C de la variable pH de las cuales se obtuvo diferencia significativa en los siguientes días:

Día 0 se obtuvo el mayor valor de pH en la interacción entre la concentración de 100 ppm y procedencia tradicional y concentración de 200 ppm y procedencia tradicional con 6,36 (grupo b) ambas y el menor valor con la interacción entre la concentración de 100 ppm y procedencia artesanal con 4,91 (grupo a).

Día 1 se encontró un valor alto de pH en interacciones entre una concentración de 50 ppm y procedencia tradicional con 5,76 (grupo c), frente al menor valor de pH presente en la interacción entre una concentración de 200 ppm y procedencia artesanal con 4,77 (grupo a).

Día 2 se obtuvo un valor alto de pH en la interacción entre concentración de 5 ppm y procedencia tradicional con 5,39 (grupo b), frente al menor valor de

pH presente en la interacción entre la concentración de 50 ppm y procedencia artesanal con 4,55 (grupo a).

Día 3 se encontró un valor alto de pH en la interacción entre una concentración de 50 ppm y procedencia tradicional y la concentración de 200 ppm y procedencia tradicional con 5,12 (grupo b) ambas, mientras que se obtuvo el menor valor de pH en la interacción entre la concentración de 50 ppm y procedencia artesanal con 4,51 (grupo a).

Día 4 se obtuvo un valor mayor de pH presente en la interacción entre una concentración de 5 ppm y procedencia tradicional con 5,24 (grupo c), frente a un menor valor de pH presente en la interacción entre la concentración 50 ppm y procedencia artesanal con 4,36 (grupo a).

Día 7 se encontró un valor alto de pH en la interacción entre una concentración de 50 ppm y procedencia tradicional con 5,17 (grupo b), frente a un menor valor de pH presente en la interacción entre la concentración 200 ppm y procedencia artesanal con 4,30 (grupo a).

#### **Tabla 46**

*Pruebas de significancia (Tukey) de acidez titulable de interacción AxC (concentración/procedencia)*

| Conc.   | Procedencia | Día 0   | Día 1    | Día 2   | Día 3    | Día 4   | Día 7   |
|---------|-------------|---------|----------|---------|----------|---------|---------|
| 50 ppm  | Tradicional | 0,13(a) | 0,20(a)  | 0,27(a) | 0,30(a)  | 0,35(a) | 0,34(a) |
| 200 ppm | Tradicional | 0,13(a) | 0,24(ab) | 0,35(b) | 0,36(b)  | 0,40(a) | 0,39(a) |
| 100 ppm | Tradicional | 0,13(a) | 0,25(b)  | 0,34(b) | 0,34(ab) | 0,39(a) | 0,36(a) |
| 100 ppm | Artesanal   | 0,33(b) | 0,44(c)  | 0,48(c) | 0,47(c)  | 0,56(b) | 0,68(b) |
| 50 ppm  | Artesanal   | 0,34(b) | 0,45(c)  | 0,50(c) | 0,51(c)  | 0,58(b) | 0,63(b) |
| 200 ppm | Artesanal   | 0,34(b) | 0,47(c)  | 0,50(c) | 0,47(c)  | 0,57(b) | 0,67(b) |

En la tabla 46 se muestra la interacción A\*C de la variable acidez de las cuales se obtuvo diferencia significativa en los siguientes días:

En el día 1 se obtuvo una acidez mayor en las interacciones pertenecientes al grupo c: en la interacción 100 ppm\*procedencia artesanal (0,44%), 50 ppm\* procedencia artesanal (0,45%) y 200 ppm\*procedencia artesanal (0,47%). Por otro lado, el valor menor de acidez se obtuvo en el grupo a correspondiente a la interacción 50 ppm\* procedencia tradicional (0,20%)

En el día 2 se obtuvo una acidez mayor en las interacciones correspondientes al grupo c: en la interacción 100 ppm\*procedencia artesanal (0,48%), 50 ppm\* procedencia artesanal y 200 ppm\* procedencia artesanal (0,50%). Por otro lado, el valor menor de acidez se obtuvo en el grupo a correspondiente a la interacción 50 ppm\*procedencia tradicional (0,27%).

En el día 3 se obtuvo una acidez mayor en las interacciones correspondientes al grupo c: en la interacción 100 ppm\*procedencia artesanal y 200 ppm\*procedencia artesanal (0,47%), 50 ppm\*procedencia artesanal (0,51%). Por otro lado, el valor menor de acidez se obtuvo en el grupo a correspondiente a la interacción 50 ppm\*procedencia tradicional (0,30%).

En el día 4 se obtuvo una acidez mayor en las interacciones correspondientes al grupo b: 100 ppm\*procedencia artesanal (0,56%), 200 ppm\*procedencia artesanal (0,57%), 50 ppm\*procedencia artesanal (0,58%). Por otro lado, el valor menor de acidez se obtuvo en el grupo a correspondiente a los grupos: 50 ppm\*procedencia tradicional (0,35%), 100 ppm\*procedencia tradicional (0,39%) y 200 ppm\* procedencia tradicional (0,40%).

Con respecto a los días 0 y 7 no existió diferencia significativa.

**Tabla 47**

*Pruebas de significancia (Tukey) de UFC de interacción AxC  
(concentración/procedencia)*

| Concentración | Procedencia | BACTERIAS    |              | LEVADURAS    | Y HONGOS     |
|---------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|               |             | Día 0        | Día 7        | Día 0        | Día 7        |
| 100 ppm       | Artesanal   | 1,61E+09(d)  | 1,86E+07(a)  | 1,33E+11(b)  | 1,04E+09 (e) |
| 50 ppm        | Artesanal   | 1,59E+09(cd) | 2,98E+07(c)  | 1,13E+11(ab) | 7,28E+07 (a) |
| 200 ppm       | Artesanal   | 1,35E+09(c)  | 1,76E+07 (a) | 9,24E+10(ab) | 8,02E+08 (d) |
| 50 ppm        | Tradicional | 3,88E+08(b)  | 5,28E+07(d)  | 1,30E+11(b)  | 7,62E+08 (c) |
| 200 ppm       | Tradicional | 4,7E+08(b)   | 5,43E+07(d)  | 7,93E+10(ab) | 5,80E+08 (b) |
| 100 ppm       | Tradicional | 3,5E+07(a)   | 2,23E+07(b)  | 3,44E+10(a)  | 1,64E+09 (f) |

La tabla 47 indica la interacción A\*C (concentración-procedencia) de las UFC/mL de bacterias, levaduras y hongos de las cuales se obtuvo diferencia significativa en los siguientes días:

Respecto al día 0 en la UFC/mL de bacterias, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de 1,61E+09 (grupo d) en la interacción entre una concentración de nisina de 100 ppm y la procedencia artesanal, frente a la interacción entre la concentración de nisina de 100 ppm y procedencia tradicional con una cantidad de población microbiana/mL de 3,5E+07 (grupo a) siendo este el valor más bajo de microorganismos/mL.

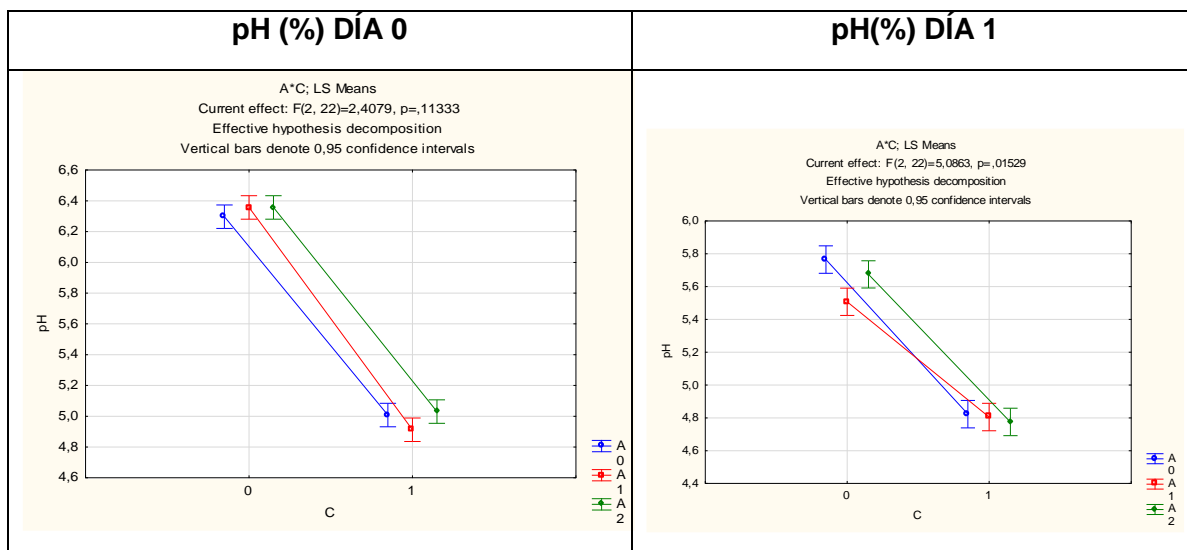
En la UFC/mL de levaduras y hongos, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de 1,33E+11 (grupo b) en la interacción entre la concentración de nisina de 100 ppm- procedencia artesanal; por otro lado, hubo una menor cantidad de población microbiana/mL de 3,44E+10 (grupo a) en la interacción entre la concentración de nisina de 100 ppm y procedencia tradicional.

En el día 7 en la UFC/mL de bacterias, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de  $5,43E+07$  (grupo d) en la interacción entre la concentración de nisina de 200 ppm y procedencia tradicional, frente a la población microbiana de  $1,76E+07$ (grupo a), de la interacción entre la concentración de 200 ppm y procedencia artesanal, el cual indicó el valor más bajo de microorganismos/mL.

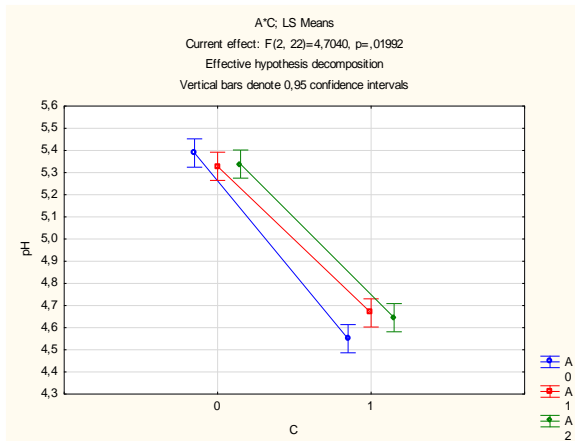
En la UFC/mL de levaduras y hongos, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de  $1,64E+09$  (grupo f) en la interacción entre la concentración de nisina de 100 ppm y procedencia tradicional; por otro lado, se encontró una menor cantidad de población microbiana/mL de  $7,28E+07$  (grupo a) en la interacción entre la concentración de 50 ppm y procedencia artesanal.

**Figura 19**

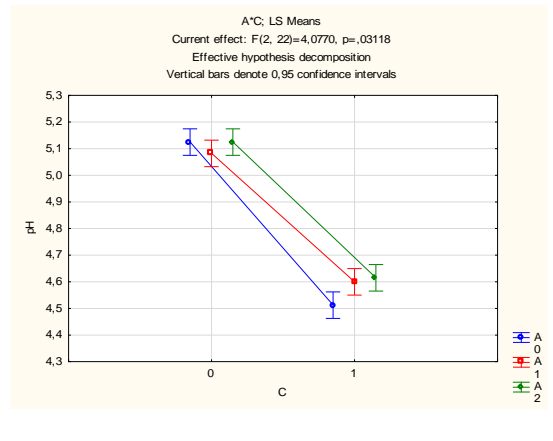
*Resumen de resultados de pH de interacción Ax C (concentración/procedencia), para prueba de significancia de Tukey*



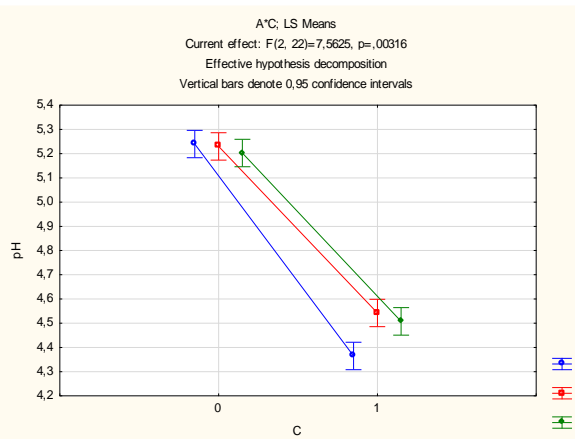
**pH(%) DÍA 2**



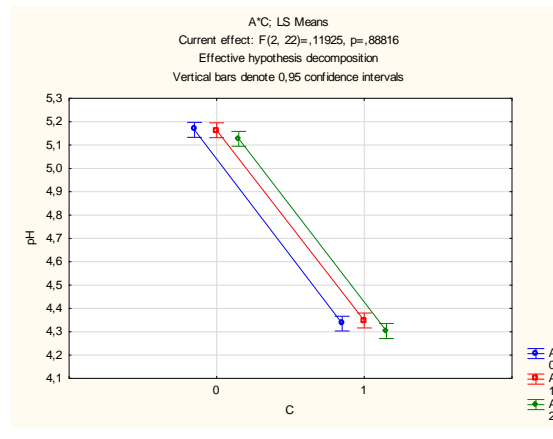
**pH(%) DÍA 3**



**pH(%) DÍA 4**



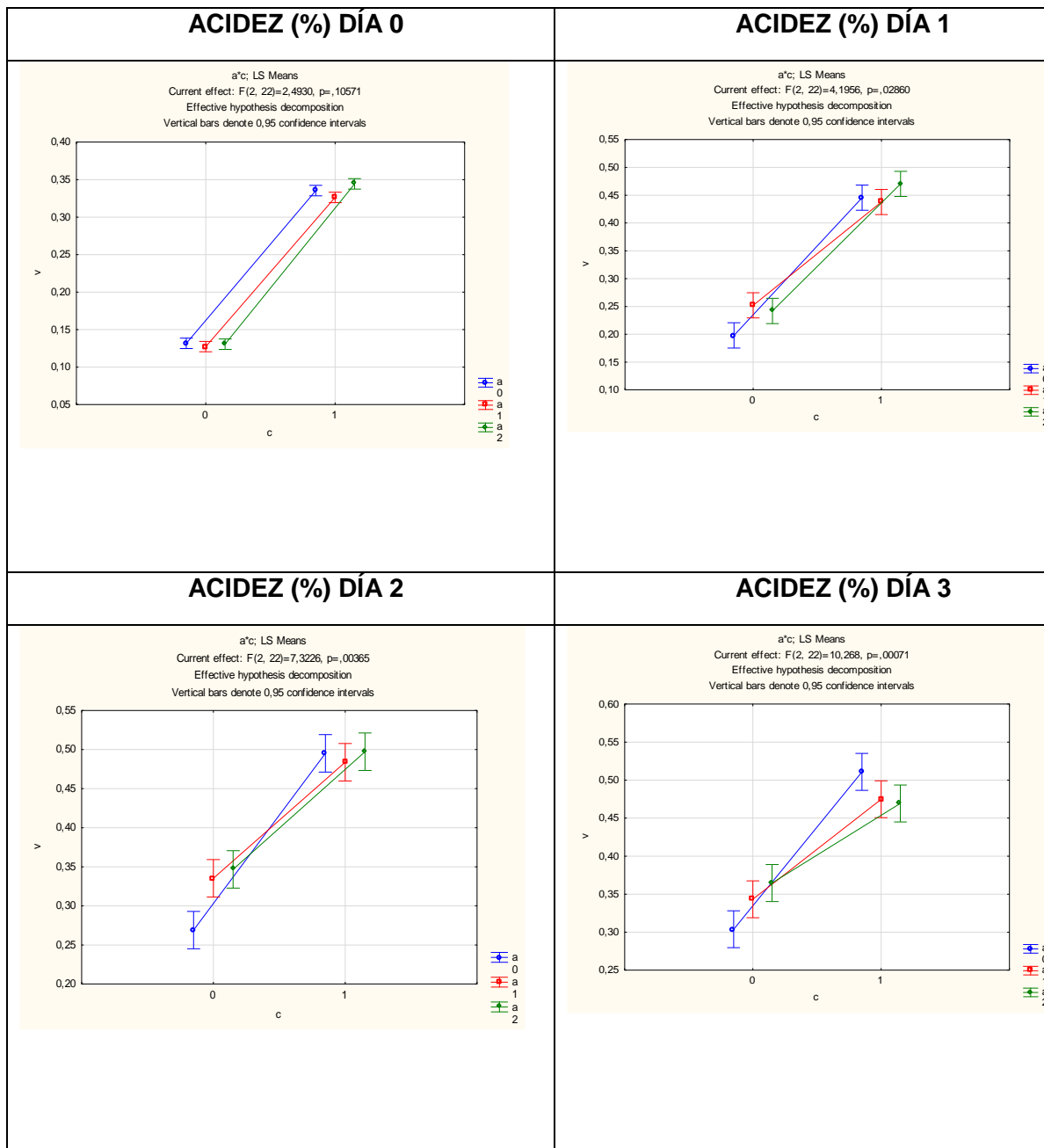
**pH(%) DÍA 7**

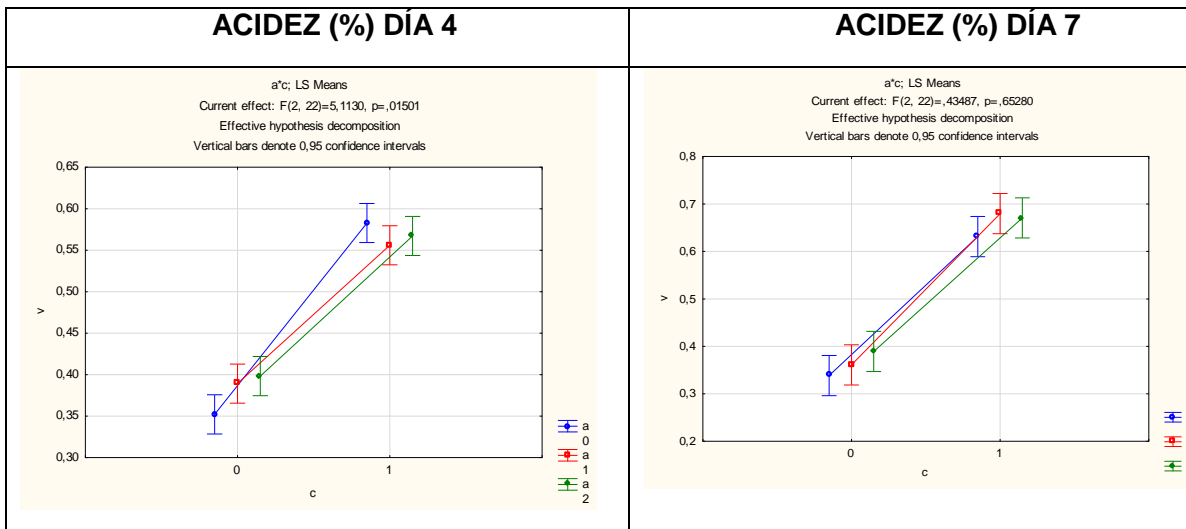




**Figura 20**

*Resumen de resultados de pH de interacción Ax C (concentración/procedencia), para prueba de significancia de Tukey*



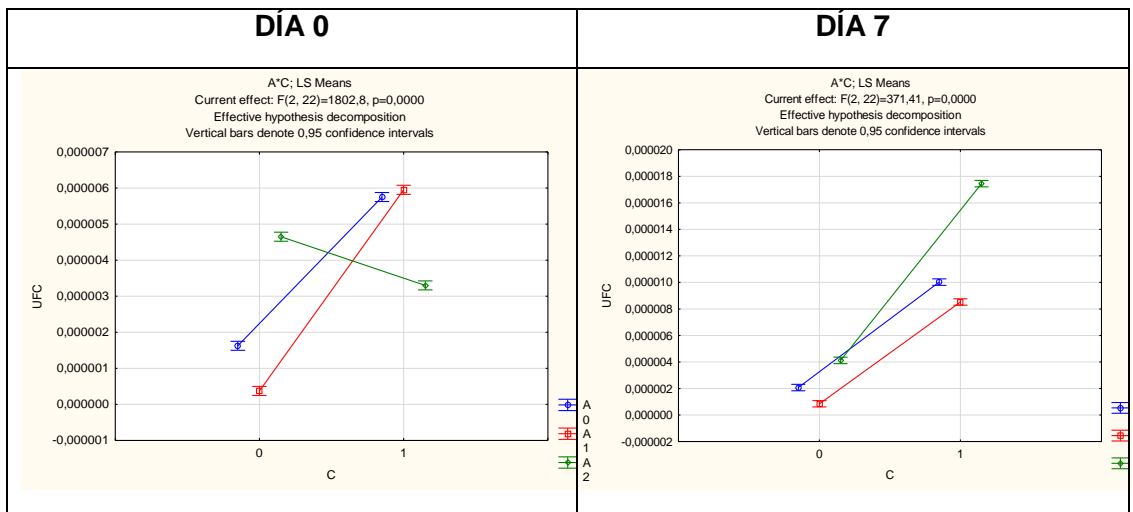


**Figura 21**

*Resumen de resultados de bacterias de interacción AxC*

*(concentración/procedencia), para prueba de significancia de Tukey*

**BACTERIAS**

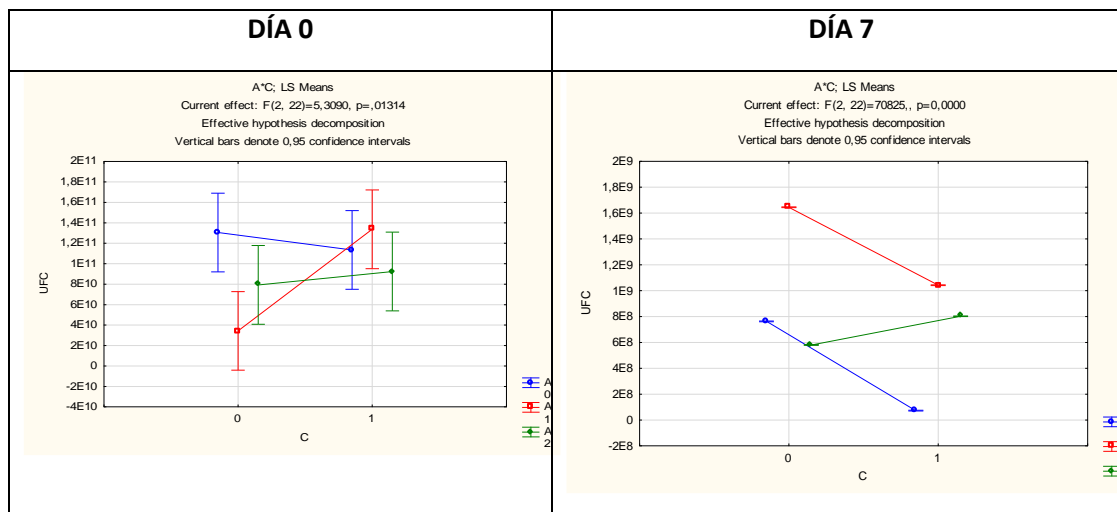


**Figura 22**

*Resumen de resultados de Hongos y levaduras de interacción AxC*

*(concentración/procedencia) de bacterias, para prueba de significancia de Tukey*

## LEVADURA Y HONGOS



### Prueba de significancia de Tukey de pH de la interacción BxC

(temperatura/procedencia) del estudio de distintas concentraciones de nisina aplicadas en suero lácteo, con diferente temperatura y procedencia.

Tabla 48

. Pruebas de significancia (Tukey) de pH de interacción BxC

(temperatura/procedencia)

| Temp.         | Procedencia | Día 0    | Día 1    | Día 2    | Día 3    | Día 4    | Día 7    |
|---------------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| T. ambiente   | Artesanal   | 4,85 (a) | 4,43 (a) | 4,12 (a) | 4,08 (a) | 3,95 (a) | 3,73 (a) |
| Refrigeración | Artesanal   | 5,12 (b) | 5,17 (c) | 5,12 (c) | 5,07 (b) | 4,99 (c) | 4,93 (c) |
| Refrigeración | Tradicional | 6,30 (c) | 6,43 (d) | 6,46 (d) | 6,06 (c) | 6,39 (d) | 6,08 (d) |
| T.ambiente    | Tradicional | 6,38 (c) | 4,87 (b) | 4,25 (b) | 4,16 (a) | 4,05 (b) | 4,23 (b) |

En la tabla 48 se muestra la interacción B\*C de la variable pH de las cuales se obtuvo diferencia significativa en los siguientes días:

Día 0 se obtuvo el mayor valor de pH en la interacción entre Temperatura ambiente y procedencia tradicional con 6,38 (grupo c) y el menor valor con la

interacción entre temperatura ambiente y procedencia artesanal con 4,85 (grupo a).

Día 1 se encontró un valor alto de pH en interacciones entre Temperatura de refrigeración y procedencia tradicional con 6,43 (grupo d), frente al menor valor de pH presente en la interacción entre temperatura ambiente y procedencia artesanal con 4,43 (grupo a).

Día 2 se obtuvo un valor alto de pH en la interacción entre temperatura de refrigeración y procedencia tradicional con 6,46 (grupo d), frente al menor valor de pH presente en la interacción entre temperatura ambiente y procedencia artesanal con 4,12 (grupo a).

Día 3 se encontró un valor alto de pH en la interacción entre temperatura de refrigeración y procedencia tradicional con 6,06 (grupo c), mientras que se obtuvo el menor valor de pH en la interacción temperatura ambiente y procedencia artesanal con 4,08 (grupo a).

Día 4 se obtuvo un valor mayor de pH presente en la interacción entre temperatura de refrigeración y procedencia tradicional con 6,39 (grupo d), frente a un menor valor de pH presente en la interacción entre temperatura ambiente y procedencia artesanal con 3,95 (grupo a).

Día 7 se encontró un valor alto de pH en la interacción entre temperatura de refrigeración y procedencia tradicional con 6,08 (grupo d), frente a un menor valor de pH presente en la interacción entre temperatura ambiente y procedencia artesanal con 3,73 (grupo a).

**Tabla 49**

*Pruebas de significancia (Tukey) de acidez titulable de interacción  
BxC(temperatura/procedencia)*

| Temp.         | Procedencia | Día 0    | Día 1   | Día 2   | Día 3   | Día 4   | Día 7   |
|---------------|-------------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Refrigeración | Tradicional | 0,13 (a) | 0,15(a) | 0,14(a) | 0,13(a) | 0,14(a) | 0,14(a) |
| T.ambiente    | Tradicional | 0,13 (a) | 0,31(b) | 0,50(c) | 0,54(c) | 0,62(c) | 0,59(c) |
| Refrigeración | Artesanal   | 0,32 (b) | 0,32(b) | 0,36(b) | 0,33(b) | 0,38(b) | 0,35(b) |
| T.ambiente    | Artesanal   | 0,35 (c) | 0,58(c) | 0,63(d) | 0,64(d) | 0,76(d) | 0,97(d) |

En la tabla 49 se muestra la interacción B\*C de la variable acidez de las cuales se obtuvo diferencia significativa en los siguientes días:

En el día 0 se encontró un valor mayor de acidez en el grupo c correspondiente a la interacción temperatura ambiente\*procedencia artesanal (0,35%) y un valor menor de acidez en las interacciones del grupo a: temperatura de refrigeración\*procedencia tradicional y temperatura ambiente\*procedencia tradicional (0,13%).

En el día 1 se encontró un valor mayor de acidez en el grupo c correspondiente a la interacción temperatura ambiente\*procedencia artesanal (0,58%) y un valor menor de acidez en la interacción del grupo a: temperatura de refrigeración\*procedencia tradicional (0,15%).

En el día 2 se encontró un valor mayor de acidez en el grupo d correspondiente a la interacción temperatura ambiente\*procedencia artesanal (0,63%) y un valor menor de acidez en la interacción temperatura de refrigeración\*procedencia tradicional (0,14%, grupo a).

En el día 3 se encontró un valor mayor de acidez en el grupo d correspondiente a la interacción temperatura ambiente\*procedencia artesanal

(0,64%) y un valor menor de acidez en la interacción de temperatura de refrigeración\*procedencia tradicional (0,13%, grupo a).

En el día 4 se encontró un valor mayor de acidez en el grupo d correspondiente a la interacción temperatura ambiente\*procedencia artesanal (0,76%) y un valor menor de acidez en la interacción de temperatura de refrigeración\*procedencia tradicional (0,14%).

En el día 7 se encontró un valor mayor de acidez en el grupo d correspondiente a la interacción temperatura ambiente\*procedencia artesanal (0,97%) y un valor menor de acidez en la interacción de temperatura de refrigeración\*procedencia tradicional (0,14%, grupo a).

#### Tabla 50

*Pruebas de significancia (Tukey) de UFC de interacción BxC (temperatura/procedencia)*

| Temperatura     | Procedencia | BACTERIAS   |              | LEVADURAS    | Y HONGOS     |
|-----------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
|                 |             | Día 0       | Día 7        | Día 0        | Día 7        |
| T. ambiente     | Artesanal   | 1,76E+09(c) | 2,62E+07 (c) | 2,08E+11(c)  | 1,04E+09 (c) |
| T.refrigeración | Artesanal   | 1,28E+09(b) | 1,78E+07 (a) | 1,86E+10(a)  | 2,31E+08 (a) |
| T.refrigeración | Tradicional | 3,47E+08(a) | 2,25E+07 (b) | 4,91E+10 (a) | 2,52E+08 (b) |
| T.ambiente      | Tradicional | 2,48E+08(a) | 6,37E+07 (d) | 1,14E+11 (b) | 1,73E+09 (d) |

La tabla 50 indica la interacción B\*C (temperatura-procedencia) de las UFC/mL de bacterias, levaduras y hongos de las cuales se obtuvo diferencia significativa en los siguientes días:

Respecto al día 0 en la UFC/mL de bacterias, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de 1,76E+09 (grupo c) en la interacción entre la temperatura ambiente y la procedencia artesanal,

frente a la interacción entre la temperatura ambiente y procedencia tradicional con una cantidad de población microbiana/mL de  $2,48E+08$  (grupo a) siendo este el valor más bajo de microorganismos/mL.

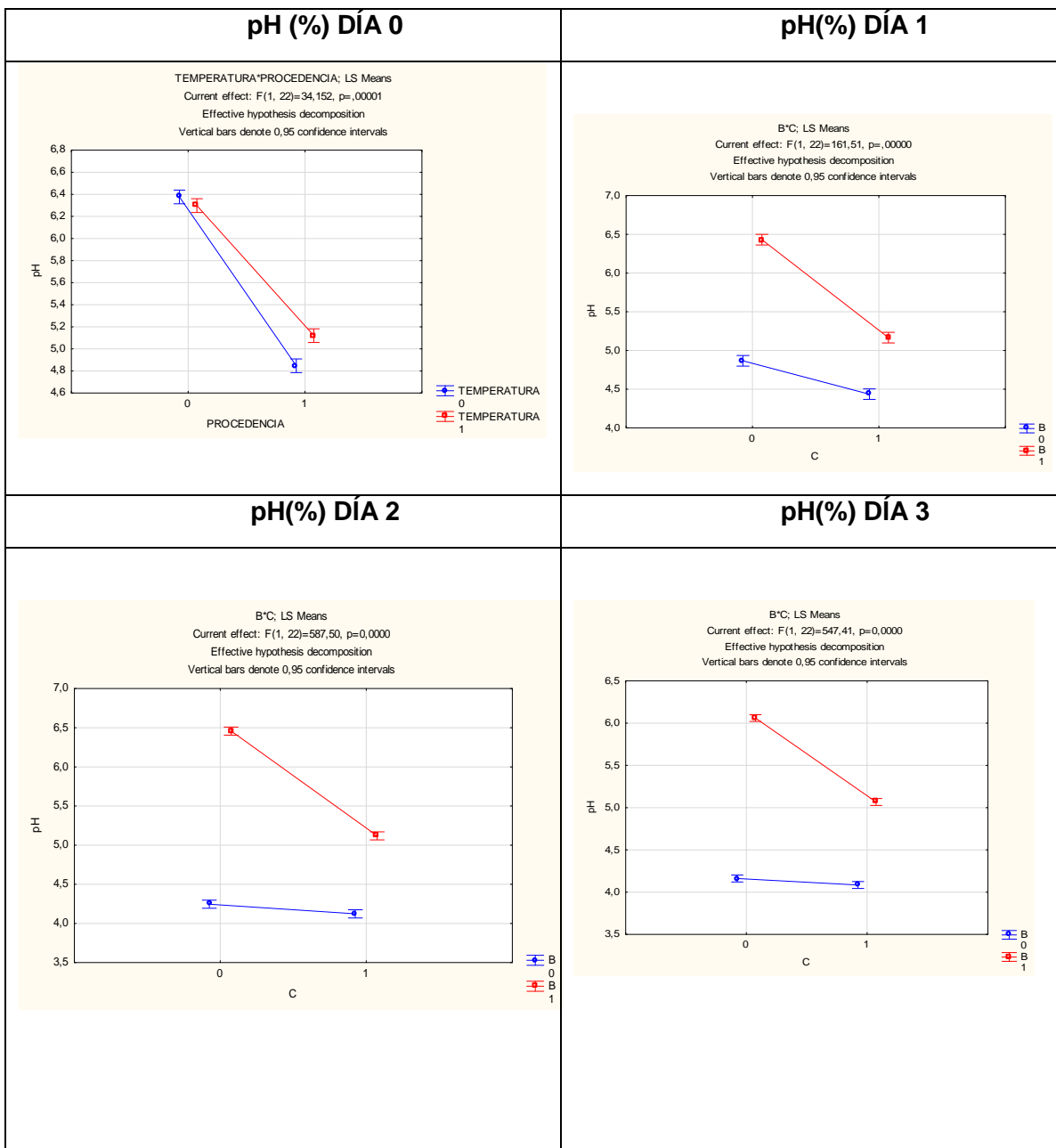
En la UFC/mL de levaduras y hongos, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de  $2,08E+11$  (grupo c) en la interacción entre temperatura ambiente y la procedencia artesanal; por otro lado, hubo una menor cantidad de población microbiana de  $1,86E+10$  (grupo a) en la interacción entre temperatura de refrigeración y procedencia artesanal.

En el día 7 en la UFC/mL de bacterias, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de  $6,37E+07$  (grupo d) en la interacción entre la temperatura ambiente y procedencia tradicional, frente a la población microbiana de  $1,78E+07$  (grupo a), de la interacción entre la temperatura de refrigeración y procedencia artesanal, el cual indicó el valor más bajo de microorganismos/mL.

En la UFC/mL de levaduras y hongos, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de  $1,73E+09$  (grupo d) en la interacción entre la temperatura ambiente y procedencia tradicional; por otro lado, se encontró una menor cantidad de población microbiana de  $2,31E+08$  (grupo a) en la interacción entre la temperatura de refrigeración y procedencia artesanal.

**Figura 23**

*Resumen de resultados de pH de interacción BxC (temperatura/procedencia)*





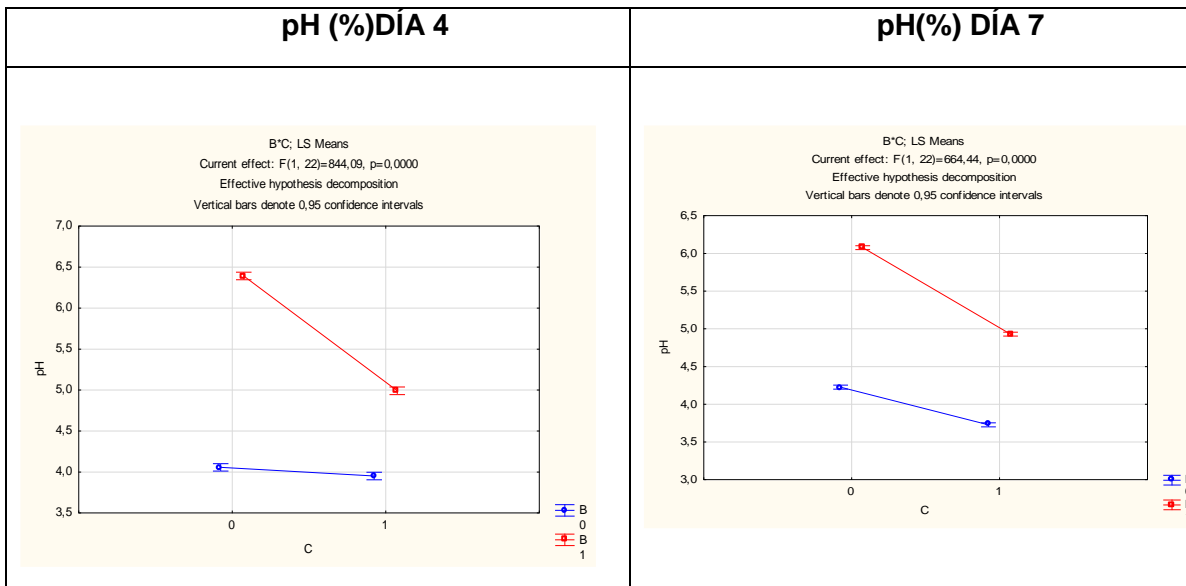
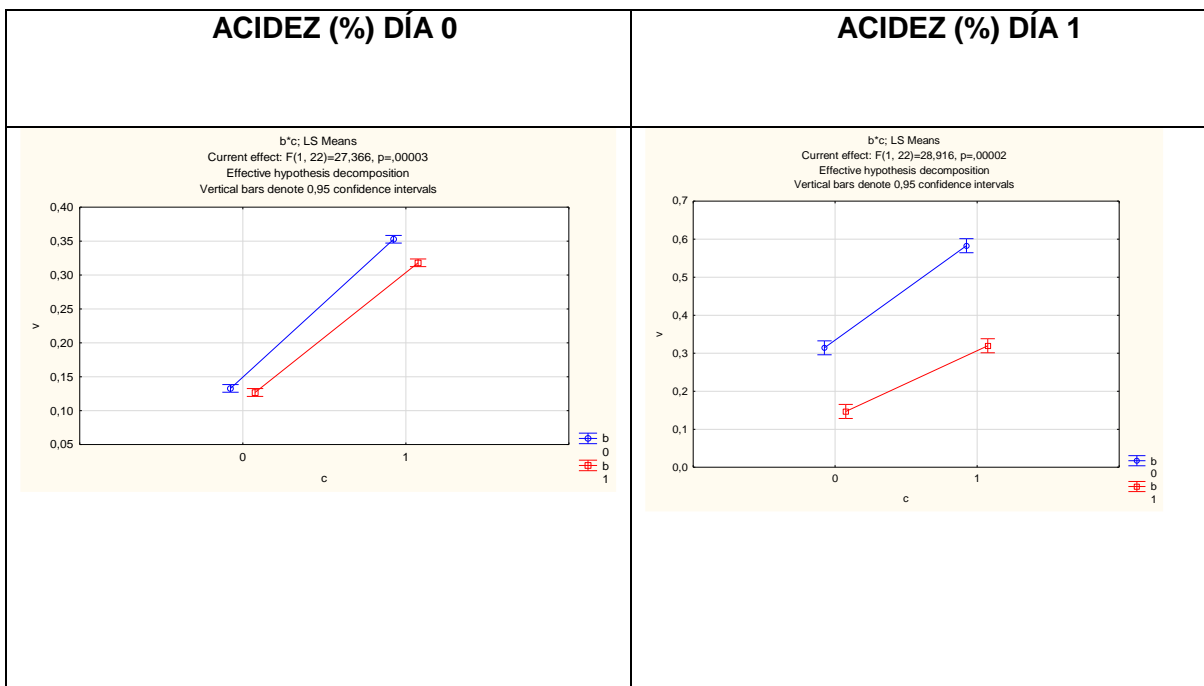
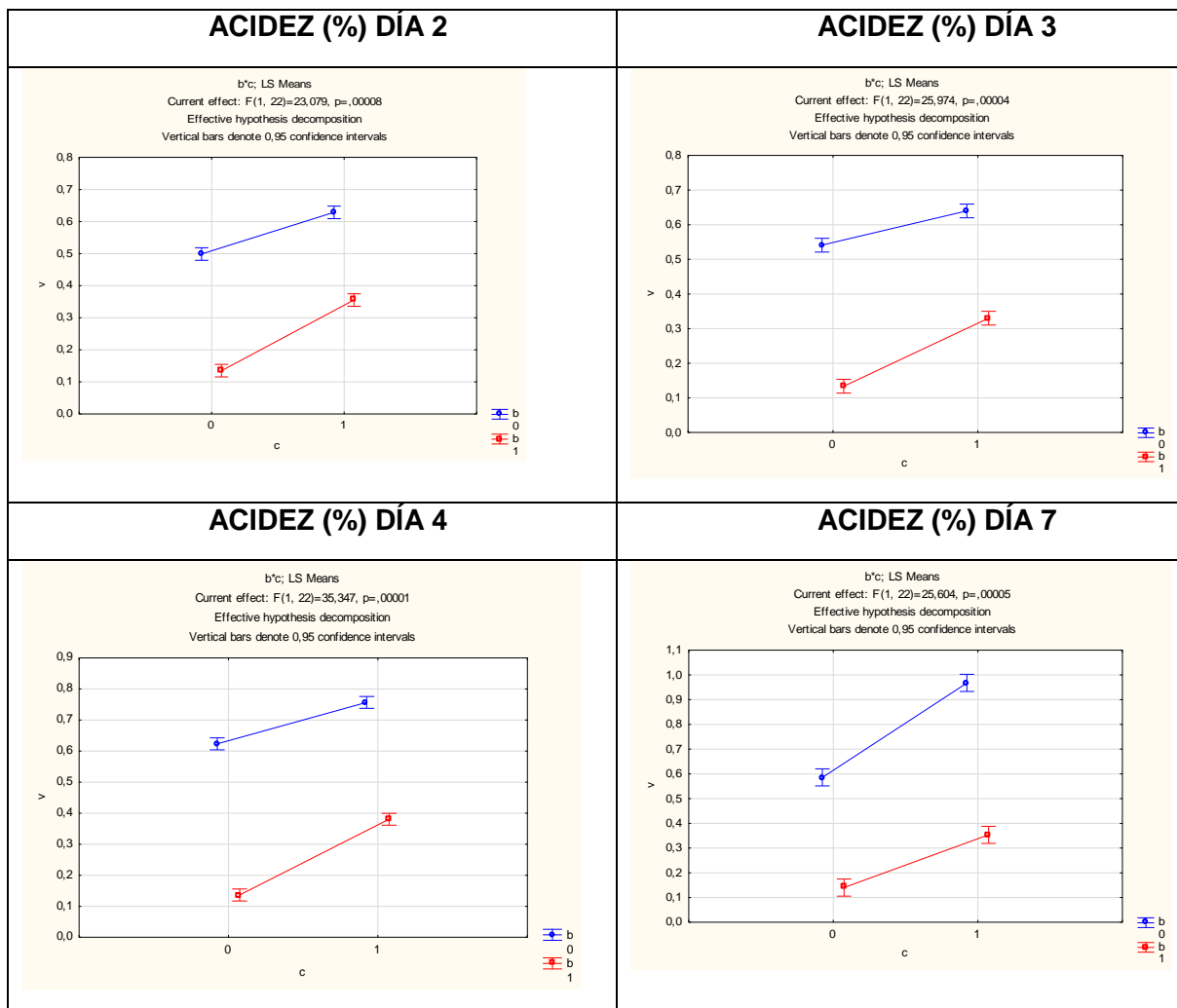


Figura 24

Resumen de resultados de acidez de interacción BxC (temperatura/procedencia)

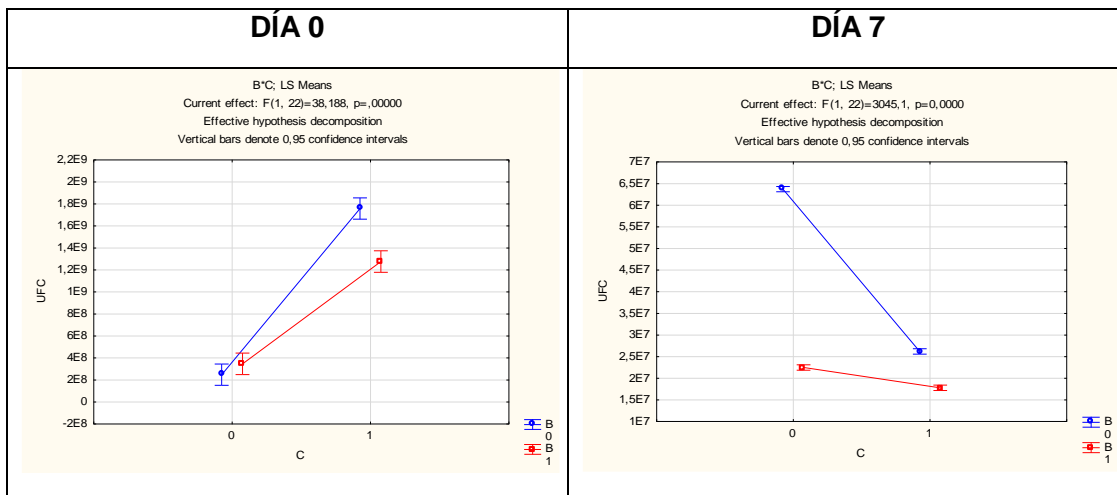




**Figura 25**

*Resumen de resultados de la interacción BxC (temperatura/procedencia) de bacterias, para prueba de significancia de Tukey*

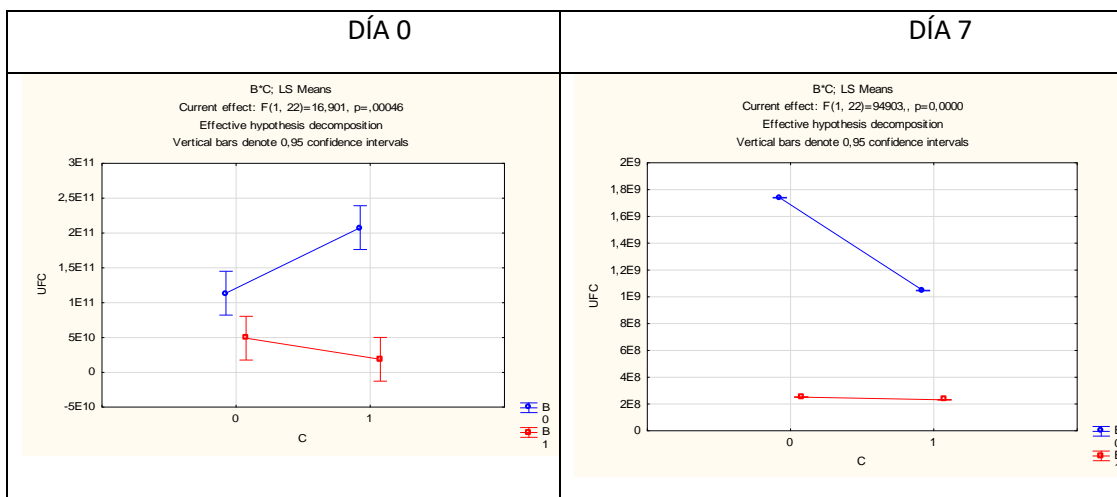
### BACTERIAS



**Figura 26**

*Resumen de resultados de la interacción BxC (temperatura/procedencia) de Levaduras y hongos, para prueba de significancia de Tukey*

### LEVADURAS Y HONGOS



**Prueba de significancia de Tukey de pH de la interacción AxBxC  
(concentración/temperatura/procedencia) del estudio de distintas  
concentraciones de nisina aplicadas en suero lácteo, con diferente  
temperatura y procedencia.**

**Tabla 51**

*Pruebas de significancia (Tukey) de pH de interacción  
AxBxC(concentración/temperatura/procedencia)*

| Conc.   | Temperatura   | Procedencia | Día 0      | Día 1    | Día 2     | Día 3     | Día 4    | Día 7     |
|---------|---------------|-------------|------------|----------|-----------|-----------|----------|-----------|
| 100 ppm | T. ambiente   | Artesanal   | 4,74 (a)   | 4,44 (a) | 4,15 (ab) | 4,09 (ab) | 3,97 (a) | 3,70 (a)  |
| 200 ppm | T. ambiente   | Artesanal   | 4,86 (ab)  | 4,41 (a) | 4,13 (ab) | 4,12 (ab) | 3,95 (a) | 3,71 (a)  |
| 50 ppm  | T. ambiente   | Artesanal   | 4,94 (abc) | 4,46 (a) | 4,09 (a)  | 4,05 (a)  | 3,94 (a) | 3,77 (a)  |
| 50 ppm  | Refrigeración | Artesanal   | 5,07 (bc)  | 5,19 (b) | 5,01 (c)  | 4,98 (c)  | 4,79 (b) | 4,90 (d)  |
| 100 ppm | Refrigeración | Artesanal   | 5,09 (bc)  | 5,17 (b) | 5,19 (c)  | 5,11 (c)  | 5,12 (c) | 5,00 (d)  |
| 200 ppm | Refrigeración | Artesanal   | 5,20 (c)   | 5,15 (b) | 5,16 (c)  | 5,11 (c)  | 5,07 (c) | 4,89 (d)  |
| 50 ppm  | Refrigeración | Tradicional | 6,26 (d)   | 6,45 (c) | 6,45 (d)  | 5,99 (d)  | 6,38 (d) | 6,01 (e)  |
| 200 ppm | Refrigeración | Tradicional | 6,32 (d)   | 6,41 (c) | 6,44 (d)  | 6,11 (d)  | 6,36 (d) | 6,09 (ef) |
| 100 ppm | Refrigeración | Tradicional | 6,32 (d)   | 6,44 (c) | 6,49 (d)  | 6,08 (d)  | 6,44 (d) | 6,13 (f)  |
| 50 ppm  | T. ambiente   | Tradicional | 6,33 (d)   | 5,09 (b) | 4,33 (b)  | 4,26 (b)  | 4,10 (a) | 4,32 (c)  |
| 100 ppm | T. ambiente   | Tradicional | 6,40 (d)   | 4,57 (a) | 4,17 (ab) | 4,09 (ab) | 4,03 (a) | 4,20 (b)  |
| 200 ppm | T. ambiente   | Tradicional | 6,40 (d)   | 4,94 (b) | 4,23 (ab) | 4,12 (ab) | 4,05 (a) | 4,16 (b)  |

En la tabla 51 se muestra la interacción A\*B\*C de la variable pH de las cuales se obtuvo diferencia significativa en los siguientes días:

Día 0 se obtuvo el mayor valor de pH en la interacción entre concentración 100 ppm, Temperatura ambiente y procedencia tradicional y concentración 200 ppm, temperatura ambiente y procedencia tradicional con 6,40 (grupo d) ambas y el menor valor con la interacción entre concentración 100 ppm, temperatura ambiente y procedencia artesanal con 4,74 (grupo a).

Día 1 se encontró un valor alto de pH en interacciones entre concentración 50 ppm, temperatura de refrigeración y procedencia tradicional con 6,45 (grupo c), frente al menor valor de pH presente en la interacción entre

concentración 200 ppm, temperatura ambiente y procedencia artesanal con 4,41 (grupo a).

Día 2 se obtuvo un valor alto de pH en la interacción entre concentración 100 ppm temperatura de refrigeración y procedencia tradicional con 6,49 (grupo d), frente al menor valor de pH presente en la interacción entre concentración 50 ppm temperatura ambiente y procedencia artesanal con 4,09 (grupo a).

Día 3 se encontró un valor alto de pH en la interacción entre concentración 200 ppm temperatura de refrigeración y procedencia tradicional con 6,11 (grupo d), mientras que se obtuvo el menor valor de pH en la interacción concentración 50 ppm, temperatura ambiente y procedencia artesanal con 4,05 (grupo a).

Día 4 se obtuvo un valor mayor de pH presente en la interacción entre concentración 100 ppm, temperatura de refrigeración y procedencia tradicional con 6,44 (grupo d), frente a un menor valor de pH presente en la interacción entre concentración 50 ppm. temperatura ambiente y procedencia artesanal con 3,94 (grupo a).

Día 7 se encontró un valor alto de pH en la interacción entre concentración 100 ppm, temperatura de refrigeración y procedencia tradicional con 6,13 (grupo f), frente a un menor valor de pH presente en la interacción entre concentración 100 ppm, temperatura ambiente y procedencia artesanal con 3,70 (grupo a).

**Tabla 52**

*Pruebas de significancia (Tukey) de acidez titulable de interacción AxBxC  
(concentración/temperatura/procedencia).*

| Conc.   | Temperatura   | Procedencia | Día 0    | Día 1    | Día 2    | Día 3    | Día 4   | Día 7   |
|---------|---------------|-------------|----------|----------|----------|----------|---------|---------|
| 100 ppm | Refrigeración | Tradicional | 0,12(a)  | 0,14(a)  | 0,14(a)  | 0,14(a)  | 0,14(a) | 0,14(a) |
| 50 ppm  | Refrigeración | Tradicional | 0,13(a)  | 0,15(a)  | 0,12(a)  | 0,12(a)  | 0,13(a) | 0,14(a) |
| 200 ppm | Refrigeración | Tradicional | 0,13(a)  | 0,15(a)  | 0,14(a)  | 0,14(a)  | 0,14(a) | 0,15(a) |
| 100 ppm | T.ambiente    | Tradicional | 0,13(a)  | 0,37(c)  | 0,53(c)  | 0,55(cd) | 0,63(c) | 0,59(c) |
| 200 ppm | T.ambiente    | Tradicional | 0,13(a)  | 0,33(c)  | 0,55(cd) | 0,59(d)  | 0,66(c) | 0,63(c) |
| 50 ppm  | T.ambiente    | Tradicional | 0,14(a)  | 0,24(b)  | 0,42(b)  | 0,49(c)  | 0,58(c) | 0,54(c) |
| 100 ppm | Refrigeración | Artesanal   | 0,30(b)  | 0,30(bc) | 0,34(b)  | 0,33(b)  | 0,37(b) | 0,34(b) |
| 200 ppm | Refrigeración | Artesanal   | 0,32(c)  | 0,34(c)  | 0,36(b)  | 0,33(b)  | 0,37(b) | 0,37(b) |
| 50 ppm  | Refrigeración | Artesanal   | 0,33(cd) | 0,32(bc) | 0,36(b)  | 0,33(b)  | 0,40(b) | 0,35(b) |
| 50 ppm  | T. ambiente   | Artesanal   | 0,34(cd) | 0,57(d)  | 0,63(d)  | 0,69(e)  | 0,77(d) | 0,91(d) |
| 100 ppm | T. ambiente   | Artesanal   | 0,36(de) | 0,57(d)  | 0,63(d)  | 0,62(de) | 0,75(d) | 1,02(d) |
| 200 ppm | T. ambiente   | Artesanal   | 0,36(e)  | 0,60(d)  | 0,63(d)  | 0,61(de) | 0,76(d) | 0,97(d) |

En la tabla 52 se muestra la interacción A\*B\*C de la variable acidez de las cuales se obtuvo diferencia significativa en los siguientes días:

En el día 0 se obtuvo un alto valor en la interacción 200 ppm\*temperatura ambiente\*procedencia artesanal de 036% correspondiente al grupo e. Por otro lado, los valores menores de acidez los atribuyó el grupo a: 100 ppm\*temperatura de refrigeración\*procedencia tradicional (0,12%), 50 ppm\*temperatura de refrigeración\*procedencia tradicional (0,13%), 200 ppm\*temperatura de refrigeración\*procedencia tradicional (0,13%), 50 ppm\*temperatura ambiente\*procedencia tradicional (0,14%), 100 ppm\*temperatura ambiente\*procedencia tradicional (0,13%), 200 ppm\*temperatura ambiente\*procedencia tradicional (0,13%).

En el día 1 se obtuvo un alto valor de acidez en las interacciones correspondientes al grupo d: 50 ppm\*temperatura ambiente\*procedencia artesanal (0,57%), 100 ppm\*temperatura ambiente\*procedencia artesanal (0,57%), 200 ppm\*temperatura ambiente\*procedencia artesanal (0,60%). Por otro lado, los valores menores de acidez los atribuyó el grupo a: 50 ppm\*temperatura de refrigeración\*procedencia tradicional (0,15%), 100 ppm\*temperatura de refrigeración\*procedencia tradicional (0,14%) y 200 ppm\*temperatura de refrigeración\*procedencia tradicional (0,15%).

En el día 2 se obtuvo un alto valor de acidez en las interacciones correspondientes al grupo d: 50 ppm\*temperatura ambiente\*procedencia artesanal (0,63%), 100 ppm\*temperatura ambiente\*procedencia artesanal (0,63%), 200 ppm\*temperatura ambiente\*procedencia artesanal (0,63%). Por otro lado, los valores menores de acidez los atribuyó el grupo a: 50 ppm\*temperatura de refrigeración\*procedencia tradicional (0,12%), 100 ppm\*temperatura de refrigeración\*procedencia tradicional (0,14%) y 200 ppm\*temperatura de refrigeración\*procedencia tradicional (0,14%).

En el día 3 se obtuvo un alto valor de acidez en la interacción correspondiente al grupo e: 50 ppm\*temperatura ambiente\*procedencia artesanal (0,69%). Por otro lado, los valores menores de acidez los atribuyó el grupo a: 50 ppm\*temperatura de refrigeración\*procedencia tradicional (0,12%), 100 ppm\*temperatura de refrigeración\*procedencia tradicional (0,14%) y 200 ppm\*temperatura de refrigeración\*procedencia tradicional (0,14%).

**Tabla 53**

*Pruebas de significancia (Tukey) de UFC de interacción*

*AxBxC(concentración/temperatura/procedencia)*

| Conc.   | Temperatura     | Procedencia | BACTERIAS     |              | LEVADURAS     | Y HONGOS     |
|---------|-----------------|-------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
|         |                 |             | Día 0         | Día 7        | Día 0         | Día 7        |
| 100 ppm | T. ambiente     | Artesanal   | 1,18E+09(d)   | 1,67E+07(ab) | 2,49E+11 (c)  | 1,99E+09 (i) |
| 200 ppm | T. ambiente     | Artesanal   | 2,05E+09(e)   | 1,80E+07(bc) | 1,58E+11(bc)  | 1,03E+09(g)  |
| 50 ppm  | T. ambiente     | Artesanal   | 2,05E+09(e)   | 4,40E+07(f)  | 2,16E+11 (c)  | 1,11E+08(d)  |
| 50 ppm  | T.refrigeración | Artesanal   | 1,13E+09(d)   | 1,56E+07(ab) | 1,09E+10(a)   | 3,50E+07(a)  |
| 100 ppm | T.refrigeración | Artesanal   | 2,05E+09(e)   | 2,05E+07(c)  | 1,81E+10(a)   | 9,00E+07(c)  |
| 200 ppm | T.refrigeración | Artesanal   | 6,45E+08(c)   | 1,73E+07 (b) | 2,71E+10(ab)  | 5,70E+08(e)  |
| 50 ppm  | T.refrigeración | Tradicional | 6,0E+08(c)    | 3,55E+07(e)  | 1,37E+11(abc) | 8,00E+07(b)  |
| 200 ppm | T.refrigeración | Tradicional | 4,25E+08(abc) | 1,75E+07(b)  | 5,01E+09(a)   | 5,90E+08 (f) |
| 100 ppm | T.refrigeración | Tradicional | 1,50E+07(a)   | 1,45E+07(a)  | 4,95E+09(a)   | 8,50E+07(bc) |
| 50 ppm  | T. ambiente     | Tradicional | 1,8E+08(ab)   | 7,01E+07(g)  | 1,24E+11(abc) | 1,45E+09(h)  |
| 100 ppm | T. ambiente     | Tradicional | 5,5E+07(a)    | 3,01E+07(d)  | 6,37E+10(ab)  | 3,20E+09 (j) |
| 200 ppm | T. ambiente     | Tradicional | 5,2E+08(bc)   | 9,10E+07(h)  | 1,54E+11 (bc) | 5,70E+08(e)  |

La tabla 53 indica la interacción A\*B\*C (concentración de nisina-temperatura-procedencia) de las UFC/mL de bacterias, levaduras y hongos de las cuales se obtuvo diferencia significativa en los siguientes días:

Respecto al día 0 en la UFC/mL de bacterias, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de 2,05E+09 (grupo e) en la interacción entre concentración de nisina de 200 ppm, temperatura ambiente y procedencia artesanal, concentración de nisina de 50 ppm, temperatura ambiente y procedencia artesanal y concentración de nisina de 100 ppm, temperatura de refrigeración y procedencia artesanal frente a la interacción entre la concentración de nisina de 100 ppm, temperatura e refrigeración y procedencia tradicional con una cantidad de población microbiana de 1,5E-07 (grupo a) siendo este el valor más bajo de microorganismos/mL.

En la UFC/mL de levaduras y hongos, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de 2,49E+11 (grupo c) en la interacción entre la



concentración de nisina de 100 ppm, temperatura ambiente y procedencia artesanal; por otro lado, hubo una menor cantidad de población microbiana/mL de  $1,09E+10$  (grupo a) en la interacción entre la concentración de nisina de 50 ppm, temperatura de refrigeración y procedencia artesanal.

En el día 7 en la UFC/mL de bacterias, hubo una mayor cantidad de población microbiana/mL de  $3,20E+09$  (grupo j) en la interacción entre la concentración de nisina de 100 ppm, temperatura ambiente y procedencia tradicional, frente a la población microbiana/mL de  $3,50E+07$  (grupo a), de las interacciones entre la concentración de nisina de 200 ppm-temperatura de refrigeración -procedencia tradicional y la concentración de nisina de 100 ppm-temperatura ambiente-procedencia tradicional, el cual indicó el valor más bajo de microorganismos.

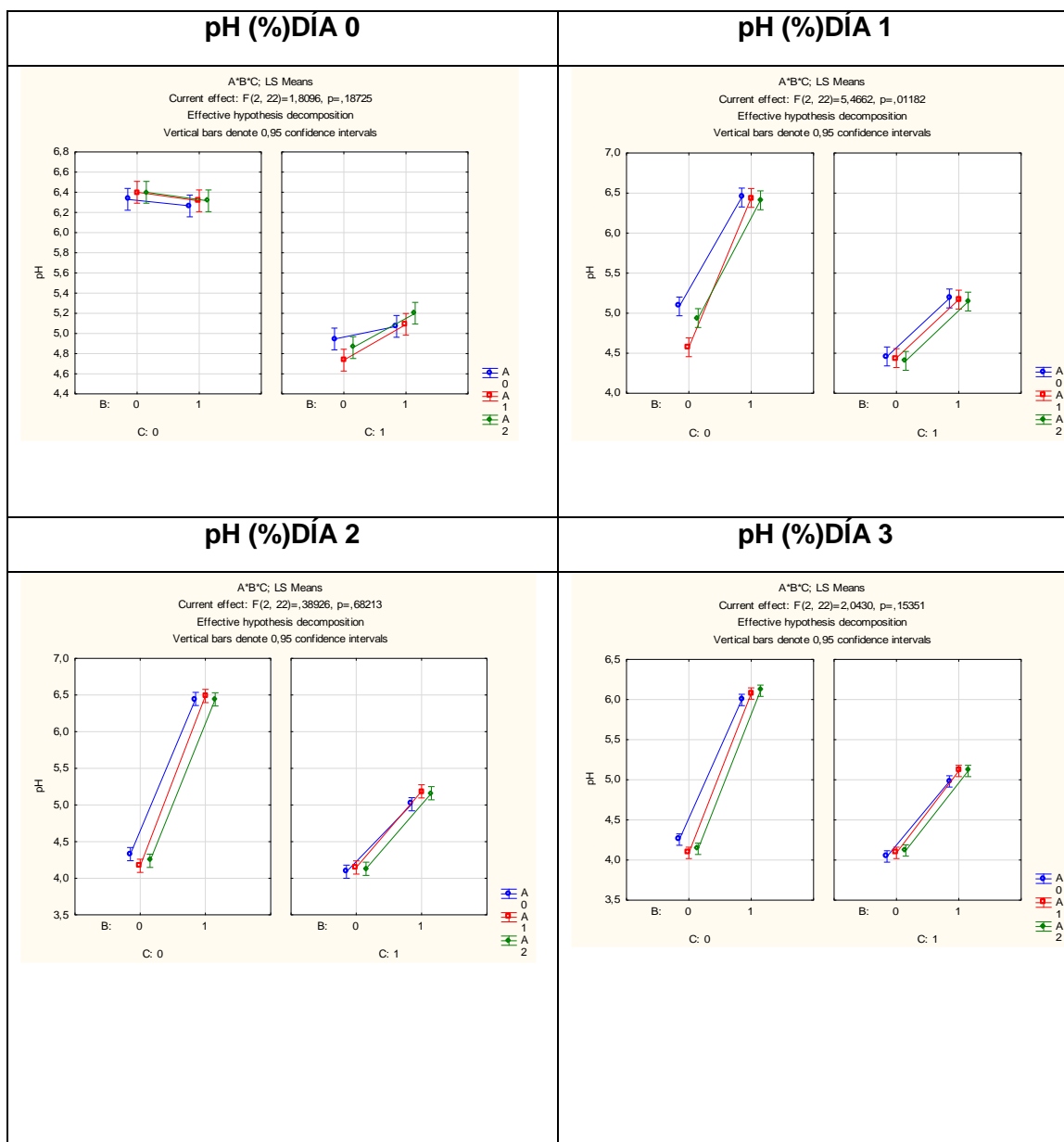
En la UFC de levaduras y hongos, hubo una mayor cantidad de población microbiana de  $3,0E-05$  (grupo g) en la interacción entre la concentración de nisina de 100 ppm, temperatura ambiente y procedencia artesanal; por otro lado, se encontró una menor cantidad de población microbiana de  $3,5E-09$  (grupo a) en la interacción entre la concentración de nisina de 50 ppm, temperatura de refrigeración y procedencia artesanal.

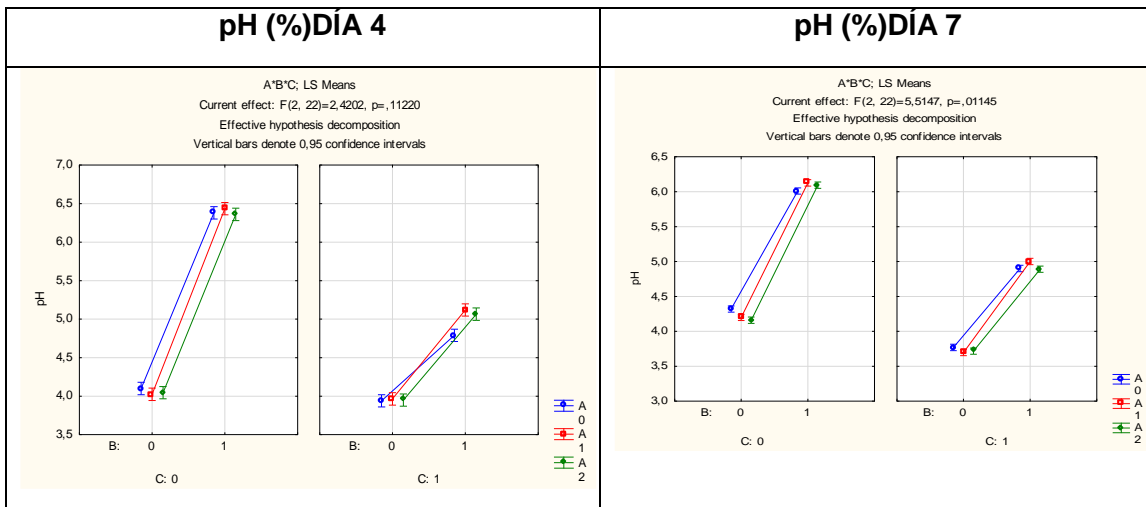
**Figura 27**

*Resumen de resultados de pH de interacción AxBxC*

*(Concentración/temperatura/procedencia), para prueba de significancia de*

*Tukey.*



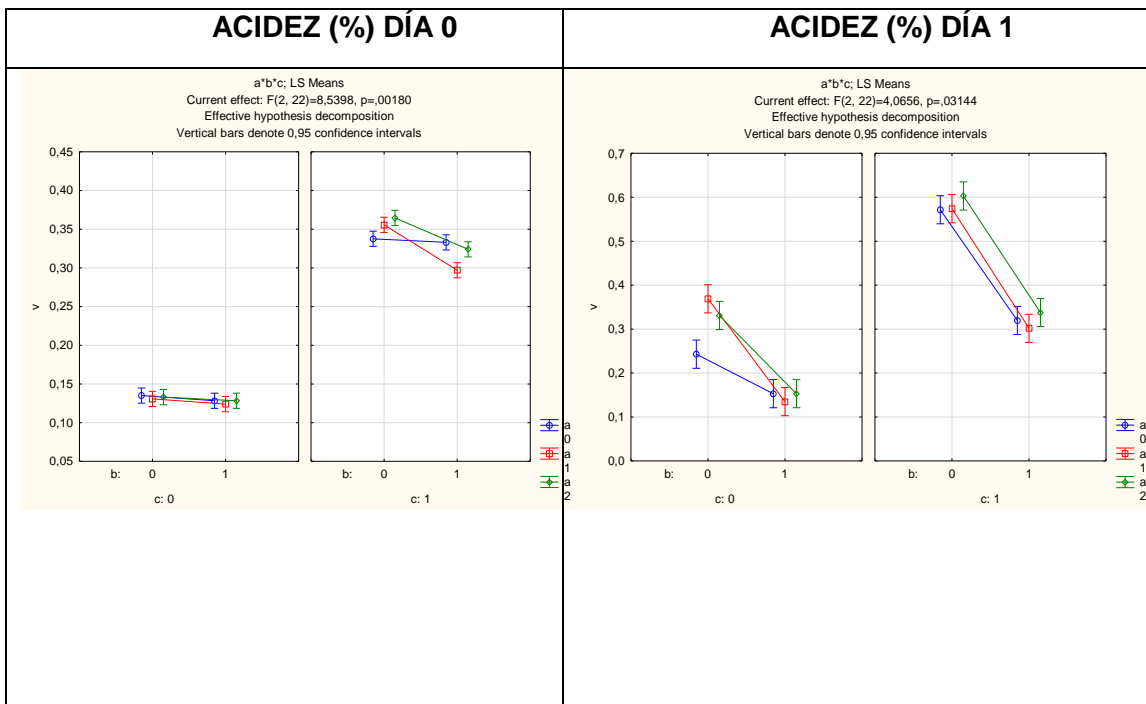


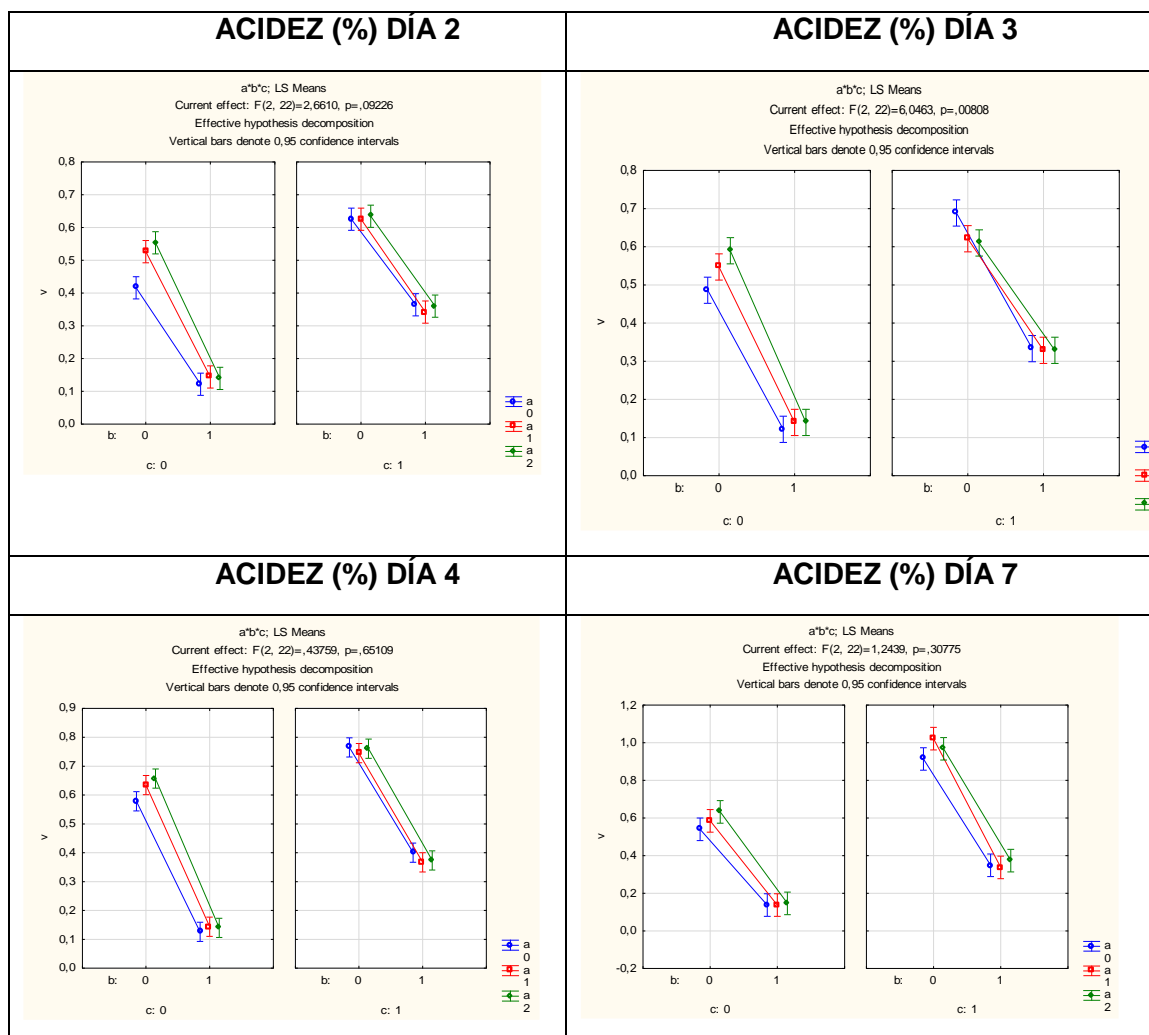
**Figura 28**

*Resumen de resultados de acidez de interacción AxBxC*

*(Concentración/temperatura/procedencia), para prueba de significancia de*

*Tukey.*





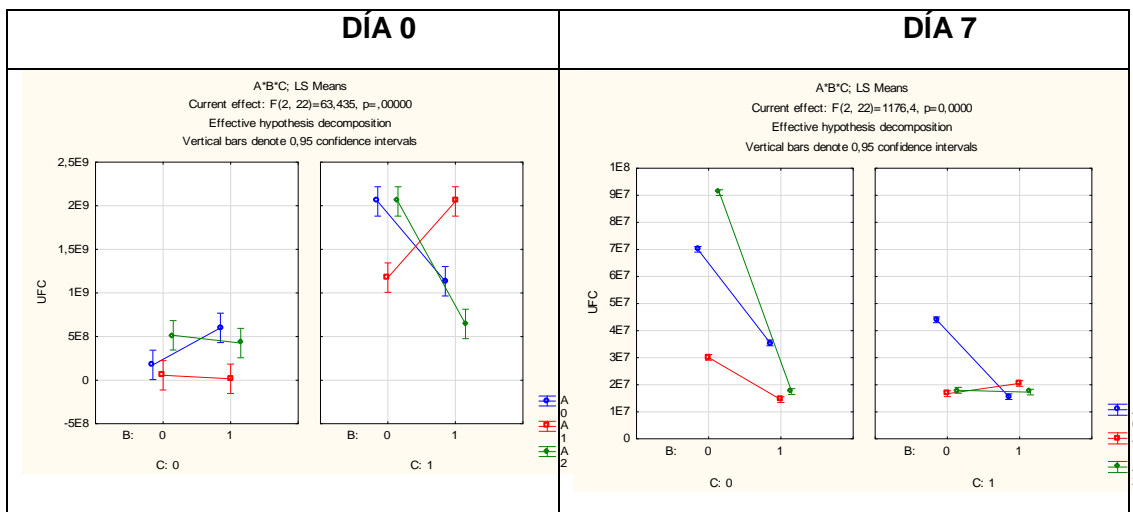
**Figura 29**

*Resumen de resultados de la interacción AxBxC*

*(Concentración/temperatura/procedencia) de bacterias, para prueba de*

*significancia de Tukey.*

**BACTERIAS**

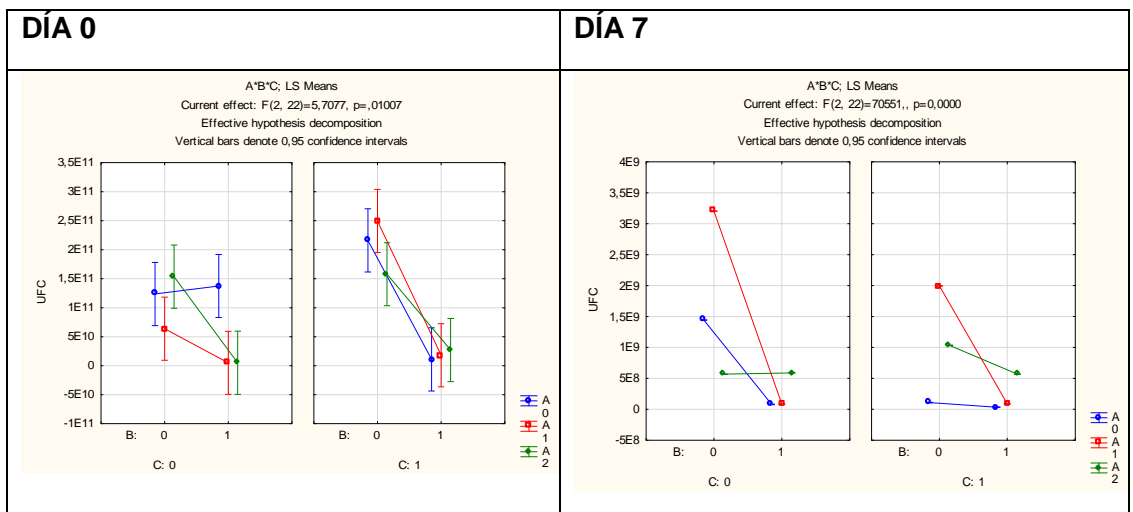


**Figura 30**

*Resumen de resultados de la interacción AxBxC*

*(Concentración/temperatura/procedencia) de levaduras y bacterias, para prueba de significancia de Tukey.*

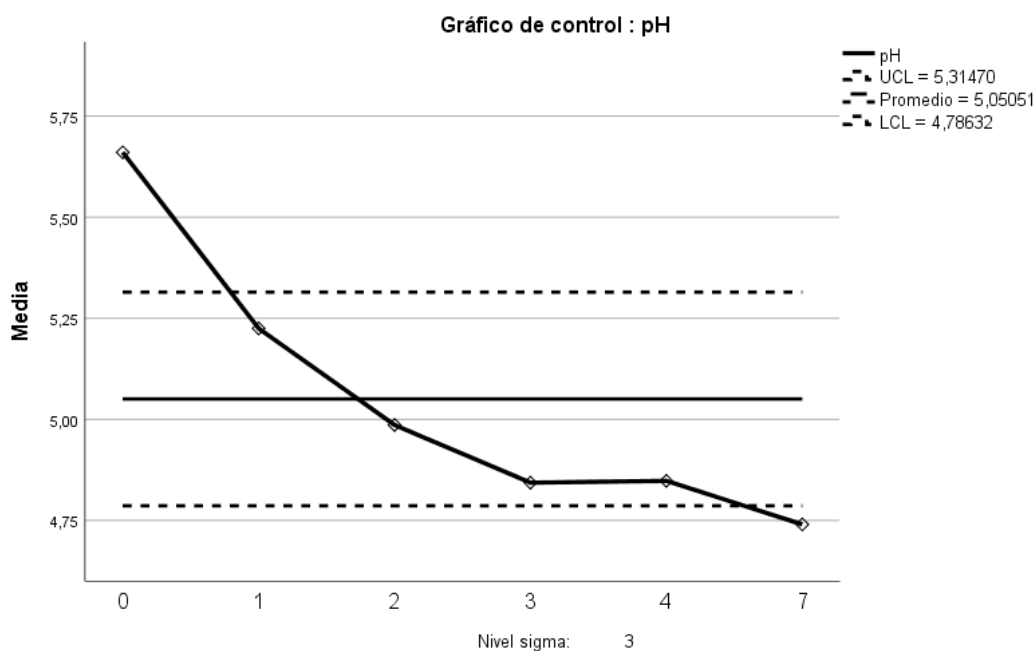
**LEVADURA Y HONGOS**



**Resultados de control de calidad para las variables pH, acidez y UFC  
(bacterias, y hongos y levaduras)**

**Figura 31**

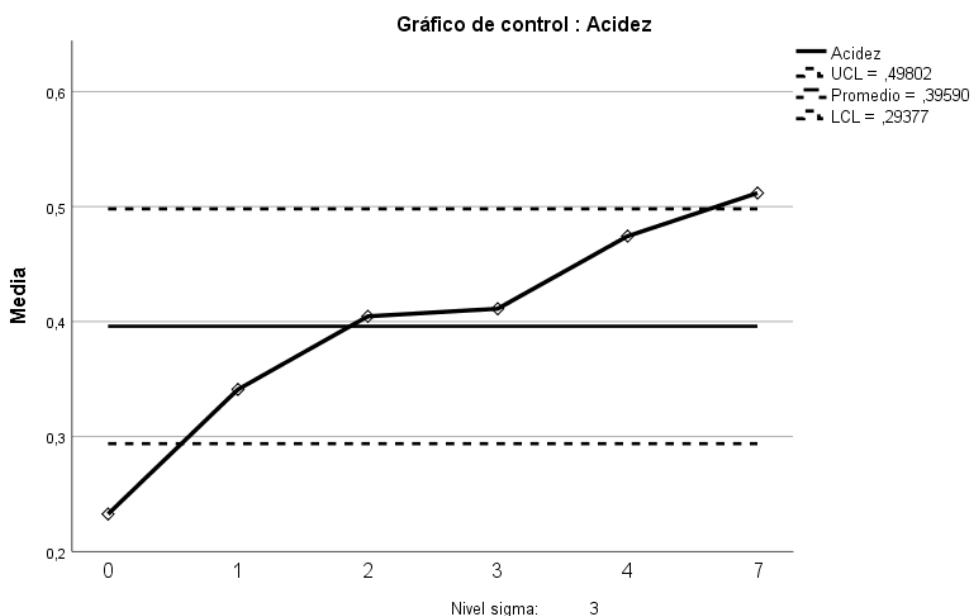
*Resultado del comportamiento del pH del suero lácteo con el bioconservante nisina, desde el día 0 al día 7 de análisis.*



La figura 29, indica el comportamiento que tuvo el pH del suero lácteo con el bioconservante nisina, en el transcurso del tiempo desde el día 0 hasta el día 7 de análisis, con un promedio de pH 5.05 donde se muestra un descenso del mismo, el límite superior corresponde a pH de 5,31 y el límite inferior corresponde a pH 4,79. El pH fue más alto en el día 0, con una disminución en el día 1 y día 2 y permanece sin variación el día 3 y día 4, y posteriormente sigue en descenso en el día 7.

### Figura 32

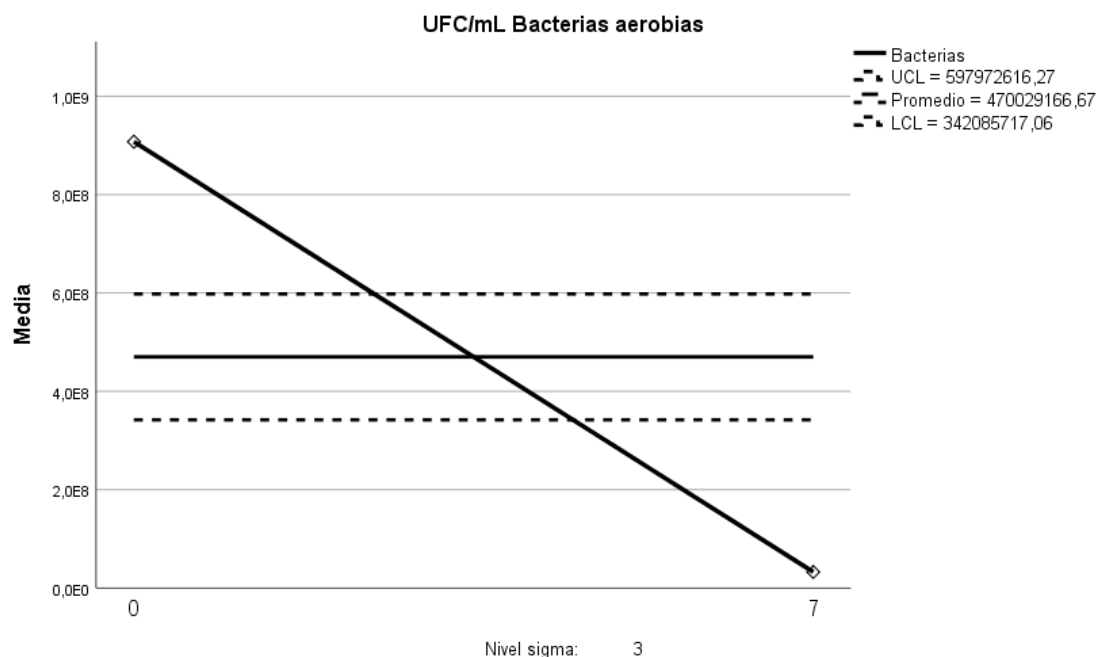
*Resultado de comportamiento de acidez del suero lácteo con el bioconservante nisina desde el día 0 al día 7 de análisis*



La figura 32, indica el comportamiento que tuvo la acidez del suero lácteo con el bioconservante nisina en el transcurso del tiempo desde el día 0 hasta el día 7 de análisis, con un promedio de acidez 0,3959 donde se muestra un ascenso del mismo, el límite superior corresponde a 0,498 y el límite inferior corresponde a 0,293. La acidez más baja correspondió al día 0, el cual fue en aumento en los días 1 y 2, manteniéndose estable en los días 2 y 3 para posteriormente subir desde el día 3 hasta el día 7.

**Figura 33**

*Resultados de UFC (Bacterias ácido lácticas) del suero lácteo con el bioconservante nisina, desde el día 0 hasta el día 7 de análisis.*

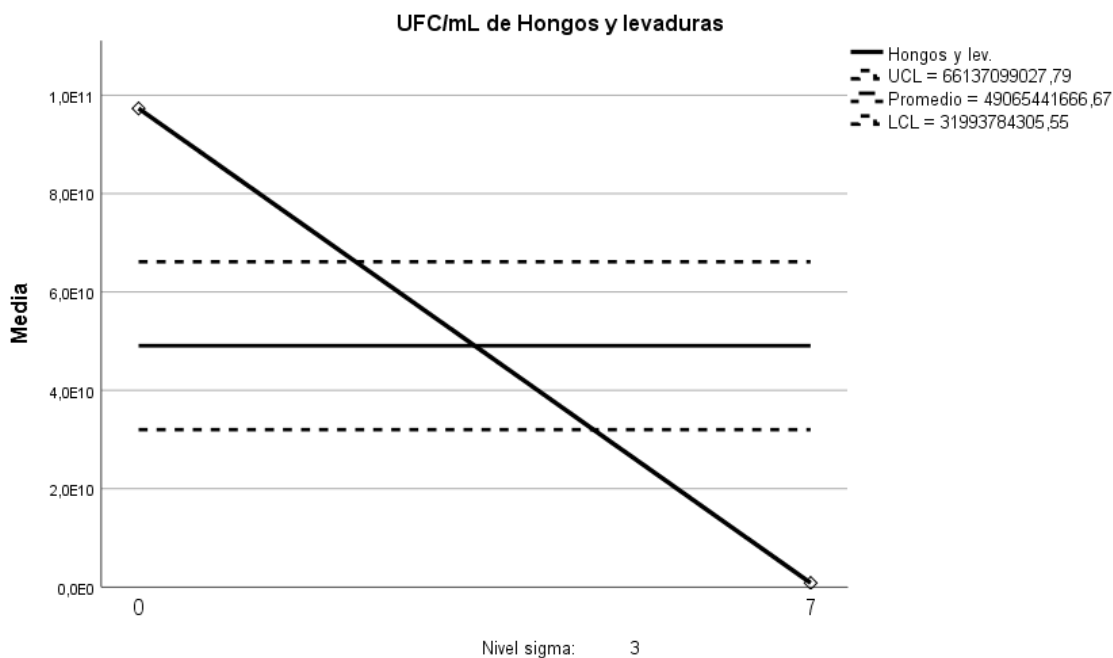


La figura 33, indica el recuento bacteriano (aerobios) en el suero lácteo con el bioconservante nisina en el transcurso del tiempo desde el día 0 hasta el día 7 de análisis, con un promedio de crecimiento de  $4,7E+08$  UFC/mL donde se muestra un descenso del mismo, el límite superior corresponde a  $5,97E+08$  UFC/mL y el límite inferior corresponde a  $3,42E+08$  UFC/mL. En el día 0 hubo un crecimiento de población microbiana superior a  $8,0E+08$ , y en el día 7 se observó un descenso el crecimiento de población microbiana con  $2,0E+08$  UFC/MI.



**Figura 34**

*Resultados de UFC (Hongos y levaduras) del suero lácteo con el bioconservante nisina, desde el día 0 hasta el día 7 de análisis*



La figura 34, indica el recuento microbiológico (Hongos y levaduras) en el suero lácteo con el bioconservante nisina en el transcurso del tiempo desde el día 0 hasta el día 7 de análisis, con un promedio de crecimiento de  $4,90E+10$  UFC/mL donde se muestra un descenso del mismo, el límite superior corresponde a  $6,61E+10$  UFC/mL y el límite inferior corresponde a  $3,19E+10$ . En el día 0 hubo crecimiento de población microbiana superior a  $8,0E+08$  UFC/mL, el cual fue en descenso hasta lograr la inhibición del crecimiento microbiano con valores inferiores a  $2,0E+10$  UFC/mL en el día 7.

## Análisis de componentes principales

Tabla 54

*Matriz de correlación de componentes principales*

|                               | pH<br>Día 0 | pH<br>Día 1 | pH<br>Día 2 | pH<br>Día 3 | pH<br>Día 4 | pH<br>Día 7 | Acid.<br>día 0 | Acid.<br>día 1 | Acid.<br>día 2 | Acid.<br>día 3 | Acid.<br>día 4 | Acid.<br>día 7 | Bact.<br>Día 0 | Bact-<br>Día 7 | H y L<br>día 0 | H y L<br>día 7 |
|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>pH Día 0</b>               | 1,00        | ,565        | ,401        | ,352        | ,396        | ,496        | -,990          | -,732          | -,494          | -,398          | -,431          | -,560          | -,823          | ,455           | -,293          | ,150           |
| <b>pH Día 1</b>               | ,565        | 1,00        | ,968        | ,952        | ,961        | ,972        | -,609          | -,889          | -,967          | -,941          | -,940          | -,882          | -,489          | -,170          | -,475          | -,485          |
| <b>pH Día 2</b>               | ,401        | ,968        | 1,00        | ,996        | ,999        | ,984        | -,449          | -,810          | -,961          | -,966          | -,970          | -,872          | -,359          | -,382          | -,528          | -,519          |
| <b>pH Día 3</b>               | ,352        | ,952        | ,996        | 1,00        | ,995        | ,982        | -,397          | -,800          | -,961          | -,973          | -,978          | -,882          | -,325          | -,420          | -,570          | -,542          |
| <b>pH Día 4</b>               | ,396        | ,961        | ,999        | ,995        | 1,00        | ,982        | -,444          | -,799          | -,955          | -,960          | -,969          | -,870          | -,348          | -,392          | -,533          | -,516          |
| <b>pH Día 7</b>               | ,496        | ,972        | ,984        | ,982        | ,982        | 1,00        | -,535          | -,881          | -,981          | -,975          | -,986          | -,940          | -,443          | -,311          | -,621          | -,484          |
| <b>Acidez<br/>día 0</b>       | -,990       | -,609       | -,449       | -,397       | -,444       | -,535       | 1,00           | ,756           | ,536           | ,438           | ,470           | ,574           | ,800           | -,427          | ,265           | -,127          |
| <b>Acidez<br/>día 1</b>       | -,732       | -,889       | -,810       | -,800       | -,799       | -,881       | ,756           | 1,00           | ,913           | ,866           | ,873           | ,924           | ,661           | -,051          | ,582           | ,310           |
| <b>Acidez<br/>día 2</b>       | -,494       | -,967       | -,961       | -,961       | -,955       | -,981       | ,536           | ,913           | 1,00           | ,986           | ,977           | ,939           | ,463           | ,274           | ,579           | ,460           |
| <b>Acidez<br/>día 3</b>       | -,398       | -,941       | -,966       | -,973       | -,960       | -,975       | ,438           | ,866           | ,986           | 1,00           | ,985           | ,923           | ,408           | ,384           | ,599           | ,466           |
| <b>Acidez<br/>día 4</b>       | -,431       | -,940       | -,970       | -,978       | -,969       | -,986       | ,470           | ,873           | ,977           | ,985           | 1,00           | ,940           | ,415           | ,342           | ,631           | ,492           |
| <b>Acidez<br/>día 7</b>       | -,560       | -,882       | -,872       | -,882       | -,870       | -,940       | ,574           | ,924           | ,939           | ,923           | ,940           | 1,00           | ,500           | ,180           | ,753           | ,432           |
| <b>Bacterias<br/>Día 0</b>    | -,823       | -,489       | -,359       | -,325       | -,348       | -,443       | ,800           | ,661           | ,463           | ,408           | ,415           | ,500           | 1,00<br>0      | -,221          | ,299           | -,308          |
| <b>Bacterias<br/>Día 7</b>    | ,455        | -,179       | -,382       | -,420       | -,392       | -,311       | -,427          | -,051          | ,274           | ,384           | ,342           | ,180           | -,221          | 1,000          | ,347           | ,051           |
| <b>Hong. Y<br/>lev. día 0</b> | -,296       | -,475       | -,528       | -,570       | -,533       | -,621       | ,265           | ,582           | ,579           | ,599           | ,631           | ,753           | ,299           | ,347           | 1,00           | ,225           |

|                       |      |       |       |       |       |       |        |      |      |      |      |      |       |      |      |      |
|-----------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|
| Hong. Y<br>lev. día 7 | ,150 | -,485 | -,519 | -,542 | -,516 | -,484 | -,1,27 | ,310 | ,460 | ,466 | ,492 | ,432 | -,308 | ,051 | ,225 | 1,00 |
|-----------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|

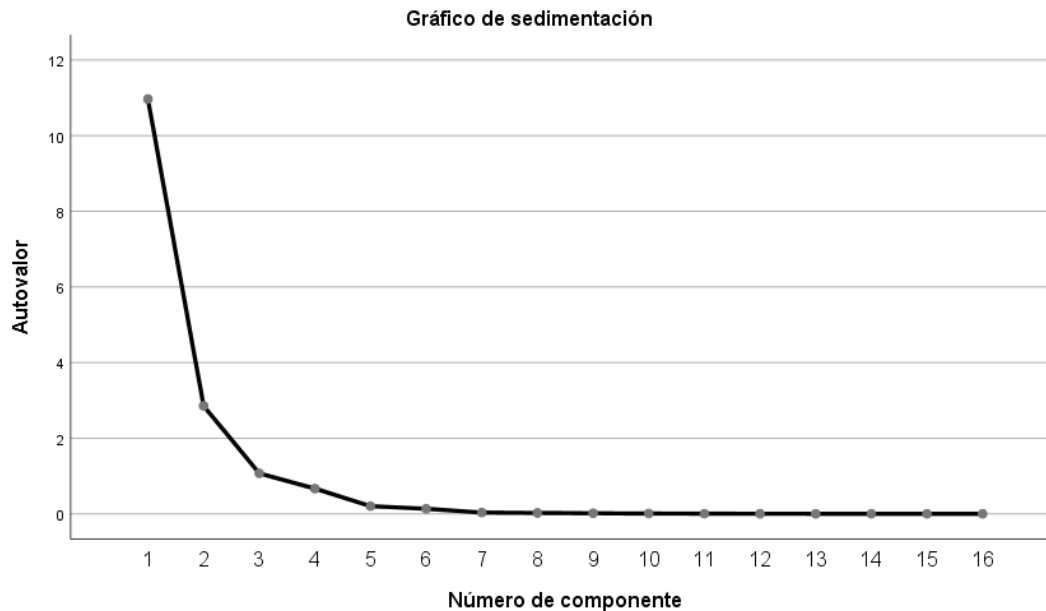
En la tabla 54 se observa que el pH en el día 1 está correlacionado con el pH de los días 2, 3, 4 y 7 siendo (0,968; 0,952; 0,961 y 0,972 respectivamente), del mismo el pH del día 2 está correlacionado con el pH de los días 1, 3, 4 y 7 con (0,968; 0,996; 0,999 y 0,984 respectivamente), así mismo el pH del día 3 está correlacionado con el pH de los días 1,2,4 y 7 con (0,952; 0,996; 0,995 y 0,982 respectivamente) de igual modo el pH del día 4 está correlacionado con el pH de los días 1,2,3 y 7 con (0,961; 0,999; 0,995 y 0,982 respectivamente) y el pH del día 7 está correlacionado con el pH de los días 1,2,3 y 4 con (0,972; 0,984; 0,982 y 0,982 respectivamente). Así mismo la variable acidez del día 1 está correlacionada con la acidez del día 2 y del día 7 con (0,913 y 0,924 respectivamente), con respecto a la acidez del día 2 está correlacionada con la acidez producida en los días 1,3,4 y 7 con (0,913; 0,986; 0,977 y 0,939 respectivamente), para la acidez del día 3 está correlacionada con la acidez producida en los días 1,2,4 y 7 con (0,986; 0,985 y 0,923 respectivamente), para la acidez del día 4 está correlacionada con la acidez producida en los días 2,3y 7 con (0,977; 0,985 y 0,940 respectivamente) y la acidez del día 7 está correlacionada con la acidez producida en los días 1, 2,3 y 4 con (0,924; 0,939; 0,912 y 0,940 respectivamente). Para bacterias de día 0 existe correlación con acidez de día 0 con 0,800 y en hongos y levaduras del día 0 existe correlación con acidez del día 7 con 0,753. En cuanto a las bacterias del día 7 presentan correlación con el pH del día 0 con 0,455.

**Matriz de componente****Tabla 55***Matriz de componente*

| <b>Matriz de componente</b> |              |              |              |
|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|
|                             | <b>1</b>     | <b>2</b>     | <b>3</b>     |
| <b>pH Día 0</b>             | <b>-,582</b> | <b>,800</b>  | <b>,028</b>  |
| <b>pH Día 1</b>             | <b>-,973</b> | <b>,003</b>  | <b>,131</b>  |
| <b>pH Día 2</b>             | <b>-,963</b> | <b>-,198</b> | <b>,033</b>  |
| <b>pH Día 3</b>             | <b>-,959</b> | <b>-,251</b> | <b>,015</b>  |
| <b>pH Día 4</b>             | <b>-,959</b> | <b>-,206</b> | <b>,025</b>  |
| <b>pH Día 7</b>             | <b>-,992</b> | <b>-,098</b> | <b>,004</b>  |
| <b>Acidez día 0</b>         | <b>,604</b>  | <b>-,768</b> | <b>-,050</b> |
| <b>Acidez día 1</b>         | <b>,928</b>  | <b>-,280</b> | <b>-,064</b> |
| <b>Acidez día 2</b>         | <b>,985</b>  | <b>,069</b>  | <b>-,020</b> |
| <b>Acidez día 3</b>         | <b>,970</b>  | <b>,173</b>  | <b>,045</b>  |
| <b>Acidez día 4</b>         | <b>,980</b>  | <b>,149</b>  | <b>,015</b>  |
| <b>Acidez día 7</b>         | <b>,958</b>  | <b>-,021</b> | <b>,028</b>  |
| <b>Bacterias Día 0</b>      | <b>,523</b>  | <b>-,717</b> | <b>,280</b>  |
| <b>Bacterias Día 0</b>      | <b>,235</b>  | <b>,729</b>  | <b>,606</b>  |
| <b>Hong y Lev día 0</b>     | <b>,636</b>  | <b>,105</b>  | <b>,385</b>  |
| <b>Hong y Lev día 7</b>     | <b>,440</b>  | <b>,529</b>  | <b>-,670</b> |

**Figura 35**

*Gráfico de sedimentación del análisis de componentes principales*



En la figura 35 se evaluaron 16 variables y de acuerdo a la varianza total explicada, el pH en el día 0 se obtuvo el mayor porcentaje de varianza con un 68,54%, para el componente 2 (pH día 1) y 3 (pH día 2), los porcentajes fueron 17,85%, 6,70% respectivamente, mientras que en el resto de componentes evaluados se obtuvieron porcentajes menores a 4.

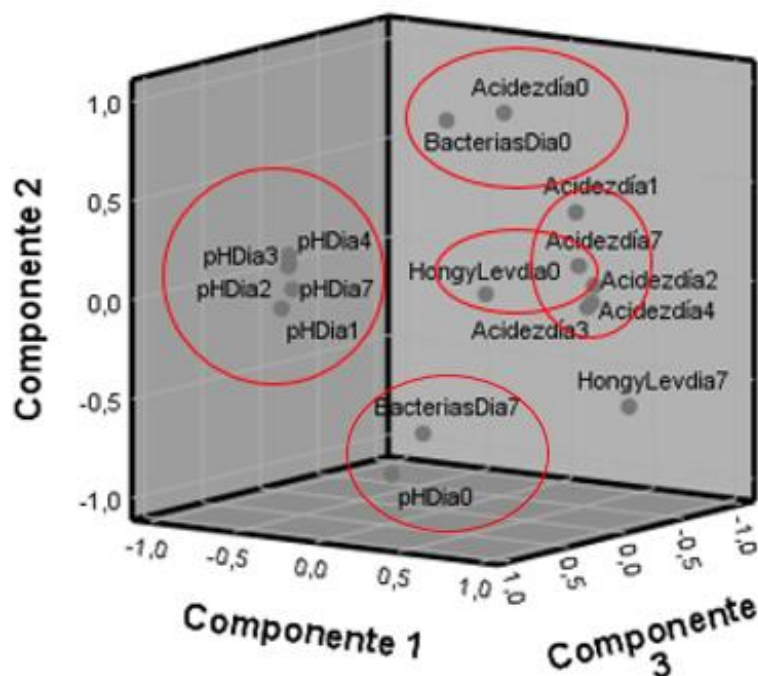
Tabla 56

*Tabla de comunalidades*

| Comunalidades    |         |            |
|------------------|---------|------------|
|                  | Inicial | Extracción |
| pH Día 0         | 1,000   | ,967       |
| pH Día 1         | 1,000   | ,963       |
| pH Día 2         | 1,000   | ,967       |
| pH Día 3         | 1,000   | ,983       |
| pH Día 4         | 1,000   | ,962       |
| pH Día 7         | 1,000   | ,994       |
| Acidez día 0     | 1,000   | ,958       |
| Acidez día 1     | 1,000   | ,943       |
| Acidez día 2     | 1,000   | ,976       |
| Acidez día 3     | 1,000   | ,974       |
| Acidez día 4     | 1,000   | ,983       |
| Acidez día 7     | 1,000   | ,919       |
| Bacterias Día 0  | 1,000   | ,866       |
| Bacterias Día 0  | 1,000   | ,955       |
| Hong y Lev día 0 | 1,000   | ,564       |
| Hong y Lev día 7 | 1,000   | ,921       |

Figura 36

*Gráfico de sedimentación del análisis de los componentes principales*



En la figura 36 se indica los resultados de los componentes principales, en el que dentro del componente 2 se muestran varios grupos de mayor correlación y que corresponden a los formados por el pH de los días 0 al 7. Con respecto al componente 1 se muestra un grupo que se correlaciona siendo este el de bacterias del día 7 y pH del día 0, y finalmente el componente 3 muestra grupos positivos y negativos relacionados, siendo estos grupos con mayor correlación los formados por la acidez de los días del 0 al 7; el segundo grupo el de hongos y lev del día 0 y la acidez del día 7, y el tercer grupo de la correlación entre acidez día 0 y bacterias día 0.

(Lopez, A. y Barriga, 2016) señala que la mayoría de bacterias, hongos y levaduras crecen a pH neutro, aunque los rangos de crecimiento pueden ser más amplios. Los microorganismos tienen unos valores mínimo, óptimo y máximo de pH, además un bajo pH influye en el crecimiento microbiano ya que afecta al funcionamiento de las enzimas metabólicas y a la permeabilidad y transporte a través de la membrana.



## Capítulo V

### Discusión

#### Pruebas fisicoquímicas en la procedencia del suero lácteo

##### Para ceniza

Se obtuvo que el valor más alto fue dado en las muestras con procedencia artesanal con 0.295, el cual se encuentra dentro de los parámetros que establece la norma INEN NTE 2594. Valores que estuvieron por debajo de los reportados por Enrique et al. (2018) con el 0.42% (4.2 g/L), constituyéndose como uno de los elementos más representativos del suero por su potencialidad para uso industrial. Por otro lado, el valor más bajo se obtuvo en la procedencia tradicional con 0.060 mismo que también cumple con el rango establecido por la norma INEN NTE 2594.

##### Para grasa

En la procedencia se puede evidenciar notablemente que la procedencia artesanal posee mayor porcentaje de grasa 0,294% con respecto a la procedencia tradicional 0,042%, no obstante; de acuerdo a la norma NTE INEN 2594:2011 se encuentran dentro de los parámetros establecidos. La variación en cuanto al porcentaje de grasa obtenido por la procedencia puede indicar diferencias en cuanto a la elaboración del proceso, así como también de la alimentación del ganado del que proviene la materia prima (Paredes et al., 2014) lo que puede influir en los resultados fisicoquímicos del suero.

Las características fisicoquímicas del lactosuero se encontraron dentro de los parámetros establecidos, motivo por el cual se hace importante para el alargamiento de su vida útil y su posterior producción y elaboración de bebidas

tanto proteicas, fermentadas, probióticas, energizantes (Molero-Méndez et al., 2017), así como también para otras innovadoras aplicaciones.

### **Para proteína**

Tanto la procedencia artesanal como la tradicional presentaron valores dentro de los parámetros establecidos por la norma NTE INEN 2594 que indica un porcentaje de proteína mínimo de 0,8% en suero dulce de leche, por otro lado, (Montesdeoca Párraga & Piloso Chávez, 2020) en el trabajo que evaluaron lactosuero de queso fresco pasteurizado obtuvieron valores de proteína de 0,94% similar a lo reportado por la procedencia tradicional y con las mismas características del lactosuero. Por otro lado, (Molero-Méndez et al., 2017) en su trabajo reportaron valores de proteína con un promedio del 1% en lactosuero obtenido de la producción de queso mediante un método artesanal, cuyas características son semejantes a los obtenidos por la procedencia artesanal analizada en este estudio.

### **Concentración (Factor A)**

#### **Con respecto al pH**

En la aplicación de las diferentes concentraciones del bioconservante (nisina) en el suero lácteo y la evaluación de la variable pH para el Factor A (Concentración: 200 ppm, 100 ppm, 50 ppm) y mediante las pruebas de significación Tukey ( $p > 0,05$ ) se determinó lo siguiente:

La Norma técnica ecuatoriana NTE INEN 2594:2011 establece que el suero de leche dulce debe cumplir con valor de pH mínimo de 6.8 y máximo de 6.4. Por lo que para el día 0 no se obtuvo diferencia significativa entre concentraciones: 50 ppm 5.65, 100 ppm 5.63 y 200 ppm 5.69, considerando de este modo según NTE INEN 2594, (2011), que ninguno de los valores de pH se

encuentra dentro de los parámetros establecidos. Por otro lado Enrique, Becerra-jim, & Borr (2018) obtuvieron valores similares de pH: 5.6, 5.7 y 5.8 de lactosuero de queso Paipa de varias zonas; sin embargo, estos datos fueron obtenidos sin aplicar ningún bioconservante en el suero. Según De la Cruz González, Aquino Ruíz, Rocha, & Bonifaz (2018) sugieren que las muestras presentaron valores por debajo de las permitidas por la norma, posiblemente por el pH inicial de la leche, como también de la capacidad de la lactosa para transformarse en ácido láctico a medida que avanza el tiempo.

Para el día 1 se obtuvo que el mayor valor de pH fue dado a una concentración de 50 ppm con 5,29 y el menor valor a una concentración de 100 ppm con 5,16. Debido esto a que la nisina es más soluble y más estable bajo condiciones ácidas según lo establece Gharsallaoui, Oulahal, Joly, & Degraeve (2016). Explicando esto el menor valor de pH a una mayor concentración de nisina. Por otro lado, Vinicio (2010) en su estudio, determinó que en el factor concentración no hubo diferencia significativa en el día 1 al cual aplicó concentraciones de 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm y 250 ppm.

Para el día 2 no se encontró diferencia significativa para las concentraciones de la nisina y según el estudio de Ramirez (2010) estableció que en el día 2 tampoco obtuvo diferencia significativa en el mismo factor de estudio al cual aplicó concentraciones de 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm y 250 ppm.

En el día 3 las concentraciones de nisina no tuvieron diferencia significativa; sin embargo, el paso de los días hizo que el potencial de hidrógeno disminuya con una concentración de 50 ppm:4.80, 100 ppm:4.88 y 200 ppm:4,85 causado según Ibarra-Sánchez, El-Haddad, Mahmoud, Miller, & Karam (2020)

por la adición de la nisina al suero lácteo ya que esta se ve muy afectada por el pH teniendo una máxima solubilidad y estabilidad a pH 3.

En el día 4 se obtuvo que el valor más alto de pH fue con la concentración de 100 ppm:4,88 y el menor a una concentración de 50 ppm:4,80 y contrastando con los datos obtenidos por Ramirez(2010) donde obtuvo que a una concentración de 100 ppm: 5,86 el valor más alto de pH y en una concentración de 50 ppm: 5,69 el menor valor de pH, determinándose de este modo la influencia del efecto de la concentración.

Para el día 7 se obtuvo que el mayor valor de pH lo determinó la concentración a 100 ppm con 4,76 y el menor valor de pH fue dado a una concentración de 200 ppm con 4,71, debido a que como lo determinó Liu & Hansen, (1990) el efecto del pH en la solubilidad y estabilidad de la nisina es una propiedad notable que se incrementa a medida que el pH se reduce; Sin embargo Vinicio (2010) encontró que a una concentración de 250 ppm obtuvo el mayor valor de pH 3,84 y a una concentración de 50 ppm obtuvo el menor valor de pH 3,71 siendo valores casi parecidos lo que explica que la nisina a diferentes concentraciones han adquirido un comportamiento similar en el último día de análisis.

### **Con respecto a la acidez**

En el día 0 el valor más alto de acidez se obtuvo en la concentración de 200 ppm con 0,24% de acidez y el valor más bajo en la concentración 50 ppm, con 0,23%. La Norma técnica ecuatoriana NTE INEN 2594:2011 determina que el suero de leche dulce debe cumplir con un valor máximo de acidez titulable calculada como ácido láctico de 0,16% de tal forma que en esta investigación los resultados obtenidos no cumplen con los requisitos establecidos, no obstante;

(Paredes et al., 2014) obtuvo valores similares a los presentados en esta investigación.

En el día 1 el valor más alto de acidez se obtuvo en la concentración de 200 ppm con 0,36% y el valor más bajo en la concentración 50 ppm con 0,32%.

En el día 2 el valor más alto de acidez se obtuvo en la concentración de 200 ppm con 0,42% y el valor más bajo con 0,38% con la concentración de 50 ppm.

En el día 3 no se evidenció diferencia significativa para este factor. No obstante, se obtuvieron valores que oscilan entre 0,41-0,42%.

En el día 4 no existió diferencia significativa para este factor. No obstante, se obtuvieron valores entre 0,47-0,48%.

En el día 7 no existió diferencia significativa para este factor tomando en cuenta que se obtuvieron valores entre 0,49-0,53%.

La aplicación de la nisina como bioconservante explicaría el retraso en cuanto al descenso del pH y al incremento de la acidez conforme pasan los días de acuerdo a lo mencionado por (Rodríguez Delgado & Plazas Paredes, 2016) tomando en cuenta que la relación pH-acidez es inversamente proporcional. Además, el suero analizado tuvo un incremento en la acidez de forma gradual en los días transcurridos presumiéndose que se debe al posible crecimiento de microorganismos principalmente las bacterias acidófilas que generalmente no presentan riesgo de patogenicidad (Rodríguez & Playas, 2016).

### Con respecto a UFC

En el estudio de las distintas concentraciones de nisina aplicado en el suero lácteo y la evaluación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL de Bacterias aerobias, hongos y levaduras para el Factor A (Concentración: 200 ppm, 100 ppm, 50 ppm) y mediante las pruebas de Tukey ( $p > 0,05$ ) se determinó lo siguiente:

Para el día 0 en el recuento de bacterias aerobias se observó un alta cantidad de colonias de  $9,90E+08$  UFC/mL, en el tratamiento aplicado al suero lácteo con el bioconservante a una concentración de 50 ppm y considerando las norma NTE INEN 2594 (2011) para el suero de leche líquido en la que se establece un índice máximo permisible de bacterias aerobias de  $1,0E+05$  podemos decir que sobrepasa los valores permitidos. Por lo tanto, Díaz et al.(2017) , establece que un recuento elevado puede significar la posibilidad de que existan patógenos, pues estos son mesófilos, además de una excesiva contaminación de la materia prima y la inmediata alteración del producto.

Para el recuento de hongos y levaduras no hubo diferencia significativa entre las concentraciones de nisina aplicadas al suero lácteo obteniendo un valor de UFC/mL de  $8,4E+10$  y  $8,5E+10$  para las concentraciones de nisina de 100 ppm y 200 ppm, y en la concentración de nisina de 50 ppm se obtuvo una UFC/mL de  $1,2 E+11$  y que según Jama (2017) estos valores no se ajustan a los establecidos por la norma de Cuba NC585 , ya que indica que el límite máximo de existencia de microorganismos es  $2E+02$  UFC/mL, se usa esta norma debido a que en Ecuador no hay especificaciones sobre hongos en lactosuero.

Con respecto al día 7 de recuento de bacterias aerobias se obtuvo una menor cantidad con  $2,04E+07$  UFC/mL en el tratamiento aplicado a una concentración de nisina de 100 ppm, que comparado con las existentes en el día 0 a esta misma concentración de nisina se observa que el recuento de colonias disminuyó, sin embargo, tampoco cumple con el rango establecido por la norma para identificar un nivel aceptable de calidad del suero lácteo. Esto según, Cano-Serna, Gómez-Marín, Oviedo-Gallego, & Rios-osorio (2015) puede deberse a que la nisina exhibe una actividad altamente antibacteriana hacia una amplia gama de bacterias Gram positivas, en las que incluyen bacterias formadoras de esporas y otras bacterias patógenas.

En el recuento de hongos y levaduras se obtuvo que a una concentración de nisina de 100 ppm hubo un recuento mayor con  $4,17E+08$  UFC/mL, y en comparación con la misma concentración 100 ppm en el día 0, se encontró que hubo un descenso del mismo. Y según Ramirez (2010) esto pudo haberse causado por el poder de conservación de la nisina.

### **Temperatura (Factor B)**

#### **Con respecto al pH**

En el día 0 se obtuvo que el mayor valor de pH fue a temperatura de refrigeración con 5,71 y el menor valor de pH a temperatura ambiente con 5,61 valores que no se ajustan a los parámetros requeridos por la NTE INEN 2594:2011 de suero de leche líquido el cual establece como valores mínimos un pH de 6,8 y máximo de 6,4 en suero de leche dulce. De la Cruz González et al. (2018) obtuvieron que un 15% de las muestras de lactosuero analizadas tampoco cumplieron con los valores permitidos por la norma esto debido posiblemente al pH inicial de la leche, capacidad de transformación a ácido

láctico de la lactosa en el transcurso del tiempo, señalando además, que los componentes del suero dependerán de la calidad composicional de la leche original y del tipo de tecnología que se use en su proceso.

En el día 1 Ramirez (2010), mostró un valor mayor de pH a temperatura de refrigeración con 6,48 y un valor menor de 6,44 a temperatura ambiente, valores más altos frente a los obtenidos donde el pH más alto corresponde al de temperatura de refrigeración con 5,80 y el menor valor que corresponde a temperatura ambiente con 4,65. Por lo que establece que la temperatura ambiente contribuye a la disminución del pH con el criterio de lo “mayor es mejor”, es decir que el valor más alto de pH es mejor determinando de este modo que el pH es inversamente proporcional a la temperatura.

Para el día 2 (Vinicio, 2010) encontró que el mayor valor de pH fue a temperatura de refrigeración con 5.65 y el menor valor de pH a temperatura ambiente con 5.62 valores que se asemejan al mayor valor de pH a temperatura de refrigeración con 5.79; mientras que a temperatura ambiente el pH fue menor con 4,18. Esto según lo establece Ramirez, (2010) que a temperatura ambiente el pH disminuye, siendo esta una temperatura idónea para el desarrollo de los microorganismos generándose así grandes cantidades de ácido láctico que emiten al realizar su metabolismo.

Para el día 3 se obtuvo que a temperatura de refrigeración el pH fue mayor con 5,56 y a temperatura ambiente el pH fue menor con 4,12 datos similares a los obtenidos por Vinicio, (2010) con un pH mayor de 5,62 a temperatura de refrigeración y un pH menor de 5,22 a temperatura ambiente. Gharsallaoui et al.(2016) establece que la actividad de la nisina es muy estable a temperaturas bajas, pero esta actividad se puede perder cuando el péptido se



somete a temperaturas altas por mucho tiempo. Además, la termoestabilidad de la nisina está relacionada en gran medida con el pH, es decir a menor valor de pH la estabilidad térmica de la nisina aumenta.

En el día 4 el mayor valor de pH fue de 5,69 a temperatura de refrigeración y el menor valor de pH con 4.00 a temperatura ambiente, valores similares a los obtenidos por Vinicio (2010) con un pH alto de 5,25 a temperatura de refrigeración y 3,99 a temperatura ambiente. Cano-Serna, Gómez-Marín, Oviedo-Gallego, & Rios-osorio (2015) establecen que la nisina es estable a un pH ácido teniendo su máxima solubilidad y estabilidad a un pH 2 siendo irreversiblemente estable aun pH de 7.0; su solubilidad aumenta al incrementar la temperatura y disminuir el pH.

En cuanto al día 7 el pH mayor fue dado a una temperatura de refrigeración con 5.69 y el menor valor de pH a una temperatura ambiente con un valor de 3.98 siendo este último un valor similar al obtenido por Vinicio (2010) con 3.57 dado a temperatura ambiente y un pH mayor de 4.0 dado a temperatura de refrigeración. Por lo tanto, los resultados para este día no se ajustan a los parámetros requeridos por (NTE INEN 2594, 2011) en ninguno de los casos.

### **Con respecto a la acidez**

En el día 0 se obtuvo que el valor mayor de acidez lo atribuía la temperatura ambiente 0,24% mientras que la temperatura de refrigeración reflejaba el menor porcentaje 0,22%. Los valores de acidez obtenidos en este día ajustados a la temperatura indica que poseen valores similares entre los niveles a los reportados por (Ramirez, 2010) debido a que se trata del primer día

de experimentación donde las condiciones aún no influyen en el proceso de estudio.

En el día 1 la temperatura ambiente tuvo un incremento brusco con un valor de 0,45% mientras que la temperatura de refrigeración indicaba un menor porcentaje (0,23%) situación que coincide con lo reportado por (Ramirez, 2010) que obtuvo un valor menor en acidez a temperatura de refrigeración. De acuerdo a lo reportado por (Ramirez, 2010) la temperatura es un factor determinante en el ascenso de la acidez del suero.

En el día 2 la temperatura ambiente tuvo un porcentaje de 0,56% en tanto que la temperatura de refrigeración indicaba un valor menor de 0,25% situación similar a la reportada por (Ramirez, 2010) donde el menor ascenso de acidez se lo adquiere a la temperatura de refrigeración.

En el día 3, la temperatura ambiente tuvo un porcentaje de 0,59% en tanto que la temperatura de refrigeración indicó un valor menor de 0,23% lo que según (Ramirez, 2010) la temperatura de refrigeración es la más adecuada porque no permite experimentar cambios drásticos en los niveles de acidez al transcurso de los días pues en dicho estudio también se reporta una situación similar en cuanto a los cambios de acidez en el transcurso de los días.

En el día 4, la temperatura ambiente incrementó a un porcentaje de 0,69% en comparación con la temperatura de refrigeración que reflejó un valor de 0,26% situación que se contrasta con lo reportado por (Ramirez, 2010).

En el día 7, la temperatura ambiente incrementó a un porcentaje de 0,78% en tanto que la temperatura de refrigeración que reflejó un valor de 0,25%

en donde también se evidencia un incremento brusco en el factor temperatura ambiente, situación similar experimentada por (Ramirez, 2010).

En el estudio de las distintas concentraciones de nisina aplicado en el suero lácteo y la evaluación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL de Bacterias aerobias, hongos y levaduras para el Factor B (Temperatura: ambiente y refrigeración) y mediante las pruebas de Tukey ( $p > 0,05$ ) se determinó lo siguiente:

En el día 0 de recuento de bacterias aerobias se obtuvo un valor alto en el tratamiento aplicado a temperatura ambiente con un valor de  $1,00E+09$  UFC/mL y un valor más bajo de  $8,11E+08$  UFC/mL, los cuales no se encuentran dentro del rango permitido por la norma NTE INEN 2594 (2011). Y comparando con los datos mostrados por Enrique, Becerra-jim, & Borr (2018) se encontró que obtuvo un valor de  $11E+15$  UFC/mL microorganismos aerobios el cual tampoco cumplió con los parámetros microbiológicos del Colombia, el cual explica que un recuento alto de UFC de estos parámetros en un subproducto indica que probablemente sea causado por el tipo de conservación y temperatura lo que permite el desarrollo de microorganismos.

Respecto al día 7 se obtuvo un recuento alto de bacterias aerobias de  $4,50E+07$  UFC/mL del tratamiento realizado a temperatura ambiente mientras que el valor más bajo es de  $2,01E+07$  UFC/mL con tratamiento a temperatura de refrigeración, y comparado con los datos obtenidos en el día 0 con los mismos tratamientos se nota un descenso en el crecimiento de las bacterias aerobias. Y según Vinicio (2010) el agregado de nisina produce un efecto inhibitorio sobre las bacterias presentes en las muestras tratadas con diferentes concentraciones

y en temperaturas de refrigeración el efecto de la nisina se refuerza con la utilización de bajas temperaturas.

Para el día 0 en el recuento de hongos y levaduras se encontró que el valor más alto fue de  $1,6E+11$  UFC/mL del tratamiento a temperatura ambiente y el tratamiento más bajo fue de  $3,4E+10$  UFC/mL del tratamiento a temperatura de refrigeración, sin embargo, ninguno de estos datos se apega a lo que establece la norma INEN para suero de leche. Además, comparando con los resultados obtenidos al día 7 se obtuvo un descenso en el crecimiento de los mismos siendo los valores más altos los obtenidos del tratamiento a temperatura ambiente con  $1,4E+09$  UFC/mL y el valor más bajo el obtenido por los tratamientos aplicados a temperatura de refrigeración con  $2,4E+08$  UFC/mL. Según Vinicio (2010) establece, que la influencia de la temperatura sobre el crecimiento de los microorganismos es en realidad una medida de la influencia de la temperatura sobre las actividades enzimáticas de la célula. Por lo tanto, cuando desciende la temperatura disminuye la actividad enzimática y en consecuencia el crecimiento de los microorganismos. Por otro lado Cano-Serna et al. (2015) explica que el efecto antimicrobiano de la nisina es más efectivo cuando se lo aplica de forma libre, a pesar de que una temperatura de refrigeración representa un factor determinante para evitar la proliferación de microorganismos patógenos.

### **Factor C (Procedencia)**

#### **Con respecto al pH**

Con respecto al día 0 se obtuvo que el pH más alto fue con la elaboración tradicional con 6.34 valor algo similar al reportado por Montesdeoca (2020) con un pH de 6,71 datos que se ajustan a lo que establece la norma sin

embargo, el menor valor con el pH obtenido por elaboración artesanal con 4.9, presentó un valor por debajo a lo establecido por la norma, al igual que el reportado por Paredes et al. (2014) con un promedio de 5,75 afirmando en este caso que la composición físico química del suero pudo verse afectada por factores como el proceso de manufactura, la calidad inicial de la leche y el tipo de almacenamiento que se le da al suero.

En el día 1 el mayor valor de pH fue de 5,65 de suero obtenido por elaboración tradicional, valor más bajo que el reportado por Montesdeoca (2020) el cual establece que el suero al ser obtenido de un queso elaborado con leche pasteurizada cumple con los parámetros que establece la norma técnica ecuatoriana INEN 0009 garantizándose así una materia prima de calidad y el menor valor fue de 4,80 de suero obtenido de forma artesanal valor menor al obtenido en el estudio de Enrique et al. (2018) con un promedio de 5,7 afirmando que es un pH característico de sueros obtenidos de la coagulación enzimática de la leche, obedeciendo seguramente a que dicho suero proviene de un queso elaborado con leche cruda.

Con respecto al día 2 se obtuvo que el valor más alto de pH correspondió al suero de procedencia tradicional con 5.35 valor similar al reportado por Paredes et al. (2014) el cual obtuvo un valor de pH de 5,45 de un suero procedente de leche pasteurizada. Sin embargo, el pH de suero procedente de leche cruda no obtuvo un valor similar siendo este de 6.04 con el de menor valor obtenido en este estudio el cual fue de 4,62 con procedencia artesanal.

En el día 3 el mayor valor de pH fue el de procedencia tradicional con 5,11 y el menor valor de pH fue el de procedencia artesanal con 4,58. Los resultados obtenidos demuestran un claro descenso del pH en relación al día 0

condiciones muy similares a las reportadas por Alfaro & Chang (2017) los cuales afirman que este descenso mejora la acción de la nisina al alejarse del valor de pH 7.

Con respecto al día 4, Tafreshi & Mirdamadi (2015) reporto en su estudio que obtuvo una reducción de pH de 0,5 desde el día 0 hasta el día 4 con pH 6.80 y 6.75 respectivamente en leche pasteurizada con 200 IU/mL de nisina, valores que difieren de los resultados obtenidos con pH 5,22 de procedencia tradicional y 4,47 de procedencia artesanal y en comparación con el día 0 se tuvo una reducción de pH de 1,12 en el suero con procedencia tradicional y de pH 0,51 en el suero de procedencia artesanal. Esto, debido a como menciona Alfaro & Chang (2017) el descenso del pH se disminuye a través del tiempo debido a las bacterias ácido lácticas (BAL) que producen ácido láctico como metabolito de fermentación a partir de lactosa.

En el día 7 Alfaro & Chang (2017), establece que obtuvo un pH de 6,18 en el día 7 y pH de 6,23 en el día 0, existiendo una reducción de pH de 0.06 desde el día 0 hasta el día 7, en leche pasteurizada con una concentración de 200 IU/mL de nisina, valores que se diferencian de los obtenidos en este estudio, con pH 5,15 de procedencia tradicional y pH 4,33 de procedencia artesanal existiendo una reducción obtenido en el suero de procedencia tradicional con respecto al día 0 de pH 1,19 y en el suero de procedencia artesanal de pH 0,65.

### **Con respecto a la acidez**

En el día 0 el valor más alto lo reporta la procedencia artesanal con 0,34% de acidez en tanto que la procedencia tradicional se reporta con un porcentaje de 0,13%. El alto porcentaje de acidez de la procedencia artesanal no

se encuentra dentro de los parámetros de las normas NTE-INEN 2594:2011 esto se presume que puede deberse al empleo y tipo de cultivo láctico y si existió o no la acción de las bacterias ácido lácticas durante el proceso de elaboración y antes de la separación del suero, así como también el tipo de cuajo aplicado durante la elaboración del queso de acuerdo a los resultados que también reporta (Paredes et al., 2014). Otra consideración es que pudo haber influido la forma de almacenamiento del suero obtenido (Paredes et al., 2014). Por otro lado, el factor procedencia tradicional se encontró dentro de los parámetros establecidos por la norma INEN empleada asimilándose a lo reportado por (Gorostidi, 2014) cuyas características del lactosuero analizado en dicho estudio son similares al de esta investigación.

En el día 1 el valor de la acidez en cuanto a la procedencia artesanal se incrementó a 0,45% en tanto que la procedencia tradicional reportó un ascenso a 0,23%.

En el día 2 ambos valores obtenidos se incrementaron teniendo así en la procedencia artesanal un valor de 0,49% en tanto que la procedencia tradicional un valor de 0,32%.

En el día 3 también existió un incremento en la acidez. Es así que en la procedencia artesanal se tuvo un valor de 0,49% en tanto que la procedencia tradicional un valor de 0,34%.

En el día 4 ambos niveles tuvieron un incremento en su acidez, de tal manera que en la procedencia artesanal se tuvo un valor de 0,57% en tanto que la procedencia tradicional un valor de 0,38%.

En el día 7 ambos niveles tuvieron un incremento en el valor de la acidez tal como se venía presentando en los días anteriores de tal forma que se obtuvo un valor de 0,36% para la procedencia tradicional y un valor de 0,66 para la procedencia artesanal.

El incremento de la acidez titulable conforme pasan los días se debe al metabolismo de los microorganismos sobre el suero lácteo que transforman la lactosa en ácido láctico, por lo tanto, a más producción de ácido láctico, mayor cantidad de microorganismos (Zavala, 2005). Por otro lado, también nos indica la efectividad de la pasteurización, así como de la actividad que ejercen las bacterias en el lactosuero (Zavala, 2005) es así que es por ello que la procedencia tradicional la misma que involucra un proceso de pasteurización desde el día 0 presenta una acidez considerable dentro de los rangos permitidos por la norma INEN en comparación con la procedencia artesanal que no incluye un proceso de pasteurización y que refleja valores más altos en cuanto a su acidez.

### **Con respecto a UFC**

En el estudio de las distintas concentraciones de nisina aplicado en el suero lácteo y la evaluación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL de Bacterias aerobias, hongos y levaduras para el Factor C (Procedencia: tradicional y artesanal) y mediante las pruebas de Tukey ( $p > 0,05$ ) se determinó lo siguiente:

En el día 0 de recuento de bacterias aerobias se obtuvo que el valor más alto de colonias con  $1,52E+09$  UFC/mL fue dado en el suero de leche de



procedencia artesanal, mientras que el valor más bajo de colonias se encontró en el suero de leche de procedencia tradicional con un valor de  $2,97E+08$ . Y Según Gharsallaoui, Oulahal, Joly, & Degraeve (2016) la combinación de la nisina con tratamientos térmicos podría una forma eficaz de aumentar la vida útil de los productos alimenticios debido a que ayudan a preservar las propiedades organolépticas y sensoriales de los alimentos.

En el recuento de hongos y levaduras se obtuvo que el valor más alto lo presentó el suero de leche de procedencia artesanal con  $1,1E+11$  UFC/mL y el valor más bajo de colonias lo presentó el suero de leche de procedencia tradicional con  $8,1E+10$ . Valores altos comparados con los reportados por Enrique et al. (2018) con  $38E+02$  UFC/mL de levaduras procedentes de lactosuero de procedencia tradicional, considerando además, que las muestras evaluadas no cumplen con los parámetros microbiológicos del Ministerio de Salud de Colombia y esto debido según explica, probablemente sea por el método de elaboración empleado en el alimento o subproducto. La evaluación

En el día 7 se notó una disminución en el crecimiento de bacterias aerobias tanto del suero de leche de procedencia tradicional como el de procedencia artesanal con valores de  $4,31E+07$  UFC/mL y  $2,20E+07$  UFC/mL respectivamente. Enrique et al. (2018) afirma que el desarrollo de los microorganismos está influenciado por las condiciones del tiempo, temperatura, condiciones ambientales inadecuadas, elaboración del subproducto entre otros, esto debido a que la elaboración de los quesos carecen de procesos de pasteurización.

Para el recuento de hongos y levaduras se obtuvo que el valor más alto lo presentó el suero de leche de procedencia tradicional con  $9,9+08$  UFC/mL y el

valor más bajo lo presentó el suero de leche de procedencia artesanal con  $6,4E+08$  UFC/mL evidenciando que hubo una disminución en el recuento de los mismos comparados con los del día 0. Gharsallaoui et al. (2016) explica que la adición de la nisina a la leche antes de la esterilización aumenta la vida útil con o sin refrigeración, por lo que la actividad de la nisina en combinación con el tratamiento térmico inhibe el crecimiento de los microorganismos.

### **Interacción entre el Factor A (Concentración) y Factor B (Temperatura).**

#### **Con respecto al pH**

En el estudio de las distintas concentraciones de nisina aplicadas a suero lácteo y la evaluación de la variable pH en la interacción (AxB) de acuerdo a la prueba de significancia Tukey ( $P>0.05$ ) se determinó lo siguiente:

En el día 0 se evidenció que el valor más alto de pH fue en la interacción entre la concentración de nisina de 200 ppm y temperatura de refrigeración con 5,76 y el menor valor de pH fue de 5,57 existente en la interacción entre la concentración de nisina de 100 ppm y temperatura ambiente. Datos que no cumplen con los parámetros establecidos para pH del suero de leche líquido establecido por la NTE INEN 2594 (2011). Por lo que según Negri (2005) este incumplimiento pudo haberse dado por que el pH es altamente dependiente de la temperatura y las variaciones de temperatura causan muchos cambios en el sistema buffer de la leche.

Respecto al día 1 el mayor valor de pH fue de la interacción concentración de nisina de 50 ppm y temperatura de refrigeración con 5.82 ,y el menor valor de pH obtenido fue entre la interacción concentración de nisina de 100 ppm a temperatura ambiente con 4,51. Datos que contrastan a los establecidos por Ramirez (2010) siendo estos mayores, el cual evidenció que en

el día 1 obtuvo un valor alto de pH en la interacción entre concentración de nisina a 250 ppm y temperatura de refrigeración con pH de 6.54, así como el menor valor de pH entre la interacción de concentración de nisina a 250 ppm y temperatura ambiente con 6,41.

Para el día 2 se observó que los tratamientos a temperatura ambiente tendieron a disminuir el pH más rápidamente teniendo que el mayor valor de pH fue dado entre la interacción concentración de nisina a 100 ppm y temperatura de refrigeración con 5.84 y el menor valor de pH se encontró en la interacción entre la concentración de nisina de 100 ppm y la temperatura ambiente con un pH de 4.16. Posiblemente esto sucede por lo que según Cano-Serna et al.(2015) la nisina al ser ácida por naturaleza es estable a un pH ácido siendo más soluble a pH de 2.0 e irreversiblemente estable a un pH de 7.0; Por lo tanto, su solubilidad aumenta al incrementar la temperatura y disminuir el pH.

Para el día 3 se obtuvo que el mayor valor de pH lo presentó la interacción comprendida entre la concentración de nisina a 200 ppm y temperatura de refrigeración con pH de 5.61 y el menor valor de pH se observó en la interacción concentración de nisina 100 ppm y temperatura ambiente con pH de 4.09. Así mismo (Ramirez, 2010) en su estudio determinó que el valor más alto de pH lo obtuvo de la interacción entre la concentración de 250 ppm y temperatura de refrigeración con pH de 6.41 y el menor valor fue dado en la interacción entre concentración a 250 ppm y temperatura ambiente con pH de 6.14. Por lo que Vinicio (2010) establece que en los resultados de pH con tratamientos en refrigeración la acción de la nisina es más eficiente, ya que la caída del pH que se da a lo largo de los días, luego tiende a estabilizarse y de este modo se prolonga la conservación del suero por la inhibición de bacterias

propias y extrañas del suero. En cambio, en los tratamientos a temperatura ambiente tienden a bajar su pH de forma rápida y de este modo se puede observar el efecto de la nisina sobre la estabilidad del pH en las muestras.

Con respecto al día 4 el valor más alto fue en la interacción entre la concentración de nisina a 100 ppm y temperatura de refrigeración con un pH de 5,78 y el menor valor entre la interacción de concentración de 100 ppm y 200 ppm a temperatura ambiente con pH de 3,99. Por lo que se puede evidenciar que los datos de pH no se encuentran dentro de los rangos aceptables mostrando que el suero se encuentra demasiado ácido tal como lo establece Ramirez (2010) en el que obtuvo que a un pH mínimo de 5.04 con la interacción de concentración de nisina de 50 ppm y temperatura ambiente, valor que tampoco se apega al rango establecido por (NTE INEN 2594, 2011). Y Esto debido a que según Vinicio (2010) la combinación de las concentraciones más altas de nisina y temperaturas bajas, ayudan de manera efectiva en la conservación del suero, pero mostrando de cierta forma un sobrenadado por la inestabilidad de la proteína a pH bajo.

Con respecto al día 7 se pudo evidenciar un descenso de pH lento en relación con el día 4 obteniendo de este modo el mayor valor de pH de 5,56 proveniente de la interacción entre la concentración de nisina de 100 ppm y la temperatura de refrigeración, y un menor valor de pH de 3,94 proveniente de la interacción entre las concentraciones de nisina de 100 y 200 ppm y temperatura ambiente, valores que con el pasar del tiempo formaron un suero más ácido. Sin embargo Vinicio (2010) determina que en el último día del análisis los tratamientos a temperatura ambiente el efecto de inhibición de la nisina no tuvo resultados favorables en la conservación del suero debido a que obtuvo un

promedio de pH de 3.5 y en aquellos tratamientos donde se aplicaron altas concentraciones de nisina a temperatura de refrigeración en cambio el suero se conservó de manera eficaz debido a que el pH no disminuye a valores inferiores de 4.

### **Con respecto a la acidez**

En el día 0 la concentración de 100 ppm y temperatura de refrigeración refleja un menor valor de acidez con un porcentaje de 0,21% en tanto que el mayor valor se lo atribuye a 200 ppm y temperatura ambiente. De acuerdo a los valores obtenidos en cuanto a las interacciones de concentraciones de nisina y temperatura ambiente y refrigeración se evidencian que en este día no existe un efecto evidenciable de dichos factores por tratarse del primer día de experimentación (Ramirez, 2010).

En el día 1 las concentraciones de 50, 100 y 200 ppm a una temperatura de refrigeración reflejan un incremento en la acidez considerable que va de 0,20% a 0,25% comparado con los tratamientos a temperatura ambiente cuyo incremento de acidez entre el día 0 y 1 resultó ser mucho mayor, situación que se contrasta a lo reportado por (Ramirez, 2010).

En el día 2 las concentraciones de 50, 100 y 200 ppm a temperatura de refrigeración reflejaron una acidez de 0,24-0,25% comparado con todas las interacciones de concentración y temperatura ambiente cuyos valores incrementaron bruscamente a un rango de 0,52 a 0,59%, aspecto que se presenta de forma similar en el estudio desarrollado por (Ramirez, 2010).

En el día 3 las concentraciones de 50,100 y 200 ppm a temperatura de refrigeración reflejaron una acidez de 0,23% en comparación con las

concentraciones de 50,100 y 200 ppm a temperatura ambiente que tuvieron un incremento de 0,58-0,60% de acidez. Los valores de acidez con porcentaje más alto los presentaron aquellos tratamientos a temperatura ambiente tal como lo reporta (Ramirez, 2010).

En el día 4 todas las concentraciones a una temperatura de refrigeración mantuvieron un incremento gradual a una acidez de 0,26%. Por otro lado, la combinación de todas las concentraciones analizadas frente a una temperatura ambiente refleja un aumento brusco de acidez, aspecto similar al que lo reporta (Ramirez, 2010).

En el día 7 las concentraciones de 50,100 y 200 ppm con una temperatura de refrigeración tuvieron una acidez de 0,24-0,26% en tanto que la combinación de todas las concentraciones evaluadas frente a una temperatura ambiente alcanzaron a tener una acidez muy alta que llegó a los 0,80% indicando así que la nisina a esa temperatura no actúa de forma eficiente en la conservación del lactosuero (Ramirez, 2010).

### **Interacción entre el Factor A (Concentración) y Factor C (Procedencia)**

#### **Con respecto a pH**

Para el día 0, la interacción entre la concentración de nisina 100 y 200 ppm y la procedencia tradicional se obtuvo que el valor más alto de pH fue de 6.36 y según a Alava Viteri, Gómez de Illera, & Maya Pantoja (2014) los valores de pH en suero mayores a 6.0 son característicos de sueros dulces obtenidos por coagulación enzimática, además afirman que este valor es cercano a los de la leche fresca (6.60) lo que obedece a que dicho suero fue de procedencia de un queso fresco elaborado con leche pasteurizada. Por otro lado, el menor valor de pH fue obtenido de la interacción entre la concentración de 100 ppm y

procedencia artesanal (leche sin pasteurizar) con un pH de 4.91, valor que no se encuentra dentro de los parámetros que establece la norma y que podría deberse según Paredes et al. (2014) al uso del tipo de cultivo láctico empleado para la elaboración del queso, así como al método de almacenamiento del suero posterior a su obtención.

Para el día 1 se obtuvo que el mayor valor de pH fue dado entre la interacción concentración 50 ppm y procedencia tradicional con 5.76 el mismo no se ajusta a los parámetros establecidos por la norma. No obstante se debe tomar en cuenta que según Aly, Flourey, Piot, Lortal, & Jeanson (2012) la disminución del pH mejora la eficacia de la nisina en medios líquidos. Por otro lado, se obtuvo que el menor valor de pH fue dado en la interacción entre la concentración de nisina de 100 ppm y procedencia artesanal con un pH de 4.80 y según Enrique et al.(2018) este valor se acerca al pH (5.7) que es característico de sueros obtenidos de la coagulación enzimática de la leche, lo que obedece a que dicho suero es proveniente de quesos elaborados con leche sin pasteurizar y un suero dulce es pobre en ácido láctico.

Respecto al día 2 se observó un gran descenso del pH en relación al día 1 y se obtuvo que el valor más elevado de pH fue de la interacción entre la concentración de nisina de 50 ppm y procedencia tradicional con pH de 5.39, resultado ligeramente bajo al reportado por Vinicio (2010) que mostró un valor de 5.6 y que según Gharsallaoui et al. (2016) la nisina tiene mayor estabilidad bajo condiciones ácidas, además establece que la nisina puede ser usada con otros tratamientos como la pasteurización para contrarrestar con éxito las esporas resistentes al calor de bacterias termófilas ácidas. En cambio, el menor

valor de pH fue obtenido en la interacción entre la concentración de nisina de 50 ppm y procedencia artesanal con pH 4.55

Para el día 3 se pudo notar un ligero descenso del pH en relación con el día 2, y que según Vinicio (2010) fue causado por la eficiencia de acción de la nisina a lo largo de los días la cual tiende a estabilizarse y de este modo prolonga la conservación del suero inhibiendo bacterias propias y extrañas. Así se obtuvo que el máximo valor de pH fue dado en la interacción entre la concentración de nisina 50 ppm y 200 ppm y la procedencia tradicional con pH de 5.12 cada una y un valor mínimo dado en la interacción entre la concentración de nisina de 50 ppm y procedencia artesanal con pH de 4.51 valor considerado muy bajo. Por lo tanto, todos los valores de pH obtenidos en este día de estudio estuvieron fuera del rango establecido por la norma INEN para suero de leche.

Para el día 4 se obtuvo un valor máximo de pH entre la interacción de concentración de nisina a 50 ppm y procedencia tradicional con pH de 5.24. Ramirez (2010) explica según fuentes bibliográficas que el valor mínimo de pH para suero dulce de leche debe ser de 5.8 por lo que el valor obtenido es mucho menor que este. Por otro lado, el valor mínimo de pH fue dado en la interacción entre la concentración de nisina de 50 ppm y procedencia artesanal con pH de 4.36 valor menor al reportado por Ramirez (2010) siendo este obtenido con la misma concentración de nisina (50 ppm).

Para el día 7 los resultados encontrados con la interacción de procedencia artesanal el efecto inhibitorio de la nisina no tuvieron resultados favorables en la conservación del suero debido a que estos son muy bajos y no se encuentran dentro de los parámetros establecido por NTE INEN 2594 (2011).



Paredes et al. (2014) establece que esto pudo haberse debido por el tipo de cultivo láctico empleado en la elaboración del queso, y la práctica de pasteurización que en el caso de procedencia artesanal no fue realizado, por lo tanto, era evidente que el valor de pH se encuentre fuera de los límites indicados lo que sugiere que los sueros no fueron almacenados ni manejados de la manera adecuada. Lo mismo ocurrió con los resultados obtenidos de las interacciones entre la concentración de nisina y la procedencia tradicional donde el máximo valor de pH fue el obtenido de la interacción entre la concentración de nisina a 50 ppm y la procedencia tradicional con pH de 5.17.

### **Con respecto a acidez**

En el día 0 se observó que las concentraciones de 50 ppm, 100 ppm y 200 ppm con la procedencia tradicional apuntaban valores cercanos a 0,13% de acidez tomando en cuenta que de acuerdo a la norma NTE INEN 2594:2011 indica que está dentro de los parámetros en cuanto a suero de leche dulce. Por otro lado, las interacciones de todas las concentraciones evaluadas y la procedencia artesanal indican un valor de 0,34% de acidez lo que corresponde a un valor alto tomando como referencia la norma NTE INEN 2594:2011 por aspectos mencionados anteriormente.

En el día 1 se evidenció que la interacción 50 ppm y procedencia tradicional obtuvo un valor menor en su acidez 0,20% y el valor más alto lo atribuyeron todas las interacciones analizadas con procedencia artesanal indicando así que el porcentaje de acidez a partir del día 1 varía de acuerdo al tratamiento aplicado.

En el día 2 la interacción 50 ppm y procedencia tradicional indicaron un menor porcentaje de acidez (0,27%) en tanto que las interacciones de 50,100 y 200 ppm y procedencia artesanal reflejaron los mayores valores en la acidez.

En el día 3 se percibió la misma situación, la concentración de 50 ppm y procedencia tradicional indicó un valor menor de acidez (0,30%) y todas las concentraciones con procedencia artesanal reflejan valores más altos en cuanto a su acidez (0,47-0,51%).

En el día 4 todas las concentraciones estudiadas con la procedencia tradicional indican valores menores de acidez (0,35-0,40%) comparado con las interacciones de 50 ppm, 100 ppm y 200 ppm con procedencia artesanal.

En el día 7 se presentó la misma situación donde las concentraciones de 50, 100 y 200 ppm con procedencia tradicional presentaron valores menores de acidez (0,34-0,39%) comparados con las interacciones de 50, 100 y 200 ppm cuyos valores de acidez oscilaron entre 0,63-0,68%.

### **Interacción entre el Factor B (Temperatura) y Factor C (Procedencia)**

#### **Con respecto a pH**

De acuerdo a la prueba de significancia Tukey ( $P > 0.05$ ) realizada para la evaluación de la variable pH en la interacción (BxC) se determinó lo siguiente:

Para el día 0, la interacción entre la concentración temperatura ambiente y procedencia tradicional obtuvo el valor más alto de pH con 6.38 el cual no cumple con el rango establecido por la norma NTE INEN 2594. Y según Alava Viteri et al. (2014) los valores de pH en suero mayores a 6.0 son característicos de suero dulce muy probablemente dicho suero proviene de queso fresco elaborado con leche pasteurizada.

Para el día 1 se obtuvo que el valor más alto de pH fue con la interacción entre la temperatura de refrigeración y la procedencia tradicional con pH de 6.43. que al ser comparados con los reportados por (Ramirez, 2010) se encuentran dentro de rangos aceptables. Por otro lado, se obtuvo que el menor valor de pH fue dado en la interacción entre la temperatura ambiente y la procedencia artesanal con un pH de 4.43, valor que no se ajusta al rango permitido, por lo que se puede comprobar que la nisina fue poco efectiva en este tratamiento debido a que según Gharsallaoui et al.(2016) la actividad de la nisina es altamente estable a bajas temperaturas y esta actividad puede perderse si el péptido se calienta por tiempo alargado.

Para el día 2 se obtuvo que en la interacción entre la temperatura de refrigeración y la procedencia tradicional con pH de 6.46 cumple con los parámetros establecidos por la norma NTE INEN 2594 y comparándolos con los obtenidos Ramirez (2010) son datos que se asemejan. Además, se obtuvo que en la interacción entre la temperatura ambiente y procedencia artesanal el pH fue el más bajo con 4.12 y según Chacón Gurrola, Chávez Martínez, Rentería Monterrubio, & Rodríguez Figueroa ( 2017) el descenso del pH pudo deberse a la composición del lactosuero ya que este depende de la etapa de lactancia, especie, alimentación, raza del animal, estación del año y principalmente las técnicas de elaboración del queso del cual proviene.

En cuanto al día 3, se obtuvo que el valor más alto de pH fue de 6.06 dado por la interacción entre temperatura de refrigeración y procedencia artesanal, por lo que es un valor que aún se mantiene dentro de los rangos aceptables de pH a pesar de que no cumplen por lo establecido por la norma NTE INEN 2594; sin embargo, comparados con los datos reportados por

Ramirez (2010) cuyo promedio de pH va de 6.14 a 6.41 en el día 3 y tratados a temperatura de refrigeración, estos difieren levemente a los ya antes mencionados. En cambio, se obtuvo que la interacción entre de temperatura ambiente y procedencia artesanal con pH de 4.08 presentó el valor más bajo, mismo que no cumple con los parámetros establecidos por la norma. Debido probablemente a que según Gharsallaoui et al. (2016) hubo pérdida de actividad de la nisina ya que las muestras fueron sometidas a temperatura ambiente y la nisina es altamente estable a temperaturas bajas.

Respecto al día 4 se obtuvo que el valor de pH que aún se mantiene dentro de los parámetros aceptables pero que esta fuera del rango establecido por la norma, es el que presentó la interacción entre la temperatura de refrigeración y la procedencia tradicional con pH de 6.39 y comparados con los obtenidos De la Cruz González et al. (2018) en el que un 15% de las muestras que se analizaron tuvieron valores por debajo de los permite la norma y esto debido a que posiblemente el pH inicial de la leche a pesar de que Alava Viteri et al. (2014) afirme que los valores de  $\text{pH} < 6.0$  son normales para este tipo de lactosuero. Por otro lado, en la interacción Temperatura ambiente y procedencia artesanal se obtuvo un pH de 3.95. y según Negri (2005) se obtuvo este valor probablemente debido a que el pH es altamente dependiente de la temperatura, donde el pH disminuye en promedio 0,01 unidades por cada  $^{\circ}\text{C}$  que aumenta.

Para el día 7 se obtuvo que la interacción entre la temperatura de refrigeración y procedencia tradicional presentó el valor más alto de pH con 6.08 valor que está dentro de la clasificación mencionada por Parra Huertas (2009) para lactosuero dulce, quien establece un rango de pH para este tipo de lactosuero entre 5.6 y 6.6. En cambio, el valor más bajo de pH se obtuvo de la

interacción entre la temperatura ambiente y procedencia artesanal con pH de 3.73 valor que no es considerado como aceptable, además no cumple con la norma; debido a que según Gharsallaoui et al. (2016) la actividad de la nisina es altamente estable a bajas temperaturas sobre todo durante el proceso de refrigeración. Y en este caso las muestras estuvieron bajo temperatura ambiente.

### **Con respecto a la acidez**

En el día 0 las interacciones: temperatura de refrigeración y procedencia tradicional así como temperatura ambiente procedencia tradicional obtuvieron los mismos valores de acidez (0,13%) valores que se encuentran dentro de los parámetros establecidos por la norma NTE INEN 2594:2011 en tanto que las interacciones de temperatura de refrigeración y procedencia artesanal así como temperatura ambiente y procedencia artesanal obtuvieron valores de 0,32 y 0,35% respectivamente, valores que no se ajustan a lo establecido por la norma NTE INEN 2594:2011 sin embargo se hizo la respectiva justificación anteriormente.

En el día 1 se presentó la interacción de temperatura de refrigeración con procedencia tradicional con el menor valor de acidez 0,15% en tanto que la interacción temperatura ambiente con procedencia artesanal tuvo un mayor incremento en cuanto a su acidez (0,58%).

En el día 2 la situación en cuanto a la temperatura de refrigeración con procedencia tradicional siguió manteniendo un valor menor en cuanto a su acidez 0,14% a diferencia de la temperatura ambiente con procedencia artesanal teniendo un incremento mucho más alto en cuanto a su acidez (0,63%).

En el día 3 la temperatura de refrigeración y procedencia tradicional indicó un valor de 0,13% a diferencia de la temperatura ambiente y procedencia artesanal que obtuvo un incremento mayor (0,64%).

En el día 4 la temperatura de refrigeración y la procedencia tradicional apuntó un valor de 0,14% a diferencia de la temperatura ambiente y procedencia artesanal 0,76% cuyo valor fue mucho mayor con respecto a los días anteriores.

En el día 7 la temperatura de refrigeración y procedencia tradicional reflejaron un valor de 0,14% en comparación con la temperatura ambiente y procedencia artesanal que indicaban un valor mucho más alto comparado con las demás interacciones (0,97%).

Como bien se pudo notar, la temperatura de refrigeración en los tratamientos permitió que la acidez se incremente de forma gradual conforme pasan los días, a diferencia de los tratamientos que se mantuvieron en conservación a temperatura ambiente que tuvieron un incremento brusco en su acidez conforme pasan los días. Por otro lado, la procedencia del lacto suero contribuyó también a que los valores iniciales sean menores.

### **Interacción A\*B\*C**

#### **Con respecto al pH**

En el estudio de las distintas concentraciones de nisina aplicado a suero de leche y evaluación de la variable pH para la interacción (AxBxC) y de acuerdo a la prueba de significancia Tukey ( $P > 0.05$ ) se determinó lo siguiente:

Las interacciones Concentración de nisina 100 ppm-T. ambiente-P. tradicional y Concentración de nisina 200 ppm- T. ambiente- P. Tradicional para el día 0 presentaron un pH de 6,40 y con un 16,6% de las muestras cumplen

con la norma NTE INEN 2594 (2011) . De la Cruz González et al.(2018) afirman que el 85% de las muestras analizadas cumplieron con la norma para suero líquido el cual presentó valores entre 6.8 y 6.4.

Con respecto al día 1 que las interacciones de concentración de nisina 50 ppm-T. refrigeración - procedencia tradicional destaca en presentar resultados satisfactorios que se encuentran dentro de los parámetros que establece NTE INEN 2594 (2011) con pH de 6.45. Alava Viteri, Gómez de Illera, & Maya Pantoja (2014) afirman que los valores de pH mayores a 6.0 son característicos de sueros dulces obtenidos por coagulación enzimática de la leche. Además, el pH de las muestras de suero analizadas se asemeja al pH de leche fresca posiblemente debido a que dicho suero proviene de queso fresco elaborada con leche pasteurizada. Por otro lado Ramirez (2010) establece que el pH es inversamente proporcional a la temperatura, ya que la temperatura contribuye a disminuir el pH.

Respecto al día 2 se obtuvo que el valor de pH 6.49 de la interacción concentración de nisina 100 ppm-T.refrigeración-procedencia tradicional destacó por ser el valor de pH más alto, mismo que se encuentra dentro del rango establecido por la norma INEN NTE 2594. Un valor muy similar obtuvo Ramirez (2010) con un pH de 6.44 en el día 2 en la misma concentración de nisina (100 ppm) y temperatura (refrigeración) el cual establece que “lo mayor es mejor”, es decir que interesa más un valor promedio de pH alto. En cambio, Paredes et al.(2014) afirman que la procedencia del suero influye mucho su conservación ya que existen muchos factores que afectan la calidad del suero siendo estos el proceso de manufactura, calidad inicial de la leche y tipo de almacenamiento. Además, se debe tomar en cuenta los factores que influyen en la estabilidad y

solubilidad de la nisina por lo que Gharsallaoui et al. (2016) establece que la nisina es más estable a bajas temperaturas.

Respecto al día 3, el valor más alto de pH con 6.11 fue el de la interacción concentración de nisina 200 ppm-temperatura de refrigeración y procedencia tradicional. Valor que continúa siendo aceptable para suero dulce de leche según Alava Viteri et al. (2014) ya que afirman que un  $\text{pH} > 6.0$  es normal para este tipo de lactosuero; sin embargo, no cumple con los parámetros establecido por la norma y según De la Cruz González et al. (2018) esto posiblemente se deba al pH inicial de la leche, como la capacidad de la lactosa para transformarse en ácido láctico a medida que avanza el tiempo lo que pudo originar la fermentación de la lactosa por los microorganismos y de este modo aumentar su acidez y disminuir su pH.

Para el día 4 se obtuvo que en la interacción entre concentración de nisina 100 ppm-temperatura de refrigeración-procedencia tradicional presentó un pH de 6.44 siendo este el que cumple con los rangos que establece la NTE INEN 2594 (2011) por lo que para este día se considera como el mejor tratamiento aplicado al lactosuero, ya que comparando con los resultados obtenidos por De la Cruz González et al. (2018) con valores de 6.8 y 6.4 son muy similares a pesar de que no se aplicó ningún conservante. Sin embargo, Ramirez (2010) obtuvo un pH de 6.35 con una concentración más baja de nisina (50 ppm) a temperatura ambiente.

Para el día 7 se obtuvo un pH de 6.13 de la interacción entre concentración de nisina 100 ppm-temperatura de refrigeración-procedencia tradicional valor que está dentro de lo aceptable para este tipo de suero pero no cumple con lo establecido por la norma según De la Cruz González et al. (2018),



y con el transcurso los días el pH tuvo descenso en relación a los días anteriores, por lo que Cano-Serna et al. (2015) sugiere que la nisina pierde efectividad, por la interacción con glóbulos de la grasa y proteínas presentes en el alimento, pH y temperatura de almacenamiento, puesto que la eficacia de la nisina en productos lácteos, sólo puede mantenerse por corto tiempo.

### **Con respecto a la acidez**

En el día 0 todas las interacciones que cuya procedencia fue tradicional empezaron los valores más bajos en cuanto a acidez (0,13%) encontrándose dentro de los parámetros que indican la norma NTE INEN 2594:2011 en tanto que la interacción de 200 ppm, temperatura ambiente y procedencia artesanal obtuvo el valor más alto en su acidez (0,36%). La variación de acidez con respecto a los tratamientos en este día corresponde a la procedencia del lactosuero por ser el primer día de experimentación de acuerdo a (Ramirez, 2010). Tomando en cuenta que la procedencia tradicional incluyó un proceso de pasteurización en la elaboración del queso aspecto que de acuerdo a (Paredes et al., 2014) mantiene a la acidez en las normas adecuadas cuyo límite indica que no debe ser mayor al 0,16% en tanto que la procedencia artesanal por su porcentaje de acidez mayor indica que los sueros no son almacenados ni manejados de una forma adecuada (Paredes et al., 2014).

En el día 1 se pudo evidenciar que las interacciones: 100 ppm\* temperatura de refrigeración\* procedencia tradicional, 50 ppm\*temperatura de refrigeración\*procedencia tradicional y 200 ppm\*temperatura de refrigeración\*procedencia tradicional, tuvieron un incremento gradual de la acidez. Esto indica que por un lado, la nisina se va potencializando en la

conservación al haber sido aplicado en un medio de tipo líquido donde se va distribuyendo de manera homogénea (Cano-Serna et al., 2015).

En el día 2 se presentó una situación similar, en donde las concentraciones de 50, 100 y 200 ppm a una temperatura de refrigeración y procedencia tradicional mantienen niveles de acidez que se encuentran dentro de la norma NTE INEN 2594:2011. Por otro lado, las concentraciones de 50, 100 y 200 ppm a una temperatura ambiente y de procedencia artesanal reflejaron mayores valores en cuanto a su acidez (0,63%).

Para el día 3 se observó que las concentraciones de 50, 100 y 200 ppm a temperatura de refrigeración y procedencia tradicional mantuvieron sus valores de acidez dentro de rangos permitidos por la norma NTE INEN 2594:2011. Por otro lado, la concentración de 50 ppm a temperatura ambiente y procedencia artesanal refleja un mayor incremento en su acidez comparado con los demás tratamientos.

Para el día 4 se observó que las concentraciones de 50, 100 y 200 ppm a temperatura de refrigeración y procedencia tradicional mantuvieron los valores de acidez dentro del límite permitido por la norma NTE INEN 2594:2011, además de ello se puede mencionar que los tratamientos de temperatura de refrigeración y procedencia artesanal tuvieron un comportamiento en cuanto a su incremento gradual a comparación de los tratamientos con temperatura ambiente que reflejaron valores mucho más altos en cuanto a acidez, aspecto similar reportado por (Vinicio, 2010) y (Ramirez, 2010).

En el día 7 se volvió a reflejar que las concentraciones de 50, 100 y 200 ppm a temperatura de refrigeración y procedencia tradicional mantuvieron los

valores de acidez dentro de los parámetros establecidos por la norma NTE INEN 2594:2011 en tanto que las concentraciones combinadas a una temperatura ambiente y procedencia artesanal generaron valores mucho más altos indicando de acuerdo a (Vinicio, 2010) que se generó el efecto de inhibición de la nisina en aquellos tratamientos sometidos a refrigeración. Por otro lado, para la generación de cualquier producto a partir de lactosuero siempre es primordial contar con un suero de características dulces cuya acidez debería encontrarse en las normas establecidas de tal manera que procesos posteriores en los que se emplee como materia prima se vea afectado de manera mínima en la variación de la acidez como lo menciona (Montesdeoca Párraga & Piloso Chávez, 2020) por lo que los tratamientos de 50, 100 y 200 ppm a una temperatura de refrigeración con procedencia tradicional indican adecuados valores en este estudio. En una investigación que menciona (Cano-Serna et al., 2015) determinan que la eficacia de la nisina es capaz de mantenerse en un periodo de tiempo corto debido a que la bacteriocina aplicada puede interactuar con las moléculas tanto de grasa como de sus proteínas así también se mencionó que una temperatura de refrigeración es un factor clave para evitar que se proliferen con mayor facilidad aquellos microorganismos patógenos y tomando en cuenta que el incremento de la acidez a lo largo del tiempo puede deberse al posible crecimiento de microorganismos como lo menciona (Rodriguez & Playas, 2016). Por otro lado, la procedencia del lactosuero fue un factor determinante en la acidez pues aquellos de procedencia tradicional a partir del día 0 indicaron valores que se encuentran dentro de las norma NTE INEN 2194:2011 tomando en cuenta que la leche empleada para la producción de queso fue previamente pasteurizada y controlada en comparación con los tratamientos de procedencia tradicional que reflejaron valores mayores lo que de

acuerdo a (Sangronis & García, 2007) en su estudio determinaron que a partir de la leche cruda empleada para la producción de queso no se tuvo un proceso adecuado en cuanto al control de su temperatura y el proceso de manufactura lo que pudo ocasionar un incremento notable en los valores de la acidez del lactosuero.

### **Con respecto a UFC**

En el estudio de las distintas concentraciones de nisina aplicado al suero de leche y la evaluación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL de bacterias aerobias, hongos y levaduras, para la interacción (AxBxC) y de acuerdo a la prueba de significancia de Tukey ( $p > 0,05$ ) se determinó lo siguiente:

Para el día 0, las interacciones concentración de nisina de 100 ppm-T. Refrigeración-P. Tradicional mostraron los valores más bajo de recuento de colonias de bacterias aerobias con  $1,5E+07$ . Jama (2017) menciona que las empresas presentan poco crecimiento de los microorganismos es debido a que poseen un manejo adecuado de los productos y subproductos lácteos. Y los valores más altos en el recuento de las colonias lo mostró la interacción entre la concentración de nisina 200 ppm-T. Ambiente-P. Artesanal, concentración de nisina 50 ppm-T. Ambiente-P. Artesanal y concentración de nisina 100 ppm-T. Refrigeración-P. Artesanal con  $2,05E+09$  UFC/mL. Jama(2017) explica que las bacterias aerobias se pueden proliferar rápidamente debido al tiempo que transcurra en la transportación del subproducto para llegar al tanque de enfriamiento y la falta de aseo e higiene durante el proceso de producción. Además, cabe notar que estos datos no se ajustan a los que establece la norma NTE INEN 2594 (2011).

En cuanto al recuento de hongos y levaduras se obtuvo que en la interacción concentración de nisina 100 ppm-T. Refrigeración-P. Tradicional con  $4,95E+09$  UFC/mL presentó el valor más bajo de recuento de colonias. Valor alto comparado con el reportado por Jama, (2017) mismo que fue de  $107E+05$  UFC/mL, el cual establece que ninguno de estos valores se encuentran dentro de la norma de Cuba NC585 ya que indica que el límite máximo permitido es de  $2E+02$  UFC/mL. Por otro lado, el valor máximo de recuento de colonias lo presentó la interacción concentración de nisina 100 ppm-T. Ambiente-P. Artesanal con  $2,49E+11$  UFC/mL. Según Jama (2017) la contaminación de hongos es probable que sea debido a las malas condiciones higiénicas de preparación y conservación del subproducto.

Para el día 7 en el recuento de bacterias aerobias se encontró que el valor más bajo fue el de la interacción concentración de nisina 100 ppm-T. Refrigeración-P. Tradicional con  $1,45E+07$  UFC/mL, por lo que al comparar con el valor obtenido en el mismo tratamiento en día 0, se encuentra que existe disminución en la proliferación de los microorganismos y esto debido a que según Gharsallaoui et al. (2016) la adición de la nisina al producto lácteo permite controlar la contaminación microbiana ya que a una concentración de 100 mg/Kg. inhibe por completo las esporas y la combinación de la nisina con los tratamientos térmicos resultan ser aún más efectivos para la inhibición de los microorganismos.

En cuanto al recuento de población microbiana de hongos y levaduras se obtuvo que en la interacción concentración de nisina 50 ppm-T. Refrigeración-P. artesanal se encontró el valor más bajo con  $3,5E+07$  UFC/mL y al ser comparado con el valor obtenido con el mismo tratamiento en día 0 se identificó

que hubo una notable disminución de proliferación de los microorganismos. Según, Rodríguez Saucedá (2011) la mayoría de agentes antimicrobianos usados en los alimentos solo inhiben el crecimiento de bacterias y hongos, más no eliminan su crecimiento, por lo que el subproducto en este caso el suero de leche tiene una vida de anaquel restringida y es necesario que otros factores de conservación aumenten la vida media del producto.

## Capítulo VI

### Conclusiones y recomendaciones

#### Conclusiones.

##### Factor A (Concentraciones)

De acuerdo a los parámetros fisicoquímicos de pH, acidez y UFC en bacterias, hongos y levaduras analizados se concluye que una concentración de 100 ppm es más factible para la bioconservación del suero lácteo.

Teniendo en cuenta que para el factor A (Concentración) donde se encontraron diferencias significativas las variables analizadas se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que las distintas concentraciones de nisina aplicadas al suero de leche influyen en los parámetros de conservación.

##### Factor B (Temperatura de conservación)

Se concluye además que una temperatura de refrigeración brinda mejores resultados en cuanto a pH y acidez conforme pasan los días.

De acuerdo a los resultados obtenidos para el factor B (Temperatura de conservación) donde se encontraron diferencias significativas en las variables medidas se acepta la hipótesis alternativa y se concluye que la temperatura aplicada al suero de leche tratado con la bacteriocina nisina, influye en los parámetros de conservación.

##### Factor C (Procedencia)

De acuerdo a los parámetros fisicoquímicos evaluados en la procedencia del suero en grasa, proteína, ceniza, pH, acidez y UFC, la procedencia tradicional brindó mejores resultados aceptando así la hipótesis alternativa y concluyendo que el sistema de elaboración del queso influye en las

características del suero y su comportamiento en la conservación mediante la aplicación de la nisina.

### **Interacción A\*B\*C**

Se concluye que la interacción más óptima fue 100 ppm\*temperatura de refrigeración\*tradicional que se destaca porque mantiene sus variables de pH y acidez en rangos óptimos de acuerdo a las normas INEN NTE 2594 conforme pasan los días, así como también un porcentaje mayor de inhibición con respecto a los días 0 y 7 de la experimentación evidenciando un menor crecimiento de bacterias, hongos y levaduras.

### **Recomendaciones.**

Para una mejor conservación del suero de leche, se recomienda emplear la concentración de nisina de 100 ppm, pues mantiene a las muestras en condiciones adecuadas en cuanto a su pH y acidez de tal manera que estos parámetros evaluados son claves para generar otros productos según las normas INEN vigentes para suero de leche, así como para evitar la proliferación de microorganismos patógenos como mecanismo de bioconservación.

En cuanto a la conservación del suero de leche, se recomienda emplear una temperatura de refrigeración debido a que tiene mejores resultados en comparación con la temperatura ambiente, pues reflejó valores de pH y acidez que incrementaban gradualmente en comparación con la temperatura ambiente cuyos resultados incrementaban bruscamente conforme pasaban los días. Por otro lado, permite un mayor porcentaje de inhibición de microorganismos patógenos en el lactosuero.



Con respecto a la procedencia del suero, se recomienda emplear suero procedente de la elaboración tradicional ya que en su producción se emplea condiciones asépticas y parámetros controlados que garantizan el cumplimiento de la norma NTE INEN 2594 en cuanto a porcentaje de proteína, grasa, ceniza, pH y acidez y en cuanto a UFC de bacterias y hongos se asegura de que menos patógenos se encuentren dentro de la muestra en comparación con la procedencia de elaboración artesanal que al no contar con los suficientes equipos e instrumentos para llevar a cabo un proceso controlado sus valores de parámetros fisicoquímicos difieren en base a la norma NTE INEN 2594 así como también existe riesgo de contar con más agentes patógenos en la muestra.

Se recomienda a investigaciones futuras a probar lactosuero tratado con nisina en la realización de subproductos de tal forma que se evalúe el potencial de este subproducto lácteo como materia primera.

## Capítulo VII

### Bibliografía

Agrocalidad. (2017). *Laboratorio Control de Calidad de Leche*. 1–18.

Alava Viteri, C., Gómez de Illera, M., & Maya Pantoja, J. A. (2014). Caracterización físico-química del suero dulce obtenido de la producción de queso casero en el municipio de Pasto. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 1, 22. <https://doi.org/10.23850/24220582.110>

Alfaro, R., & Chang, E. (2017). *Evaluación de nisina y grasa en el crecimiento microbiano y propiedades físico-químicas de una bebida láctea con sabor a mango (Mangifera indica)*. 25.

Aly, S., Flourey, J., Piot, M., Lortal, S., & Jeanson, S. (2012). The efficacy of nisin can drastically vary when produced in situ in model cheeses. *Food Microbiology*, 32(1), 185–190. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.001>

Cano-Serna, D., Gómez-Marín, M. A., Oviedo-Gallego, V., & Rios-osorio, L. A. (2015). Nisina como conservante de alimentos : revisión sistemática de la literatura. *Hechos Microbiológicos*, 6, 52.

Chacón Gurrola, L., Chávez Martínez, A., Rentería Monterrubio, A., & Rodríguez Figueroa, J. (2017). Proteínas del lactosuero: usos, relación con la salud y bioactividades. *Interciencia: Revista de Ciencia y Tecnología de América*, 42(11), 712–718.

CODEX ALIMENTARIUS. (2019). Programa Conjunto Fao/Oms Sobre Normas Alimentarias Comité Del Codex Sobre Aditivos Alimentarios. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.

- De la Cruz González, E. G., Aquino Ruíz, E. L., Rocha, D. A., & Bonifaz, N. F. (2018). Estudio de la calidad físicoquímica y microbiológica del lactosuero de queso fresco proveniente de queseras artesanales de Cayambe - Ecuador. *Sathiri*, 13(2), 178. <https://doi.org/10.32645/13906925.764>
- De Meneses, R. B., Maclel, L. F., Da Rocha-Leão, M. H. M., & Conte-Junior, C. A. (2020). Physicochemical characteristics of milk by-products. *Chemical Engineering Transactions*, 79(March), 37–42. <https://doi.org/10.3303/CET2079007>
- Delves-Broughton, J. (2014). Bacteria: Nisin. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 1, 187–193. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00030-6>
- Delves-Broughton, J. (1990). Nisin and its application as a food preservative. *International Journal of Dairy Technology*, 43(3), 73–76. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1990.tb02449.x>
- Díaz, A., Barrio, M., Darré, M., López, M., Cofre, M., Condorí, M., ... Alcaide, C. (2017). Análisis Microbiológico De Los Alimentos Microorganismos Indicadores. *Anmat*, 3, 1–14. Retrieved from [http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/analisis\\_microbiologico\\_de\\_los\\_alimentos\\_vol\\_iii.pdf](http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/analisis_microbiologico_de_los_alimentos_vol_iii.pdf)
- El-Tanboly, E. (2017). Recovery of Cheese Whey, a by-Product from the Dairy Industry for use as an Animal Feed. *Journal of Nutritional Health & Food Engineering*, 6(5), 148–154. <https://doi.org/10.15406/jnhfe.2017.06.00215>
- Enrique, R., Becerra-jim, L., & Borr, L. M. (2018). Caracterización físico-química y microbiológica del lactosuero del queso paipa. *Ciencia y Agricultura*, 15(2), 99–106. <https://doi.org/10.19053/01228420.v15.2>

- Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C., & Degraeve, P. (2016). Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(8), 1262–1274.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2013.763765>
- Gorostidi, N. (2014). *Máster en Tecnología y Calidad en las Industrias Agroalimentarias*. 78.
- Heredia-Castro, P. Y., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, 42(6), 340–346.
- Ibarra-Sánchez, L. A., El-Haddad, N., Mahmoud, D., Miller, M. J., & Karam, L. (2020). Invited review: Advances in nisin use for preservation of dairy products. *Journal of Dairy Science*, 103(3), 2041–2052. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17498>
- Iniesta Planells, D. (2020). *Desarrollo De Nuevos Productos a Base De Suero De Queseria*. 32.
- Jama, A. (2017). Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito. *Tesis*, 1–10. Retrieved from <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Kaur, R., Panwar, D., & Panesar, P. S. (2020). Biotechnological approach for valorization of whey for value-added products. In *Food Industry Wastes*. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817121-9.00013-9>
- La cámara de comercio de Guayaquil. (2019). Prohibición Al Suero De Leche:Desperdicio,Informalidad Y Daño Ambiental. *Federación Nacional de Cámaras de Comercio Del Ecuador*, 1(1), 1.

- Liu, W., & Hansen, J. N. (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(8), 2551–2558. <https://doi.org/10.1128/aem.56.8.2551-2558.1990>
- Lopez, A. y Barriga, D. (2016). La leche. Composición y características. *Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera*, 16.
- Márquez, M. B. (2014). Cenizas Y Grasas. *Universidad Nacional de Sn Agustín*, 3–45.
- Molero-Méndez, M., Castro-Albornoz, G., & Briñez-Zambrano, W. (2017). Physicochemical characterization of whey obtained by cheese making process applying an artisanal method. *Revista Científica*, 27(3), 149–153.
- Mondragón Preciado, G., Escalante Minakata, P., Osuna Castro, J., Ibarra Junquera, V., Morlett Chávez, J., Aguilar González, C., & Rodríguez Herrera, R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*, 21(59), 64–70.
- Montesdeoca Párraga, R. R., & Piloso Chávez, K. (2020). Evaluación fisicoquímica del lactosuero obtenido del queso fresco pasteurizado producido en el taller de procesos lácteos en la Espam “MFL.” *Revista Ciencia y Tecnología El Higo*, 10(1), 2–10. <https://doi.org/10.5377/elhigo.v10i1.9921>
- Negri, L. (2005). El pH y la acidez de la leche. *Manual de Referencias Técnicas Para El Logro de Leche de Calidad.*, 2, 155–161.
- NTE INEN 2594. (2011). *Norma Técnica Ecuatoriana - Suero de Leche Líquido, requisitos*. 1–6.
- Paredes, P., Chávez, A., Rodríguez, J., Aguilar, N., Rentería, A., & Rodríguez, G.

- (2014). Propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de suero de leche de queso Chihuahua. *Investigación y Ciencia*, 22(62), 11–16.
- Parra Huertas, R. (2010). Review. bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 8(1), 93–105.
- Parra Huertas, R. A. (2009). Lactosuero: importancia en la industria de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 62(1), 4967–4982.
- Pasmay, H. (2015). “Caracterización del Suero Lácteo de una Quesería Artesanal, localizada en la Zona 5 del Ecuador.” 20–28.
- Poveda E., E. (2013). Suero lácteo, generalidades y potencial uso como fuente de calcio de alta biodisponibilidad. *Revista Chilena de Nutrición*, 40(4), 397–403.  
<https://doi.org/10.4067/S0717-75182013000400011>
- Ramirez, M. (2010). *Evaluación de la nisina en la vida útil del suero dulce de quesería*. Universidad Técnica de Ambato.
- Ricardo Enrique López Barreto, Mónica Liliana Becerra Jiménez, L. M. B. S. (2018). Physicochemical and microbiological characteristics of the Paipa cheese whey. *Ciencia y Agricultura*, 15(C), 99–106.  
[https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencia\\_agricultura/article/view/8565/7158](https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencia_agricultura/article/view/8565/7158)
- Riofrío Grijalva, R. F. (2014). *Caracterización de lactosuero proveniente de cuatro producciones de diferentes tipos de queso*. 74.  
<http://repositorio.usfq.edu.ec/jspui/bitstream/23000/3177/1/000110271.pdf>
- Rodríguez, A., & Playas, Y. (2016). *Incorporación de nisina encapsulada en alginato de calcio y lactosuero en un queso campesino*.

- Rodríguez Saucedo, E. N. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 153–170.  
<https://doi.org/10.35197/rx.07.01.2011.14.er>
- Sangronis, E., & García, J. (2007). Efecto de la adición de nisina en los parámetros físico, químicos sensoriales del queso “telita .” *20(3)*, 12–16.
- Sigma-Aldrich. (2021). *Nisin from Lactococcus lactis*. 1907, Accessed Nov 27 2014.
- Tafreshi, S. yed H., & Mirdamadi, S. (2015). Survey study of lipid effect on nisin nanoliposome formation and application in pasteurized milk as a food model. *Applied Food Biotechnology*, 2(2), 7–14. <https://doi.org/10.22037/afb.v2i2.8012>
- Técnica, N. (1983). -1- 1983-030. 1–7.
- Van der Schans (2002). *Valorización del suero*. Universidad de Ciencias Aplicadas del occidente, Departamento de tecnología de alimentos, Suiza.
- Vinicio, R. (2010). *Evaluación de la nisina en la vida útil del suero ácido de quesería*. Universidad Técnica de ambato.
- Yazici, F., Dervisoglu, M., Akgun, A., & Aydemir, O. (2010). Effect of whey pH at drainage on physicochemical, biochemical, microbiological, and sensory properties of Mozzarella cheese made from buffalo milk during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 93(11), 5010–5019. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2908>
- Zavala, J. (2005). Aspectos Nutricionales y Tecnológicos de la Leche. *Ministerio De Agricultura*, 1, 60. <https://cutt.ly/ad2AoPM>