



UNIVERSIDAD DEL AZUAY
DEPARTAMENTO DE POSGRADOS
GESTIÓN DE CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA II
“Estudio comparativo entre la utilización de Nisina y Metabisulfito de sodio para la inhibición de microorganismos en crema pastelera”

**TESIS PREVIA A LA
OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE MÁSTER EN GESTIÓN
DE CALIDAD Y
SEGURIDAD
ALIMENTARIA**

AUTORA:

Jéssica Maritza Guamán Bautista.

DIRECTORA:

María Fernanda Rosales Medina

Cuenca, Ecuador 2016

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional,
de manera especial a mi querida hermana Linda porque
ella es la inspiración que tengo para salir adelante.

A mi esposo e hijo quienes son las personas más.
importantes de mi vida

A la Ing. María Fernanda Rosales por su amistad,
paciencia y brindarme sus conocimientos.

AGRADECIMIENTO

A todos mis maestros, compañeros y amigos de manera especial a los estimados Ingenieros Mónica Tinoco, Claudio Sánchez y Johana Tacuri que aportaron con sus conocimientos a la culminación de este trabajo.

A mis padres que con su abnegación y cariño hicieron que acceda a la mejor herencia: la educación

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo definir las dosis efectivas de Nisina y Metabisulfito de sodio para inhibir microorganismos en crema pastelera; para lo cual se utilizó la prueba de sensibilidad o antibiograma, diluciones seriadas con la inoculación de *S. aureus* y *B.cereus*, y diluciones seriadas de bacterias totales. Se realizó además pruebas de evaluación sensorial al que se aplicó el principio de la prueba triangular.

Los resultados demuestran que la Nisina es efectiva permitiendo que la vida útil de la crema pastelera aumente hasta por 10 días con la reducción de 6 logs, además de que el sabor es imperceptible. Por otro lado, el Meta bisulfito de sodio resultó ineficaz, ya que a pesar de que fueron agregadas dosis superiores a los que permite la normativa no hubo inhibición de microorganismos.

PALABRAS CLAVE:

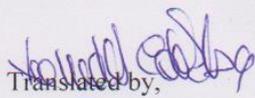
Bacteriocina, *B.cereus*, *S.aureus*, antibiograma, dosis seriadas.

ABSTRACT

This study aimed to define the effective dose of Nisin and sodium Metabisulfite to inhibit microorganisms in custard. For this purpose, the sensitivity or susceptibility test, serial dilutions inoculation with *S. aureus* and *B. cereus*, and serial dilutions of total bacteria were used. In addition, we performed sensory evaluation tests to which the principle of the triangular test was applied. The results show that Nisin is effective allowing the useful life of the custard to increase up to 10 days with 6 logs reduction, and additionally, the taste is imperceptible. On the other hand, Sodium Metabisulfite resulted ineffective even although doses higher than the allowed were applied; there was no inhibition of microorganisms.

KEYWORDS: Bacteriocin *B. Cereus*, *S. Aureus*, Sensitivity Testing, Serialized Doses.




Translated by,
Lic. Lourdes Crespo

INDICE DE CONTENIDO

Contenido	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOiii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT AND KEYWORDS	Error! Bookmark not defined.
INDICE DE CONTENIDO	vi
INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE TABLAS.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivo general:	6
Objetivos específicos:	6
2. CAPITULO 1 : MATERIALES Y MÉTODOS	7
1.1 Localización de estudio	7
1.2 Origen de las muestras.....	7
1.3. Recursos	7
1.3.1 Recursos humanos	7
1.3.2 Recursos institucionales	7
1.3.3 Recursos materiales	7
1.3.4 Preparación de Muestra	7
1.4 Antibiograma	8
1.4.1 Metodología utilizada con Nisina.....	8
1.4.2 Metodología utilizada con Metabisulfito.....	8
1.4.3. Diluciones Seriadas.....	9
1.4.4. Diluciones Seriadas de Bacterias Totales.....	10
1.5 Manejo Estadístico de los Datos	11
1.6 Pruebas Organolépticas	11
3. CAPÍTULO 2: RESULTADOS.....	12
2.1 Antibiograma con Nisina.....	12
2.2 Antibiograma con Metabisulfito.....	14
2.3 Diluciones Seriadas con Nisina	15
2.4 Diluciones Seriadas con Metabisulfito de Sodio	17
2.5 Diluciones Seriadas Bacterias Totales con Nisina	19

2.6 Pruebas Organolépticas.....	20
4. CAPÍTULO 3: DISCUSIÓN.....	21
5. CONCLUSIONES.....	24
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
7. ANEXOS.....	27

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura primaria de la Nisina. La flecha indica la sustitución del aminoácido que convierte la nisina A en la nisina Z.	4
Figura 2. Mecanismo acción de las bacteriocinas por formación de poros en la membrana bacteriana.	5
Figura 3. Stand McFarland 2.	9
Figura 4. Antibiograma.....	9
Figura 5. Diluciones Seriadas	10
Figura 6. Antibiograma <i>S.aureus</i> -nisina cuadro comparativo.	12
Figura 7. Antibiograma <i>B.cereus</i> -nisina.	13
Figura 8. Diluciones Seriadas <i>S.aureus</i> -1,125 gr Nisina.....	15
Figura 9. Diluciones seriadas <i>B.cereus</i> -0,125 gr Nisina.....	16
Figura 10. Diluciones seriada bacterias totales-0,125gr nisina.	19
Figura 11. Diluciones seriadas <i>S.aureus</i> -0,125 gr Metabisulfito de sodio.....	17
Figura 12. Diluciones seriadas <i>B.cereus</i> -0,125 gr Metabisulfito de sodio.	18

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Interpretación de la prueba de sensibilidad o antibiograma	Error! Bookmark not defined.
Tabla 2. Codificación de las muestras adicionadas con Nisina.	11
Tabla 3. Antibiograma S.aureus-nisina cuadro comparativo.	12
Tabla 4. Antibiograma B.cereus-nisina cuadro comparativo	13
Tabla 5. Diluciones Seriadas S.aureus-0,125 gr Nisina.	15
Tabla 6. Diluciones Seriadas B. cereus-0.125gr Nisina.....	16
Tabla 7. Diluciones seriadas bacterias totales-0,125 gr nisina.	19
Tabla 8. Antibiograma S.aureus-metabisulfito sodio cuadro comparativo 1.....	Error! Bookmark not defined.
Tabla 9. Antibiograma S.aureus-metabisulfito sodio cuadro comparativo 2.....	Error! Bookmark not defined.
Tabla 10. Antibiograma B.cereus-metabisulfito cuadro comparativo 1.....	Error! Bookmark not defined.
Tabla 11. Antibiograma B.cereus-metabisulfito cuadro comparativo 2.....	Error! Bookmark not defined.
Tabla 12. Diluciones seriadas S.aureus-0,125 gr Metabisulfito de sodio.	17
Tabla 13. Diluciones seriadas B.cereus-0,125gr Metabisulfito de sodio.	18
Tabla 14. Codificación de las muestras adicionadas con Nisina.	20
Tabla 15. Resultados de los panelistas.	20

Jéssica Maritza Guamán Bautista

TRABAJO DE GRADUACIÓN

María Fernanda Rosales Medina

Enero, 2016

“Estudio comparativo entre la utilización de Nisina y Metabisulfito de sodio para la inhibición de microorganismos en crema pastelera”

1. INTRODUCCIÓN

Una amplia variedad de productos de panadería y pastelería se puede encontrar en los supermercados, incluyendo panes, pizzas, galletas y pasteles. De acuerdo con la Federación de Panaderos Americana, el mercado de la panadería produce alrededor de 5,3 mil millones de dólares anuales y es uno de los mercados más grandes de la industria alimentaria en el mundo.

El principal problema asociado a estos productos es la proliferación de hongos y levaduras, sin embargo, las bacterias también pueden afectar el producto y al consumidor especialmente en aquellos que contienen rellenos como la crema pastelera y otros productos similares. (Voysey, 2005).

Se reportó que alrededor del 5% de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en los Estados Unidos fueron causadas por productos de pastelería, principalmente aquellos rellenos de crema debido a la proliferación de *B. cereus*, *S. aureus*, entre otros. Se ha demostrado que este tipo de rellenos a base de leche, huevos, etc, son medios excelentes para el desarrollo de estas bacterias por los nutrientes existentes así como porque estos productos son mantenidos generalmente a temperatura ambiente y son de fácil manipuleo por empleados y clientes. (Stewart, Cole, & Schaffner, 2003)

Staphylococcus aureus, se caracteriza por ser gram positivo, inmóvil no formador de esporas, se agrupan en racimos. Varias especies de estafilococos, incluyendo ambas cepas coagulasa-negativos y coagulasa positivos, tienen la capacidad de producir enterotoxinas altamente estables al calor que causan gastroenteritis en humanos.

Se pueden encontrar en el aire, polvo, aguas residuales, agua, leche, alimentos y o en el equipo de alimentos, superficies ambientales, los seres humanos y los animales.

En la actualidad, casi la totalidad de intoxicaciones provocadas por *S. aureus* son atribuidas a manipuladores de alimentos que contaminan los productos durante la preparación y dan las

condiciones adecuadas para el desarrollo de esta bacteria y posterior producción de toxinas durante la etapa de almacenamiento. (FDA, 2012)

El hábitat primario de *S. aureus* son las mucosas y la piel de seres humanos, pudiéndose encontrar también en la región axilar y perineal. Este microorganismo puede existir de manera permanente o transitoria como miembro de la microflora normal sin causar síntomas en el huésped.

El óptimo desarrollo de *S. aureus* se logra a los 35 °C, pH cercano a la neutralidad y A_w de 0,98. Las condiciones que favorecen la producción de enterotoxinas se logran a temperaturas entre los 40 y 45 °C, pH 7-8 y A_w equivalente a 0,98. Son altamente tolerantes a las sales y azúcares. Con respecto a la dosis infectiva de la toxina, esta es inferior a 1,0 microgramos. Este nivel se alcanza cuando las poblaciones de *S. aureus* superan 100.000 microorganismos / g en los alimentos. En las personas altamente sensibles, la ingestión de 100 a 200 ng de enterotoxina puede causar síntomas. (Fueyo, 2005)

A la intoxicación por enterotoxina de *S. aureus*, se asocian síntomas que incluyen náuseas, vómitos, dolores abdominales y diarrea, efectos que se hacen notar entre 1 y 8 horas (preferentemente entre 2 a 4) de ocurrida la ingesta de alimentos contaminados. En casos severos, puede presentarse fuertes dolores de cabeza y escalofríos. La recuperación es rápida, por lo general, dentro de 48 horas.

Bacillus cereus es un bacilo Gram positivo móvil de aproximadamente 1.0 a 1.2 μm de ancho y de 3 a 5 μm de largo, esporoformador, aeróbio facultativo. Crece a temperaturas entre 5 °C a 50°C siendo la óptima entre 35 °C a 40 °C. Su resistencia de pH de 4.5 a 9.3. La producción de esporas en presencia de oxígeno es un rasgo que define el género, así como su morfología; éstas pueden estar dentro de la pared bacteriana o pueden deformar la pared. Las esporas son resistentes al calor y a la desecación, son inactivadas por métodos físicos como el calentamiento a 100 °C por 10 minutos.

Muy difundido en la naturaleza, se encuentra en el suelo, aire, polvo, pelo de los animales, agua dulce y en sedimentos de agua. La incidencia en productos alimenticios es muy amplia, aunque su frecuencia es mayor en productos como cremas, postres, productos cárnicos y vegetales crudos y cocidos, así como en leche y productos lácteos sometidos a procesos de pasterización (UHT). (Adams & Moss, 1995)

La acción patogénica de *B. cereus* está asociada con la producción de dos enterotoxinas diferentes; siendo estas la emética y la diarreica. La enterotoxina emética es estable a procesos térmicos de 126 °C durante 90 minutos; así mismo es resistente a la exposición de pH ácidos como básicos. El período de incubación es corto, de 1 a 5 horas tras la ingestión del alimento, presentándose náuseas, vómitos y malestar, siendo menos frecuente la aparición de diarrea y dolores abdominales. La duración de la enfermedad es de 6 a 24 horas. Los síntomas son similares a los que se presentan en la intoxicación causada por *Staphylococcus aureus*.

Los alimentos implicados son arroz, productos con almidón, papa, pasta, queso, mezclas de alimento como salsas, budines, sopas, productos para pastelería y ensalada.

La enterotoxina diarreica es termolábil, resiste a calentamientos de 45 °C por 30 minutos y también resiste a pH ácidos como básicos. (Anderson et al 1998, Ombui et al 1997). En la enfermedad diarreica, el período de incubación es de 8 a 16 horas consecutivas, después de haber ingerido el alimento contaminado, se presenta con dolor abdominal, calambres, diarrea acuosa y vómitos; raramente se observa fiebre. El enfermo se recupera completamente después de 12 a 24 horas. En otros casos como los grupos de riesgo en los que se incluyen ancianos, niños y pacientes inmunodeprimido, la incubación es más corta. Los alimentos implicados en todos los casos son carnes, leche, vegetales, pescado y cereales principalmente el arroz. (Anderson, Granum, & Ronner, 1998)

Con respecto a la dosis infectiva la presencia de un gran número de *B. cereus* (mayor de 10^6 organismos / g) en un alimento es indicativo de crecimiento activo y la proliferación del organismo y es consistente con un potencial peligro para la salud humana. El número de organismos más frecuentemente asociados con la enfermedad humana es de 10^5 a 10^8 ; sin embargo, la patogenicidad surge de toxina preformada. (FDA, 2012).

La industria de la panificación se ha basado tradicionalmente en conservantes químicos para la extensión de la vida útil de los productos tales como el Metabisulfito de sodio, sorbato de potasio, benzoatos, etc.)

Los Sulfitos son diversos compuestos que en solución acuosa ácida liberan ácido sulfuroso (H_2SO_4) y los iones sulfito (SO_3) y bisulfito (HSO_3).

El metabisulfito (E-223) es especialmente eficaz en medio ácido, inhibiendo bacterias y mohos, y en menor grado, levaduras. Además los sulfitos actúan como antioxidantes, inhibiendo especialmente las reacciones de oscurecimiento producidas por ciertas enzimas en vegetales y crustáceos. El Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios de la FAO/OMS (JECFA), indica que esta sustancia debe observar una Ingestión Diaria Aceptable (IDA) es de 0.7mg/kg de peso corporal en aplicaciones generales. El Comité ha encontrado evidencia de que su consumo en ocasiones sobrepasa las recomendaciones y puede resultar en un riesgo de salud.

Es un alérgeno que puede causar reacciones tales como opresión en el pecho, urticaria, retortijones, diarrea, disminución de la presión arterial, sensación de cabeza ligera, debilidad y aceleración del pulso. Los sulfitos también pueden desencadenar ataques de asma en asmáticos sensibles a éstos. A dosis elevadas produce olores y sabores desagradables que limitan su uso.

Durante el cocinado o procesado industrial de los alimentos el anhídrido sulfuroso y sulfitos se pierden en parte por evaporación o por combinación con otros componentes. (Coronel & Salamea, 2005)

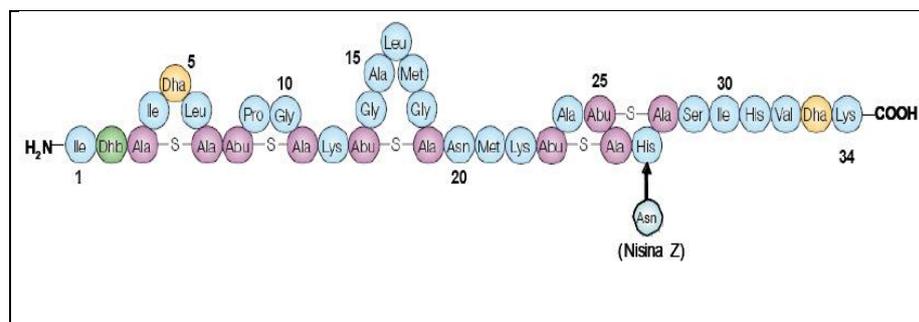
Actualmente la atención de las empresas se centra ahora en conservantes naturales, debido a que cada vez más los consumidores demandan por este tipo de productos. Uno de los conservantes más usados es nisina, (E 234 C143H230O37N42S7, pm 3354.25) que se obtiene de bacterias ácido lácticas (BAL).

Las primeras observaciones en BAL comenzaron en 1928, cuando se describió cómo ciertas cepas de *Lactococcus* empleadas en la fabricación de quesos producían un efecto inhibitor del crecimiento de otras BAL y potencialmente podían inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y nocivas para la conservación del queso. En 1933 se describió por primera vez esa sustancia de naturaleza peptídica con actividad antimicrobiana producida por cepas de la especie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, que posteriormente se denominó nisina.

La nisina es por tanto, la bacteriocina que tiene un historial más largo de uso seguro en alimentación y la que ha sido más estudiada.

En 1953 se comercializó por primera vez en Inglaterra, en 1969 se aprobó su uso en alimentación por la OMS (Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives) y en 1983 se incluyó en la lista de aditivos de la Comunidad Europea (U.E.) con el número E 234; poco después, en 1988, fue aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) norteamericana. Su actividad cubre un espectro amplio de bacterias Gram positivas, entre las que cabe destacar *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium* sp. Existen dos variantes de esta bacteriocina, la nisina A y nisina Z, que difieren únicamente en el aminoácido 27. (Garde, Avila, Medina, & Nuñez, 2005) (Ver Figura 1)

Figura 1. Estructura primaria de la Nisina. La flecha indica la sustitución del aminoácido que convierte la nisina A en la nisina Z.



Fuente: Medina, 2005.

La Nisina es un polipéptido, compuesto por 34 aminoácidos, y está producida por ciertas cepas de la bacteria *Lactococcus* (*Streptococcus*) *lacticas* ssp. Tiene un espectro de actividad reducido que afecta principalmente a células vegetativas y esporas de bacterias Gram

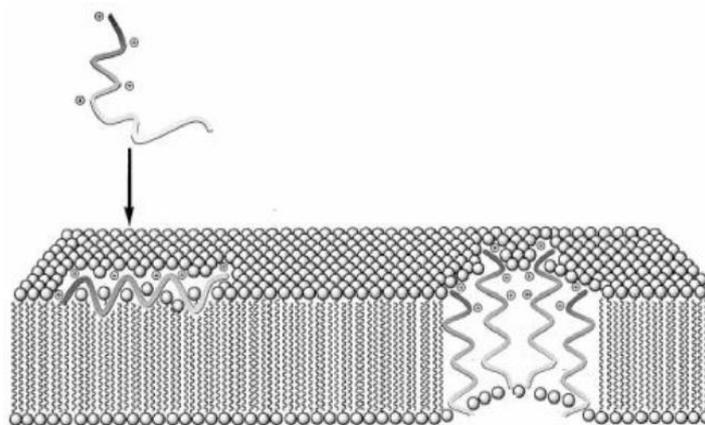
positivas. Las bacterias susceptibles a la nisina son otras bacterias ácido lácticas y los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria* y *Streptococcus*. En ausencia de otros métodos de conservación, la Nisina no inhibe las bacterias Gram negativas, ni las levaduras, ni los hongos. Hasta la fecha es la única bacteriocina que posee el estatus GRAS (Generally Recognized as Safe), usada en derivados lácteos, cárnicos y vegetales, lo que permite eliminar o reducir los nitratos en ellos y aplicar tratamientos térmicos moderados y de ahí mejorar en el valor nutricional, aroma, textura y aspecto, además de ahorrar energía

La nisina ingerida es inactivada por la tripsina y la pancreatina, y no tiene ningún efecto sobre la microflora digestiva. El valor de ingesta diaria admisible (IDA) de 0,13 mg de nisina/kg de peso corporal, previamente establecido por el Comité Científico de los Alimentos (SCF). (Ross, 2005).

El modo de acción de las bacteriocinas es complejo. La Nisina, y la Pediocina, son las bacteriocinas más estudiadas y comparten algunas características en común. Básicamente actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácido nucleico

Las bacterias Gram-positivas se caracterizan por poseer un alto contenido en lípidos aniónicos en su membrana. El modo de acción propuesto para las bacteriocinas es una unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga neta positiva localizada fundamentalmente en uno de sus extremos. Luego se produce la inserción de las bacteriocinas en la bicapa lipídica. Así se forman poros en la membrana bacteriana quedando permeabilizada y la célula empieza a perder iones y metabolitos fundamentales para su supervivencia y eventualmente se produce la muerte bacteriana. (De la Fuente Salcido, 2009)

Figura 2. Mecanismo acción de las bacteriocinas por formación de poros en la membrana bacteriana.



Fuente: (Moll, Konings, & Driessen, 1999)

De acuerdo a lo anteriormente revisado se declaran los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Realizar un estudio comparativo entre la Utilización de Nisina y Metabisulfito de sodio para la inhibición de microorganismos en crema pastelera.

Objetivos específicos:

- Determinar las dosis mínima inhibitoria de Nisina y Metabisulfito de sodio para *B. cereus*, y *E. aureus*.
- Realizar un contaje inicial y final de estos microorganismos en crema pastelera al aplicar estos agentes en las dosis determinadas.
- Evaluar las características organolépticas de la crema pastelera a la que se aplicó nisina como bioconservante, frente a crema pastelera con Metabisulfito de Sodio.
- Determinar la vida útil de la crema pastelera cuando se utiliza Nisina en comparación con Metabisulfito de Sodio.
- Comparar el costo del uso de Metabisulfito de sodio frente a Nisina al ser utilizados como conservantes en crema pastelera.

2. CAPITULO 1 : MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Localización de estudio

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay, localizado en las calles Hernán Malo y Avenida 24 de Mayo, perteneciente a la parroquia Huayna-Cápac.

1.2 Origen de las muestras

La crema pastelera se realizó en el laboratorio de Procesamiento de Alimentos de la Universidad del Azuay.

1.3. Recursos

1.3.1 Recursos humanos

Estudiante egresada de la Maestría en Gestión de Calidad y Seguridad Alimentaria de la Universidad del Azuay, con la tutoría de la Ing. María Fernanda Rosales.

1.3.2 Recursos institucionales

Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay.

1.3.3 Recursos materiales

Los recursos de Laboratorio para la elaboración de muestras y procesamiento de las mismas se detallan en el **Anexo 1**.

1.3.3.1 Microorganismos

Cepas puras de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, obtenidas del cepario del laboratorio de Microbiología de La Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad del Azuay. La reactivación se realizó sembrando cepas puras sobre agar nutritivo en cajas Petri e incubadas a 37°C por 24 horas.

1.3.4 Preparación de Muestra

Se realizó crema pastelera estandarizada que se detalla en el **Anexo2**, siguiendo el proceso del **Anexo 3** a la que se le agregó el aditivo correspondiente durante el proceso de elaboración.

1.4 Antibiograma

Se utilizó la prueba de sensibilidad o antibiograma que es un método in Vitro que determina la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos, bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas, mediante este método se puede determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) que es la menor concentración de una gama de diluciones de antimicrobiano que provoca una inhibición de cualquier crecimiento bacteriano visible.

Alrededor de cada agujero con antimicrobiano, las bacterias sensibles al mismo no habrán podido reproducirse y, por lo tanto no formaran colonias, dejando un espacio alrededor del agujero, a esto se lo denomina halo de inhibición al que se lo mide en milímetros para saber el efecto, el resultado se compara con la tabla de sensibilidad en la que se los clasifica en: resistente, intermedio o sensible, ver anexo 6. El tamaño aproximado de los agujeros es de 6 mm, diámetro que se debe tomar en cuenta al medir los halos, o en el caso de no tener halos de inhibición. (Pedrique de Aulacio, 2002).

Tabla 1. Interpretación de la prueba de sensibilidad o antibiograma

Diámetro de los halos de inhibición en mm.		
RESISTENTE	INTERMEDIO	SENSIBLE
< 10 mm	12-14 mm	= > 15 mm

1.4.1 Metodología utilizada con Nisina

De acuerdo a las disposiciones del Codex Alimentarius (anexo 4) la cantidad máxima permitida de nisina es 500 mg/kg, sin embargo al no existir una cantidad determinada para crema pastelera se utilizó 125 mg/kg, lo cual corresponde a 5000 UI/ml. (Aditivos Alimentarios permitidos para el consumo humano., 2012)

Se preparó una solución stock de Nisina a una concentración de 5000UI/ml, disolviendo 0,125gr; 0,1 gr; 0,05 gr; 0,025 gr de Nisina comercial al 2,5% en 100 ml de HCL 0,05 M. La solución obtenida se ajustó su pH a 4,9 con NaOH 5 N, se esterilizó la solución madre de Nisina en el autoclave a 121°C por cinco minutos, esta fue mantenida en refrigeración a 4°C por 24 horas antes de su uso. Se reservó.

1.4.2 Metodología utilizada con Metabisulfito

De acuerdo a las disposiciones del Codex Alimentarius (anexo 5) la cantidad máxima de metabisulfito es 1000 mg/kg, sin embargo al no existir una cantidad determinada para crema pastelera se utilizaron diferentes cantidades con el fin de encontrar la dosis efectiva.

Las primeras pruebas se realizaron con 0,0125 gr; 0,025 gr; 0,05gr; las segundas pruebas fueron dosis de 0,150 gr; 0,20 gr; 0,25 gr de Metabisulfito de sodio disuelto en 10 ml de agua peptonada esterilizada. Se reservó.

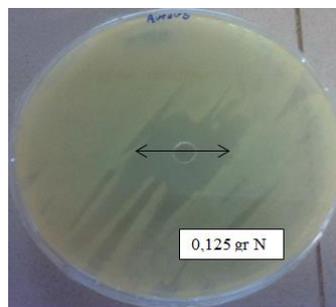
Procedimiento Antibiograma:

- 1.- Se tomó *B.Cereus* y *S. Aureus* con un isopo y se lo disolvió en agua salina al que se comparó con el stand McFarland 2. Ver figura 3.
- 2.-La solución de la bacteria se sembró en agar Mueller Hinton que previamente tenía orificios a los que se agregaron la solución del aditivo (10ul) con las diferentes concentraciones que estaban reservadas.
- 3.- Se llevó a la incubadora por 24 horas. (ver anexo 7, Nisina imágenes 1 a 4 y Metabisulfito imágenes 5 a 8)

Figura 3. Stand McFarland 2.



Figura 4. Antibiograma



S. aureus-nisina en dosis: 0,125 gr.

1.4.3. Diluciones Seriadas

Se elaboró 100 gr crema pastelera (ver anexo 3), con 3 ml de la solución madre de Nisina con la dosis de 0,125 mg, la misma que fue escogida por el mayor grado de inhibición de microorganismos, reservamos.

De igual manera se procedió con el Metabisulfito de Sodio pero en este caso a la crema se le agregó 0,250 mg del aditivo por ser la dosis más alta, reservamos.

Procedimiento:

- 1.- Se tomó 10 gr de esta muestra reservada a la que se la procedió a inocular con 100 ul de la solución de *S. aureus* y de la misma forma se realizó con el *B. cereus*, las cepas de las bacterias previamente se diluyeron en 10 ml de agua salina estéril y se compararon con el standard de McFarland 2.

2.- Se puso la crema contaminada en 90 ml de agua peptonada y se agitó en el mezclador Stomacher.

3.- El conteo en placas se realizó pasando un día, se tomó 1000 ul de la preparación anterior y se agregó en 1 tubo de ensayo que contenían 9 ml de solución salina y se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-5} . Luego se sembró en agar Mueller Hinton. Se incubó por 24 horas a 37° C. (Ver anexo 7, Nisina imágenes 9 a 20 y Metabisulfito imágenes 21 a 26).

Figura 5. Diluciones Seriadas



1.4.4. Diluciones Seriadas de Bacterias Totales

Se elaboró 100 gr crema pastelera (ver anexo 3) con 3 ml de la solución madre de Nisina con la dosis de 0,125 mg, la misma que fue escogida por el mayor grado de inhibición de microorganismos como se mencionó anteriormente.

Se tomó 10 gr de la muestra (en este caso no se inoculó bacterias), se puso en 90 ml de agua peptonada y se agitó en el mezclador Stomacher. Se realizaron pruebas seriadas pasando 1 día, se tomó 1000ul de la preparación anterior y se agregó en 4 tubos de ensayo que contenían 9 ml de agua salina de 10^{-1} a 10^{-5} . Luego se sembró en agar nutritivo. Se incubó por 24 horas a 37° C. (Ver Figura 5).

No se elaboró diluciones seriadas de Bacterias Totales con Metabisulfito de Sodio por no conseguir resultados positivos con *S.aureus* y *B.cereus*.

1.5 Manejo Estadístico de los Datos

Los datos obtenidos se organizaron en tablas diseñadas para el ingreso de la información proveniente de cada muestra y de los resultados de laboratorio, de esta manera se facilitó el análisis de los resultados correspondientes.

1.6 Pruebas Organolépticas

Una vez definidas las dosis efectivas inhibitorias se realizaron pruebas organolépticas con un panel semientrenado al que se aplicó el principio de la prueba triangular que consiste en presentar a los panelistas simultáneamente tres muestras codificadas, de las cuales dos son iguales y una diferente. El panelista debe identificar la muestra diferente, estas se deben presentar a cada panelista en diferente orden, los mismos que deben marcar las respuestas en una ficha. (Ver anexo 8).

Posterior al llenado de las fichas de evaluación sensorial, se cuentan el número de respuestas acertadas y el número de panelistas, con esta información se ubicó en el cuadro de diferencia significativa (ver anexo 9) con el fin de obtener el porcentaje de confiabilidad de las respuestas. (Anzaldúa Morales, 2005).

Tabla 2. Codificación de las muestras adicionadas con Nisina.

Muestras iguales	Muestra Diferente
445	518
127	

3. CAPÍTULO 2: RESULTADOS

Prueba de sensibilidad o antibiograma

2.1 Antibiograma con Nisina

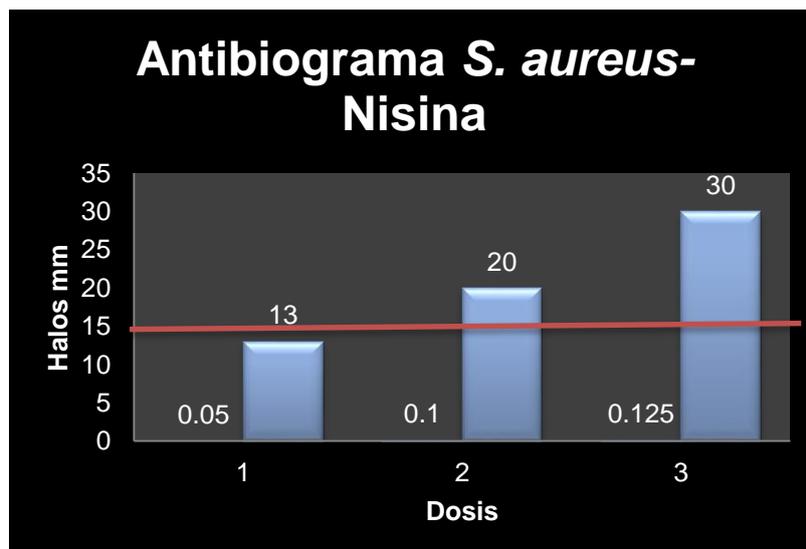
En la tabla 3 y en la figura 6 se observan los resultados del antibiograma *S.aureus*-nisina (ver anexo 7) los mismos que al comparar con el cuadro de interpretación de sensibilidad se puede determinar que las dosis de 0,1 gr y 0,125 gr se las puede considerar como sensibles porque los halos inhibitorios en ambos casos sobrepasan los 15 mm de diámetro.

Tabla 3. Antibiograma *S.aureus*-nisina cuadro comparativo.

S. AUREUS			
DOSIS DE NISINA	0,05 gr	0,1 gr	0,125 gr
mm HALOS	13 mm	20 mm	30 mm

Fuente: Primaria, registro de laboratorio.

Figura 6. Antibiograma *S.aureus*-nisina cuadro comparativo.



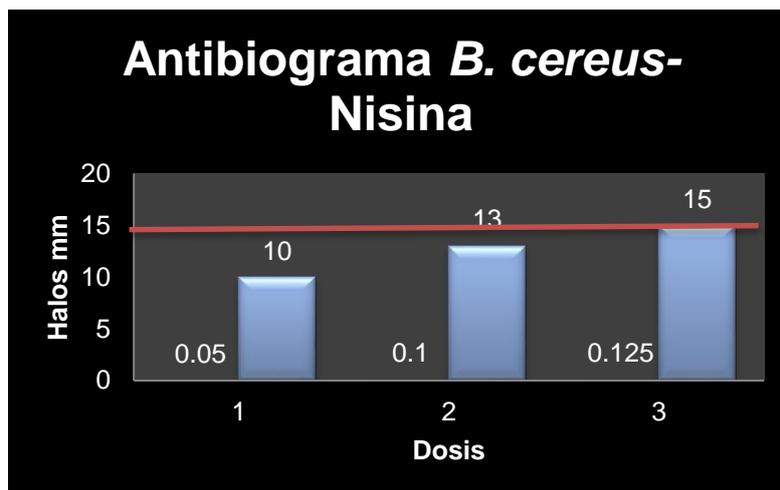
En la tabla 4 y en la figura 7 se observan los resultados del antibiograma *B.cereus*-nisina (ver anexo 7) los mismos que al comparar con el cuadro de interpretación de sensibilidad se puede determinar que solo la dosis de 0,125 gr se la puede considerar como sensible ya que el halo inhibitorio está dentro del rango de los 15 mm.

Tabla 4. Antibiograma *B.cereus*-nisina cuadro comparativo

<i>B. CEREUS</i>			
DOSIS DE NISINA	0,05gr	0,1 gr	0,125 gr
mm HALOS	10 mm	13 mm	15 mm

Fuente: primaria, registro de laboratorio.

Figura 7. Antibiograma *B.cereus*-nisina.



2.2 Antibiograma con Metabisulfito

En las tablas 5 y 6 se observan los resultados del antibiograma *S. aureus*-metabisulfito de sodio (ver anexo 7) los mismos que al comparar con el cuadro de interpretación de sensibilidad se pudo determinar que ninguna de las dosis se las puede considerar como sensibles ya que en ninguno de los casos se obtuvo halo inhibitorio.

Tabla 5. Antibiograma *S.aureus*-metabisulfito sodio cuadro comparativo 1.

<i>S .aureus</i>			
DOSIS DE NISINA	0,0125 gr	0,05 gr	0,025 gr
mm HALOS	6 mm	6 mm	6 mm

Tabla 6. Antibiograma *S.aureus*-metabisulfito sodio cuadro comparativo 2.

<i>S. aureus</i>			
DOSIS DE NISINA	0,15 gr	0,20 gr	0,25 gr
mm HALOS	6 mm	6 mm	6 mm

Fuente: Primaria, registro de laboratorio

En las tablas 7 y 8 se observan los resultados del antibiograma *B. cereus*-metabisulfito de sodio (anexo) los mismos que al comparar con el cuadro de interpretación de sensibilidad se puede determinar ninguna de las dosis se las puede considerar como sensibles ya que en ninguno de los casos se obtuvo halo inhibitorio.

Tabla 7.Antibiograma *B.cereus*-metabisulfito cuadro comparativo 1.

<i>B. cereus</i>			
DOSIS DE NISINA	0,0125 gr	0,05 gr	0,025 gr
mm HALOS	6 mm	6 mm	6 mm

Tabla 8. Antibiograma *B.cereus*-metabisulfito cuadro comparativo 2.

<i>B.cereus</i>			
DOSIS DE NISINA	0,15 gr	0,20 gr	0,25 gr
mm HALOS	6 mm	6 mm	6 mm

Fuente: Primaria, registro de laboratorio

2.3 Diluciones Seriadas con Nisina

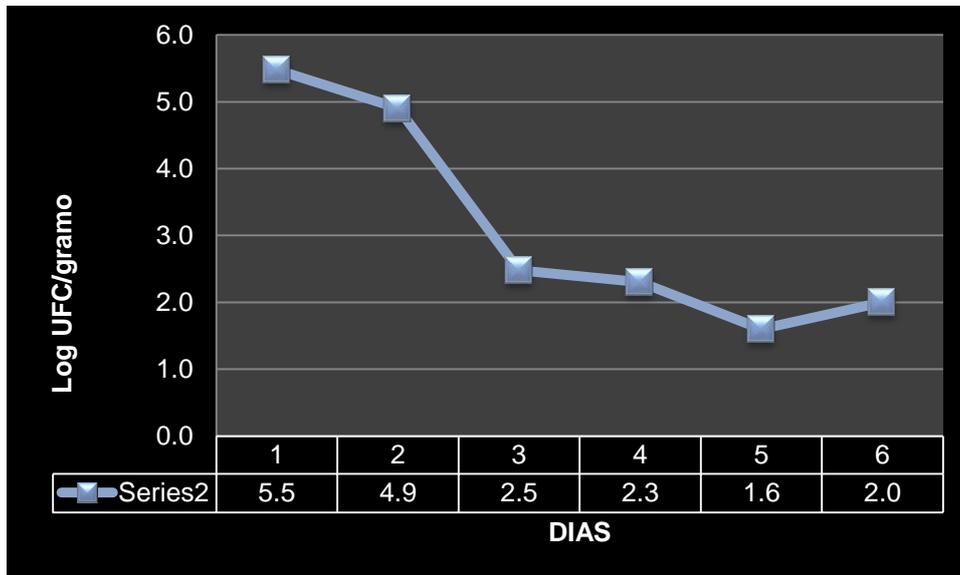
En la Tabla 9 y en la figura 8 se observan los resultados del contaje de placa de Nisina contra *S. aureus*. (ver anexo 7). Se puede evidenciar la disminución de 3 logs.

Tabla 9. Diluciones Seriadas *S.aureus*-0,125 gr Nisina.

<i>S. aureus</i>	
Día	UFC
0	300.000
2	80.000
4	300
6	200
8	40
10	100

Fuente: primaria, registro de laboratorio.

Figura 8. Diluciones Seriadas *S.aureus*-1,125 gr Nisina.

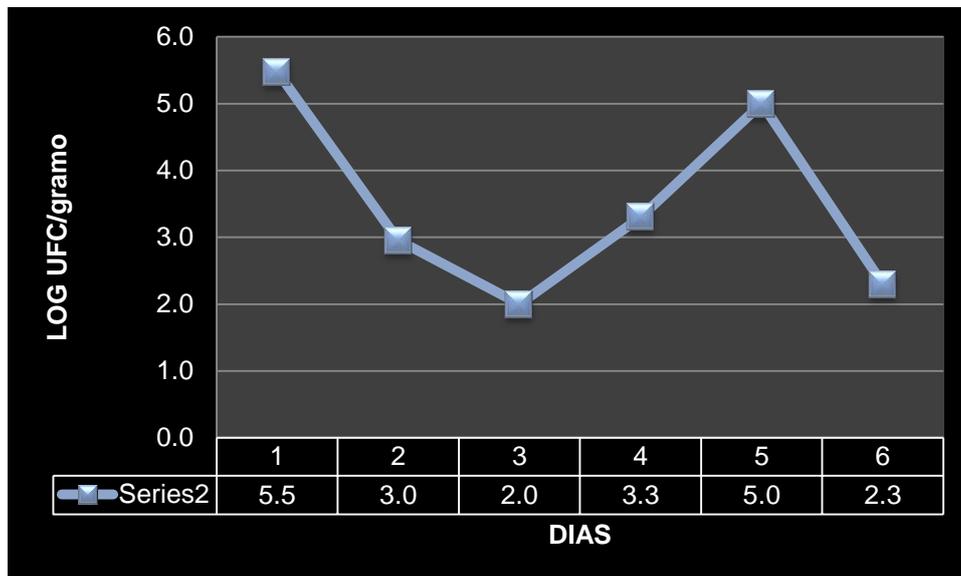


En la tabla 10 y en la figura 9 se observan los resultados del contejo de placa de Nisina contra *B. cereus*. (ver anexo 7 imágenes). Se puede evidenciar la disminución de 3 logs.

Tabla 10. Diluciones Seriadas *B. cereus*-0.125gr Nisina.

<i>B. Cereus</i>	
Día	UFC
0	300.000
2	900
4	100
6	2000
8	100.000
10	200

Figura 9. Diluciones seriadas *B.cereus*-0,125 gr Nisina.



2.4 Diluciones Seriadas con Metabisulfito de Sodio

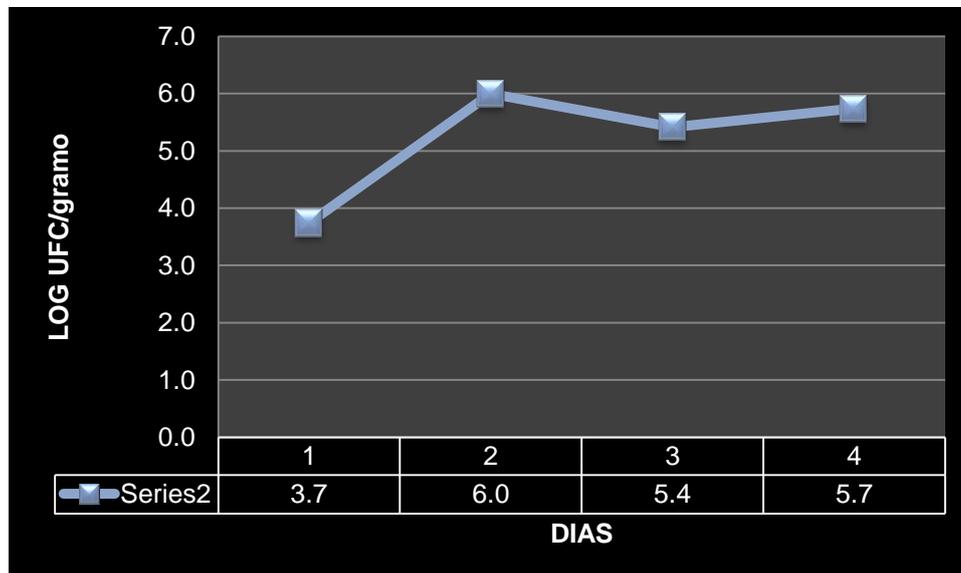
En la Tabla 11 y en la figura 10 se observan los resultados del contaje en placa de metabisulfito de sodio contra *S. aureus* (ver anexo 7). Se puede evidenciar el aumento de 2 logs.

Tabla 11. Diluciones seriadas *S.aureus*-0,125 gr Metabisulfito de sodio.

<i>S. aureus</i>	
Día	UFC
0	5.500
2	1000.000
4	260.000
6	55.0000

Fuente: primaria, registro de laboratorio.

Figura 10. Diluciones seriadas *S.aureus*-0,125 gr Metabisulfito de sodio.



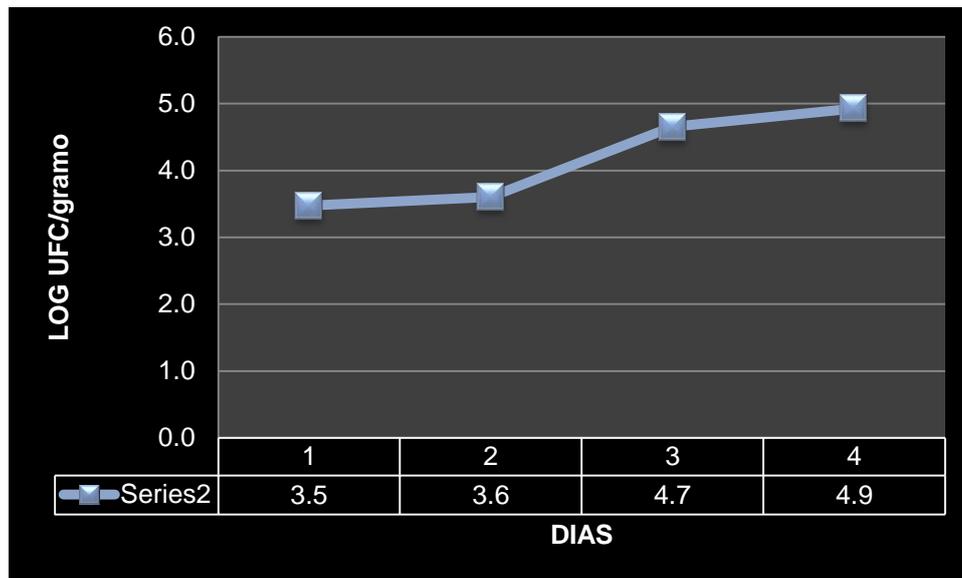
En la Tabla 12 y en la figura 11 se observan los resultados del contaje en placa de metabisulfito de sodio contra *B. cereus*. (ver anexo 7). Se puede evidenciar el aumento de 1 log.

Tabla 12. Diluciones seriadas *B.cereus*-0,125gr Metabisulfito de sodio.

<i>B. cereus</i>	
Día	UFC
0	3000
2	4000
4	45000
6	85000

Fuente: primaria, registro de laboratorio.

Figura 11. Diluciones seriadas *B.cereus*-0,125 gr Metabisulfito de sodio.



2.5 Diluciones Seriadas Bacterias Totales con Nisina

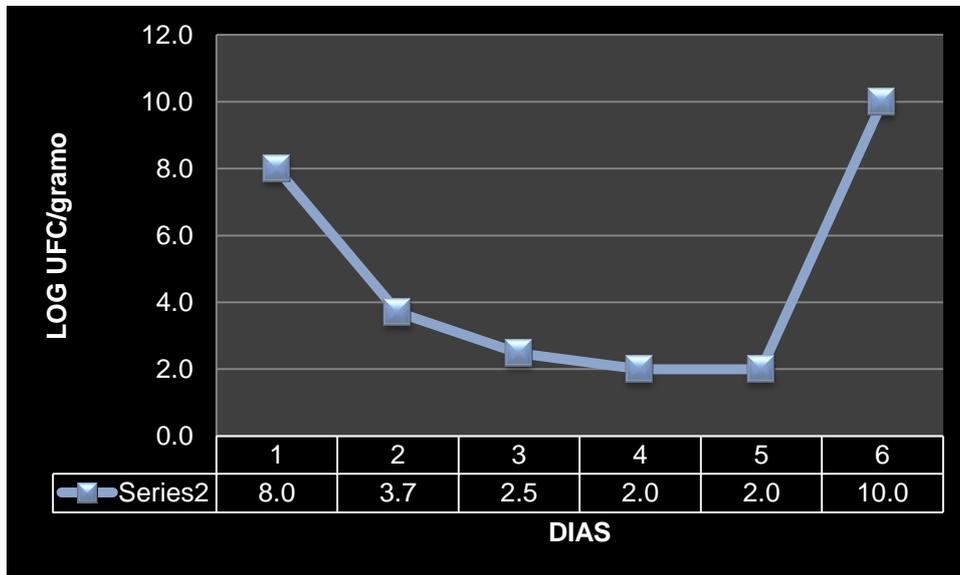
En la tabla 13 y en la figura12 se observan los resultados del contaje de placa de Nisina contra bacterias totales (ver anexo 7). Se puede evidenciar la disminución de 3 logs hasta el octavo día y en el día décimo un aumento descontrolado de logs.

Tabla 13. Diluciones seriadas bacterias totales-0,125 gr nisina.

Bacterias Totales	
Día	UFC
0	100000000
2	5000
4	300
6	100
8	100
10	incontable

Fuente: primaria, registro de laboratorio.

Figura 12. Diluciones seriada bacterias totales-0,125gr nisina.



2.6 Pruebas Organolépticas.

Con la aplicación de la prueba triangular se busca establecer si los panelistas semientrenados encuentran diferencias sensoriales en la crema pastelera a la que se adicionó Nisina en la dosis efectiva de 0,125 gr versus la crema pastelera sin el aditivo, por lo que como se indicó anteriormente se presentó a los panelistas simultáneamente tres muestras codificadas, de las cuales dos fueron iguales (sin Nisina) y una diferente (con Nisina). Los panelistas identificaron la muestra diferente y marcaron la respuesta en una ficha como se muestra en el anexo 8. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 14. Codificación de las muestras adicionadas con Nisina.

Muestras iguales	Muestra Diferente
445	518
127	

Tabla 15. Resultados de los panelistas.

N. de Panelistas	Muestra 445	Muestra 127	Muestra 518
16	2	4	10

Observaciones de los jueces:

La mayoría de los jueces concordó en que la crema pastelera de la muestra 518 que tenía Nisina a simple vista era la diferente porque presentaba diferente textura siendo más densa, pero en cuanto a sabor no hubo diferencia.

Prueba triangular:

- Número de jueces: 16
- Número de respuestas acertadas: 10

Posterior al llenado de las fichas de evaluación se cuentan las respuestas. El total de participantes fue de 16 y las respuestas correctas fueron 10, se comparó con la tabla de diferencia significativa (anexo 9) y se obtuvo un nivel de significancia del 5%, lo que indica que existe un 95% de confiabilidad en las respuestas. Se puede concluir que la diferencia en cuanto a sabor es casi imperceptible. (Anzaldúa Morales, 2005).

4. CAPÍTULO 3: DISCUSIÓN

Se analizaron investigaciones acerca de Nisina como bioconservante pero no hubo metodologías claras acerca de la forma de uso, por lo que en las primeras pruebas se agregó directamente a la crema pastelera sin obtener resultados positivos para inhibir microorganismos. Probablemente en esos trabajos se hayan utilizado nisina pura, sin embargo para el desarrollo de esta investigación se usó Nisina al 2,5%.

Solo en dos estudios se detalla la metodología utilizada para el uso correcto de Nisina al 2,5%, uno de ellos se realizó en Venezuela en el 2007, en este se menciona que se hizo una solución stock de Nisina para su uso. Se evidenció que a través de este método se obtuvieron resultados positivos como antimicrobiano en crema pastelera. (Maldonado & Llanca, 2007).

En cuanto al uso de Metabisulfito existen investigaciones como agente blanqueador para productos como camarones y vino pero no hay estudios profundos del mismo usado como inhibidor de microorganismos.

Se realizó revisión bibliográfica de normativas acerca de crema pastelera para el uso de los dos aditivos, sin resultados positivos por lo que se utilizó regulaciones para alimentos con características similares como las natillas o flanes.

Al revisar diferentes estudios se pudo determinar que los microorganismos más comunes en crema pastelera son el *S.aureus* y *B.cereus*, encontrando muchos casos de brotes alimentarios en los que estuvieron involucrados estos microorganismos.

Entre el 30 y el 40 % de las personas sanas son portadoras de *S. aureus*, siendo la causa principal de toxiinfección alimentaria en alimentos cocinados. Los Alimentos implicados con frecuencia en brotes de esta naturaleza son los ovoproductos, como natillas, productos de pastelería rellenos de crema. (Iaria, 1981)

En México, según un estudio del Laboratorio Nacional de Salud Pública, entre 1980 y 1989, el 45% de los brotes confirmó al *S. aureus* como agente causal, ocasionando 792 casos y 5 defunciones. (E Alimentación, 2011)

En Sao Paulo se realizó una investigación para la que se recolectó 100 muestras en panaderías y pastelerías las que dieron como resultado que el 38,0% era positivo para *S. aureus* y 7,0% contenía cepas productoras de enterotoxina B, C o D.

En el mundo entero, entre los años 1950 y 1976 se informaron 230 brotes de intoxicaciones alimentarias producidas por *B. cereus*. Entre los años 1960 y 1968 *B. cereus* fue la tercera causa de intoxicación alimentaria en Hungría, con 117 brotes. Otros países fueron: Finlandia con 50 brotes, Holanda con 11 y Canadá con 9. Una amplia variedad de alimentos que incluyen

sopas de vegetales, carne de pollo, vegetales, carne de vacuno, pastas, leche y helados estuvieron implicados.

La cantidad máxima permitida de Nisina según el Codex alimentarius es de 500 mg/kg (0,5 gr/Kg), sin embargo no existe una cantidad establecida para crema pastelera (ver anexo 4). Por lo que se realizaron pruebas de sensibilidad o antibiogramas en tres dosis diferentes.

Por los resultados obtenidos del antibiograma de *S. aureus*-Nisina se puede definir que los halos de las dosis de 0,1 gr (20 mm) y 0,125 gr (30 mm), están dentro del rango de sensibilidad para Nisina.

En el caso de *B. cereus*-Nisina solo la dosis de 0,125 gr (15mm) es la única que está dentro del límite de sensibilidad (\Rightarrow 15 mm) por lo que se usó esta dosis y se clasificó como sensible a la Nisina.

Se pudo determinar que la dosis más alta 0,125 gr de Nisina fue la más efectiva contra las dos bacterias, siendo más eficaz contra *S. aureus* ya que se puede evidenciar un halo de 30 mm de diámetro frente a *B. cereus* que dio como resultado un halo de 15 mm de diámetro. Al comparar con la tabla de sensibilidad se pudo determinar que ambas dosis son sensibles a la Nisina porque se encuentran por encima del rango de \Rightarrow 15 mm de diámetro.

En cuanto al metabisulfito de Sodio según el anexo 5. La cantidad máxima es de 1000 mg/kg, o 0,1gr/Kg sin embargo al no existir una cantidad determinada para crema pastelera se utilizó diferentes cantidades con el fin de encontrar la dosis efectiva. (Aditivos Alimentarios permitidos para el consumo humano., 2012). Se preparó muestras 100 gr de crema pastelera en las que el máximo permitido según la normativa es 0,1 gr pero a pesar de que se realizaron dosis que sobrepasaron lo establecido (0,15-0,20 y 0,25 gr) no hubo halos de inhibición con ninguna de las dos bacterias.

En las Diluciones Seriadas *S. Aureus*-Nisina (tabla 9) se observó desde el día uno al día seis hubo una disminución de 3 logs por lo que se asume su efectividad, a la vez cumple con los requisitos microbiológicos para este tipo de alimentos que es de 10^1 - 10^2 UFC/g. (MINS/DIGESA, 1999).

En el caso de *B.cereus*-Nisina (ver tabla 10) se evidencia un contaje inicial en el día 0 de 5 logs, entre los días 2 y 4 redujo 3 logs, posiblemente durante los primeros días la Nisina actuó sobre la bacteria que estuvo en estado vegetativo al ser un esporulado, pero al sexto día repunta nuevamente a 3 logs, y en el octavo día sube a 5 logs probablemente la bacteria encontró un ambiente ideal por lo que se activó y germinó, lo que produjo un repunte finalmente reduce durante los días posteriores a 2 logs; la Nisina es una bacteriocina que actúa sobre la membrana celular produciendo un poro con la correspondiente salida del material celular al estar el *B.cereus* nuevamente en forma vegetativa la Nisina volvió actuar y

por lo tanto controló el crecimiento bacteriano esto se evidencia en los siguientes días 8 y 10. (Adams & Moss, 1995)

La carga microbiana permitida para *B. Cereus* en este tipo de alimentos es de 10^2 - 10^3 UFC/ g cumpliendo a cabalidad con este requerimiento por lo que se asume la eficacia de Nisina contra *B.cereus*. (MINS/DIGESA, 1999).

En las diluciones seriadas a pesar de que se utilizó la dosis más alta de metabisulfito (0,25 gr) los resultados fueron los siguientes:

S. aureus- Metabisulfito de sodio desde el día uno al dos hubo un aumento de 3 logs, en el día tres hubo una disminución de 1 log.

B. cereus- Metabisulfito de sodio desde el día uno al día tres hubo un aumento de 1 log. (ver tabla 12).

Se determina que metabisulfito de sodio es ineficaz para las dos bacterias, porque para *B.cereus* hubo un aumento de 1 log y en el caso de *S. aureus* el aumento fue de 2 logs.

Por estas razones no se realizaron pruebas de inhibición de metabisulfito de sodio contra bacterias totales y tampoco las pruebas organolépticas.

En el resultado de las diluciones seriadas de Nisina contra bacterias totales se determinó que desde el día uno al día cinco hubo una considerable disminución de 6 logs pero en el día seis hubo un aumento desmedido del conteo en placa, por lo que se puede establecer que la nisina hizo que se controle el crecimiento bacterianos hasta por diez días (las diluciones se realizaron pasando un día) a temperatura de refrigeración por lo que la crema pastelera aumenta su tiempo de vida útil. Hay que recalcar que en la mayoría de panaderías y pastelerías los productos que tiene como relleno crema pastelera se mantienen a temperatura ambiente hasta por 4 días, este es el caso de los conitos y de los relámpagos a los que no se suele refrigerar por que la masa a la que se rellena se endurece.

Con el fin de investigar si la dosis efectiva de Nisina afecta las características organolépticas de la crema pastelera se realizaron pruebas sensoriales con un panel semientrenado al que se aplicó el Principio de la prueba triangular, del cual se obtuvo como resultado que la adición de la dosis de 0,125 gr de Nisina es imperceptible al paladar sin embargo afecta ligeramente la consistencia de la crema pastelera porque la hizo más espesa de lo normal.

5. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en la presente investigación: "Estudio comparativo entre la utilización de Nisina y Metabisulfito de sodio para la inhibición de microorganismos en crema pastelera" es posible plantear las siguientes conclusiones:

- Se estableció la dosis de 125 mg/Kg de Nisina por Kilo de crema pastelera, con la que se redujo la carga microbiana de bacterias totales en 6 logs.
- La adición de Nisina hizo que el producto se conserve hasta por diez días a temperatura de refrigeración desde su elaboración. El doble de tiempo de la crema sin la adición de ningún aditivo.
- La dosis de Nisina establecida no comprometió cambios en cuanto a sabor y a la vez no existieron cambios significativos en las características físicas de la crema pastelera.
- Para adicionar Nisina al 2,5% a un producto se la debe hacer mediante la elaboración de una solución madre elaborada con HCL 0,05 M a la que se adiciona las concentraciones del aditivo, se ajusta el ph a 4.9 y se la esteriliza a 121°C por 5 minutos.
- El metabisulfito de Sodio no tuvo resultados positivos como antimicrobiano a pesar que se utilizaron dosis que sobre pasaron el doble de lo establecido por el CODEX ALIMENTARIUS.
- En cuanto a costos la Nisina es económica tomando en cuenta que las dosis que se usan son bajas, sin embargo es más cara que el metabisulfito de sodio.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- E. Alimentación. (22 de Noviembre de 2011). Recuperado el 12 de Enero de 2016, de <http://www.alimentacion.enfasis.com>
- Aditivos Alimentarios permitidos para el consumo humano. (2012). *NORMA INEN 2074*, 150.
- Adams, M., & Moss, M. (1995). *Microbiología de los Alimentos*. Zaragoza: Acribia S.A.
- Anderson, A., Granum, P., & Ronner, U. (1998). The adherence of *Bacillus cereus* spores to epithelial cell might be an additional virulence mechanism. *JFoods Microbiologic*.
- Anzaldúa Morales, A. (2005). *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica*. Zaragoza: ACRIBIA S.A.
- Coronel, A., & Salamea, M. (2005). Determinación de conservantes en bebidas y embutidos consumidos en la ciudad de Cuenca. Cuenca.
- De la Fuente Salcido, N. (Septiembre de 2009). *BIOSINTESIS Y ACTIVIDAD DE BACTERIOCINAS PRODUCIDAS*. Nuevo León, México.
- Duce, J., Bordenave, S., & Ybarra, L. (2012). Investigación sobre la presencia de *Bacillus cereus* en Yerba Mate elaborada. *Ciencia y tecnología (on line)*, 17.
- FDA. (2012). *Bad Bug Book*.
- Fueyo, J. M. (2005). Frecuencia y tipos de toxinas superantígenos en *Staphylococcus aureus* de diferentes orígenes: relaciones con tipos genéricos. *Tesis Doctoral*. Oviedo.
- Garde, S., Avila, M., Medina, M., & Nuñez, M. (2005). Influence of a bacteriocina producing lactic culture on the volatile compounds, odour and aroma of hispanic cheese. *Intern Dairy*.
- Iaria, S. (1981). *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico em doces cremosos vendidos em padarias e confeitarias do município de São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Pública [online]*, 321-337.
- Maldonado, R., & Llanca, L. (2007). Efecto de la incorporación de nisina sobre la supervivencia del *Staphylococcus aureus* en queso de mano. *Rev. Fac. Agron.*, 147-163.
- Maurer, A., & Luck, T. (16 de Febrero de 2003). *Patente nº ES 2 181 046 T3*. Madrid.
- MINSA/DIGESA. (1999). Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano.
- Moll, G., Konings, W., & Driessen, A. (1999). Bacteriocins: mechanism of membrane. *Antonie Van Leeuwenhoek*.
- Pedrique de Aulacio, M. (Febrero de 2002). Recuperado el 11 de 01 de 2016, de <http://www.ucv.ve>
- Ross, R. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Naturals reviews Microbiol*, 777-778.
- Stewart, C. M., Cole, M. B., & Schaffner, D. W. (2003). Managing the risk of staphylococcal food poisoning from cream-filled baked goods to meet a food safety objective. *J Food Prot*, págs. 1310-25.

Voysey, P. (2005). microbial update Bakery products. *Food Research Association, UK. revista international food hygiene.*

7. ANEXOS

ANEXO 1

RECURSOS MATERIALES

1. Equipos

EQUIPO	MARCA
Estufa bacteriológica	WTB BINDER
Tuttnauer autoclave-steam sterilizer	TUTTNAUER
Cabina de flujo laminar	ESCO
Destilador de agua	FANEM
Balanza analítica	OHAUS
Peachímetro	
Refrigeradora	INDURAMA

2. Reactivos

REACTIVO	MARCA
Agar nutritivo	MERCK
Agar Mueller Hinton	MERCK
Nisina A 2,5%	Lactocomerce
Metabisulfito de sodio	Oxoid®
Agua de peptona	ACUMEDIA
Cloruro de Sodio	MALLINCKROD T
Acido Clorhídrico	
Agua destilada estéril	
Hidróxido de sodio	

3. Materiales varios

MATERIAL	MARCA
Cajas petri descartables 90 mm x 15 mm	PROQUIMICA
Frascos de 250 y 500 mL	SCHOTT DURAN
Probeta de 500 mL	SUPERIOR
Pipetas automáticas de 10 μ L – 100 μ L y 100 – 1.000 μ L	LABMATE SOFT
Lámpara de alcohol	
Recipientes estériles	
Material de limpieza	
Hisopos estériles	F.L MEDICAL
Puntas de pipetas	
Tubos de ensayo	

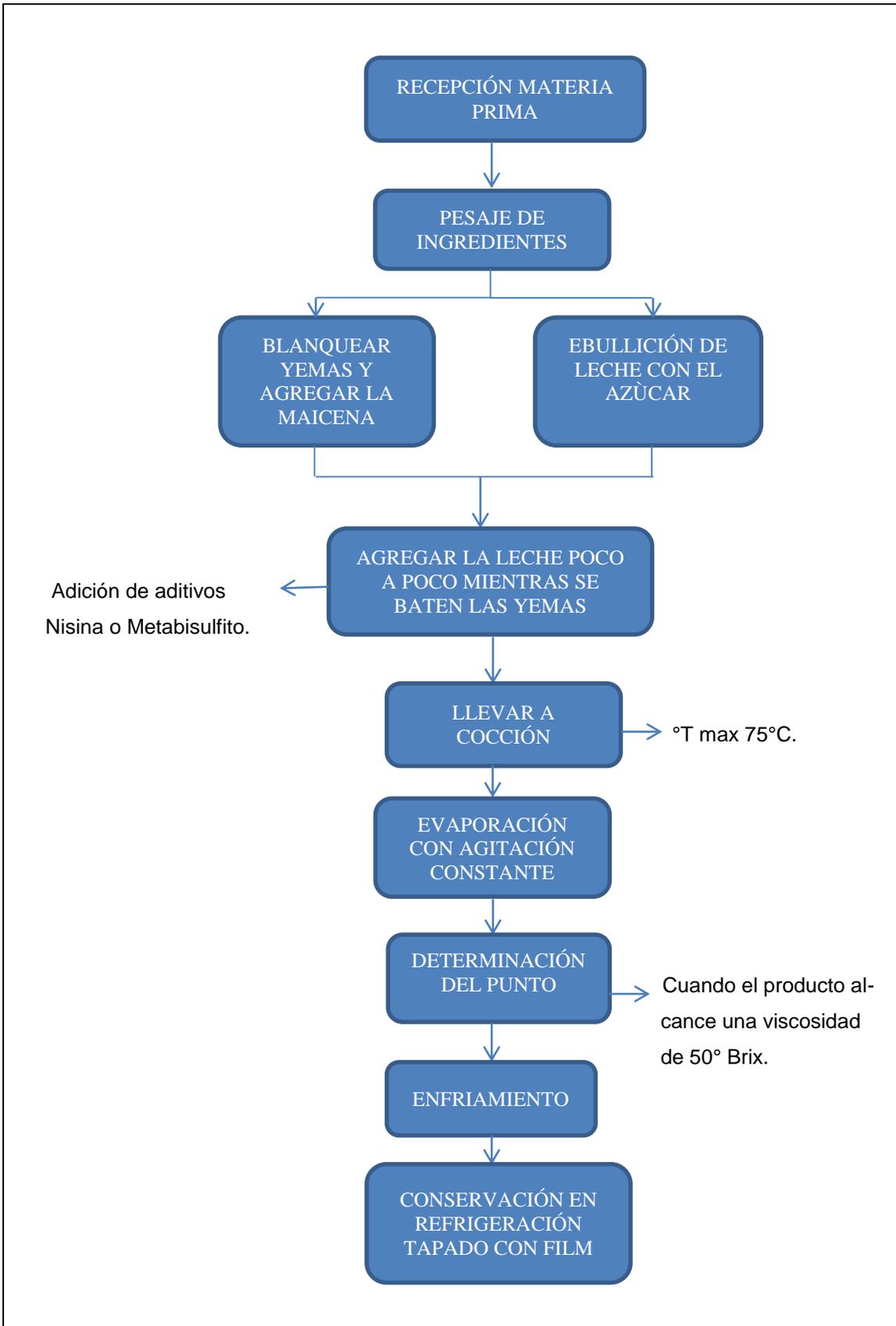
ANEXO 2

FICHA TÉCNICA DE PRODUCTO TERMINADO	
NOMBRE DEL PRODUCTO	Crema Pastelera
DESCRIPCION DEL PRODUCTO	Es un producto alimenticio elaborado a partir de leche, yemas, azúcar, y almidón de maíz que se lleva a fuego moderado por lo que resulta un producto espeso. Es una crema básica de pastelería que se puede usar como relleno de diferentes postres.
COMPOSICIÓN NUTRICIONAL	Energía total: 661 kJ o 157 kcal. Grasa, total (lipidos totales): 5.37 g. Proteina, total: 4.9 g. Agua (humedad): 66.1 g. Carbohidratos: 22.3 g. Fibra, dietetica total: 0.3 g. Almidón, total: 4.8 g. Azucares, totales: 17.5 g. Calcio: 108 mg.
CARACTERÍSTICAS ORGANOLEPTICAS	Color: crema Textura: Espesa acuosa Sabor: dulce Aroma: agradable 
NORMA	No existe normativa para crema pastelera, por lo que se aplico la norma para elaboración NTE INEN 0700 Manjar o dulce de leche.

CONSERVACIÓN Y VIDA UTIL	3 días aproximadamente, a 5°C lo que se debe al hecho que este producto es solo pasteurizado pero no esterilizado.
FORMULACION	<ul style="list-style-type: none">• 500 ml de leche• 125 g de azúcar• 40 g de fécula de maíz (Maizena)• 4 yemas de huevo
PH	6,5 - 7,0

ANEXO 3

DIAGRAMA DE FLUJO DE ELABORACIÓN DE CREMA PASTELERA



ANEXO 4

Disposiciones del Codex Alimentarius sobre uso de Nisina.

Cat. de alimentos N.º	Categoría de alimentos	Dosis máxima	Medida solicitada	Razón
01.1	Leche y bebidas lácteas	500 mg/kg	Modificar la DM a 12,5 mg/kg para la leche natural (base de nisina pura)	- La DM de la NGAA (500 mg/kg) concuerda con la DM de nisina comercial/preparación de nisina. - Los datos de la necesidad tecnológica apoyan dosis de aplicación de nisina variables dependiendo del tipo de producto, carga microbiana inicial, regímenes de procesamiento térmico y duración del período de validez deseado.
01.4	Nata (crema) (natural) y productos análogos	500 mg/kg	Modificar la DM a 12,5 mg/kg (base de nisina pura)	- La DM de la NGAA (500 mg/kg) concuerda con la DM de nisina comercial/preparación de nisina. - Los datos de la necesidad tecnológica apoyan dosis de aplicación hasta 12,5 mg/kg (base de nisina pura) dependiendo del tipo de producto de nata (crema).
01.6.1	Queso no madurado	500 mg/kg	Modificar la DM a 12,5 mg/kg (base de nisina pura)	- La DM de la NGAA (500 mg/kg) concuerda con la DM de nisina comercial/preparación de nisina. - Los datos de la necesidad tecnológica apoyan dosis de aplicación hasta 250 mg/kg (base de nisina pura) dependiendo del tipo de queso y duración del período de validez deseado. Inhibe la Listeria; no hay ningún método alternativo permitido con el que se pueda obtener el mismo nivel de inocuidad.
01.6.2	Queso madurado	500 mg/kg	Modificar la DM a 12,5 mg/kg (base de nisina pura)	- La DM de la NGAA (500 mg/kg) concuerda con la DM de nisina comercial/preparación de nisina.
01.1	Leche y bebidas lácteas	500 mg/kg	Modificar la DM a 12,5 mg/kg para la leche natural (base de nisina pura)	- La DM de la NGAA (500 mg/kg) concuerda con la DM de nisina comercial/preparación de nisina. - Los datos de la necesidad tecnológica apoyan dosis de aplicación de nisina variables dependiendo del tipo de producto, carga microbiana inicial, regímenes de procesamiento térmico y duración del período de validez deseado.
01.4	Nata (crema) (natural) y productos análogos	500 mg/kg	Modificar la DM a 12,5 mg/kg (base de nisina pura)	- La DM de la NGAA (500 mg/kg) concuerda con la DM de nisina comercial/preparación de nisina. - Los datos de la necesidad tecnológica apoyan dosis de aplicación hasta 12,5 mg/kg (base de nisina pura) dependiendo del tipo de producto de nata (crema).
07.2	Productos de panadería fina (dulces, salados, aromatizados) y mezclas	250 mg/kg	Modificar DM a 6,25 mg/kg (base de nisina pura)	- La DM de la NGAA (250 mg/kg) concuerda con la DM de nisina comercial/preparación de nisina. - Los datos de la necesidad tecnológica apoyan dosis de aplicación de nisina variables dependiendo del tipo de producto.

Fuente: CODEX ALIMENTARIUS.

ANEXO 5

Disposiciones del Codex Alimentarius sobre uso de Metabisulfito de Sodio.

SULFITOS

Dióxido de azufre	SIN: 220	Sulfito sódico	SIN: 221
Sulfito ácido de sodio	SIN: 222	Metabisulfito sódico	SIN: 223
Metabisulfito potásico	SIN: 224	Sulfito de potasio	SIN: 225
Sulfito ácido de calcio	SIN: 227	Bisulfito de potasio	SIN: 228
Tiosulfato de sodio	SIN: 539		

Efecto funcional: Antioxidantes, Decolorantes (no para las harinas), Agentes de tratamiento de las harinas, Sustancias conservadoras

No. Cat. alim	Categoría de alimento	Dosis máxima	Observaciones	Año Adoptada
04.1.1.2	Frutas frescas tratadas en la superficie	50 mg/kg	Note 44	2006
04.1.2.1	Frutas congeladas	500 mg/kg	Notes 44 & 155	2007
04.1.2.2	Frutas desecadas	1000 mg/kg	Notes 44 & 135	2006
04.1.2.3	Frutas en vinagre, aceite o salmuera	100 mg/kg	Note 44	2006
04.1.2.6	Productos para untar a base de fruta (p. ej., el "chutney"), excluidos los productos de la categoría de alimentos 04.1.2.5	500 mg/kg	Note 44	2006
04.1.2.7	Frutas confitadas	100 mg/kg	Note 44	2006
04.1.2.8	Preparados a base de fruta, incluida la pulpa, los purés, los aderezos de fruta y la leche de coco	500 mg/kg	Note 44	2006
04.1.2.11	Rellenos de fruta para pastelería	100 mg/kg	Note 44	2006

Fuente: CODEX ALIMENTARIUS.

ANEXO 6

ANTIBIOGRAMAS

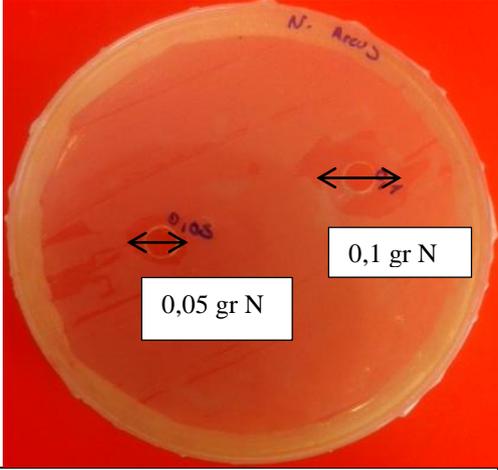
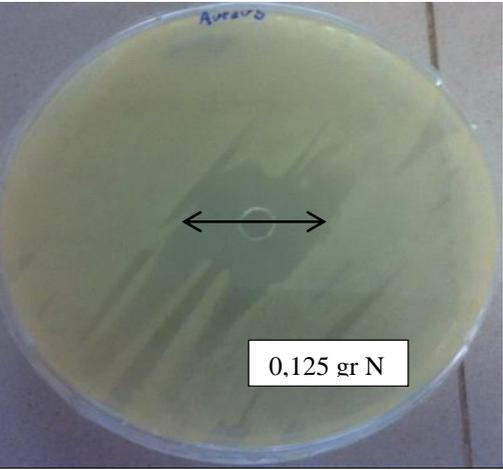
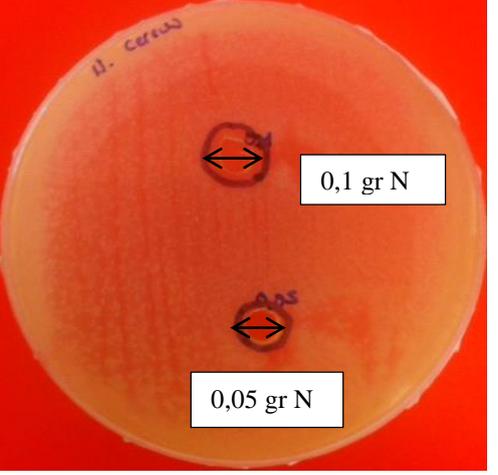
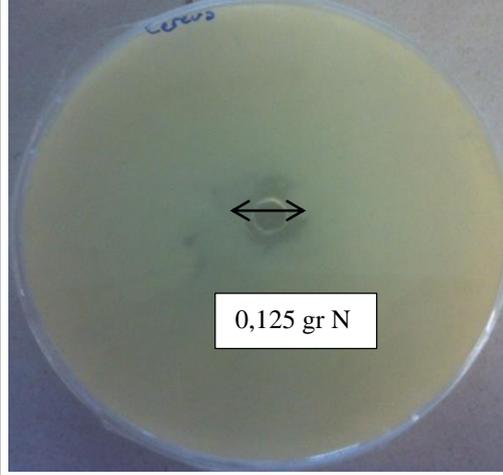
Imagen N. 1	Imagen N.2
	
<p><i>S. aureus-nisina</i> en dosis: 0,05 gr-0,1 gr</p>	<p><i>S. aureus-nisina</i> en dosis: 0,125 gr.</p>

Imagen N.3	Imagen N.4
	
<p><i>B. cereus-nisina</i> en dosis: 0,1gr-0,05gr.</p>	<p><i>B. cereus-nisina</i> en dosis: 0,125gr.</p>

ANTIBIOGRAMA

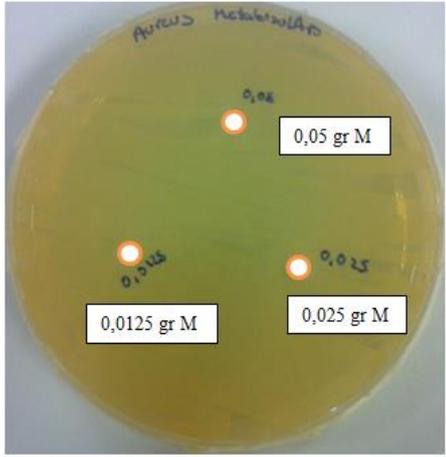
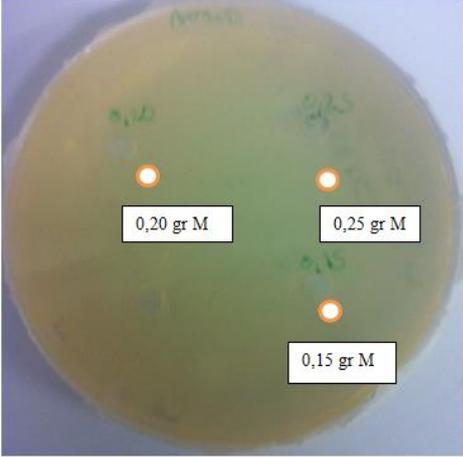
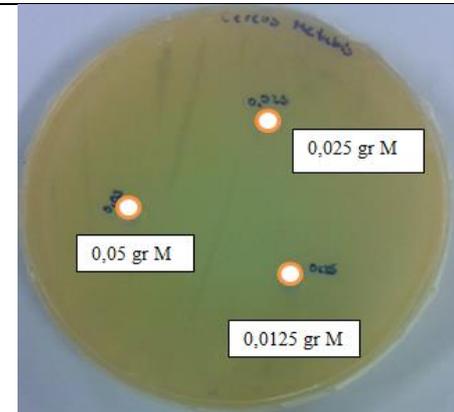
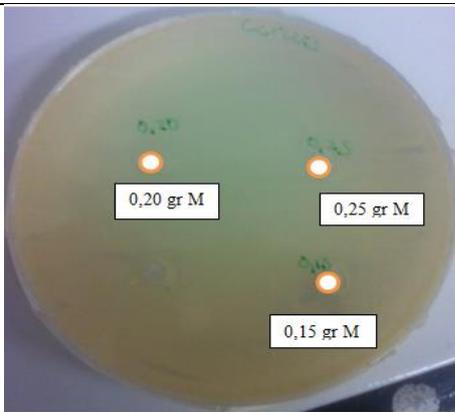
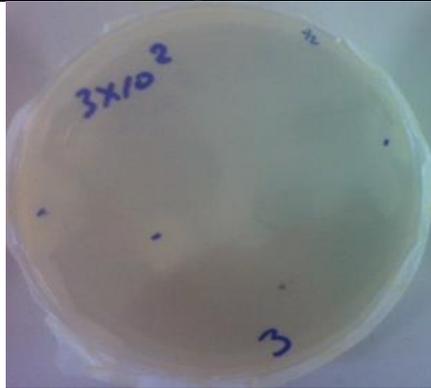
Imagen N.5	Imagen N.6
 <p data-bbox="331 898 746 965"><i>E. aureus</i>-metabisulfito de sodio en dosis: 0,0125gr -0,05gr-0,025gr</p>	 <p data-bbox="831 898 1257 965"><i>E. aureus</i>-metabisulfito de sodio en dosis: 0,15gr -0,20gr-0,25gr.</p>

Imagen N.7	Imagen N.8
 <p data-bbox="320 1514 746 1581"><i>B. cereus</i>-metabisulfito de sodio en dosis: 0,0125gr -0,05gr-0,025gr</p>	 <p data-bbox="786 1514 1273 1581"><i>B. cereus</i>-metabisulfito de sodio en dosis: 0,15gr -0,20gr-0,25gr.</p>

Diluciones Seriadas: Nisina-*E. aureus*

<p style="text-align: center;">Imagen N.9</p>  <p style="text-align: center;">Día 1. <i>E. aureus</i>.-0,125gr Nisina: 300000UFC.</p>	<p style="text-align: center;">Imagen N.10</p>  <p style="text-align: center;">Día 2. <i>E. aureus</i>.-0,125gr Nisina: 80000UFC.</p>
<p style="text-align: center;">Imagen N.11</p>  <p style="text-align: center;">Día 3. <i>E. aureus</i>.-0,125gr Nisina: 80000UFC.</p>	<p style="text-align: center;">Imagen N.12</p>  <p style="text-align: center;">Día 4. <i>S. aureus</i>.-0,125gr Nisina: 200UFC.</p>
<p style="text-align: center;">Imagen N.13</p>  <p style="text-align: center;">Día 5. <i>E. aureus</i>.-0,125gr Nisina: 40UFC.</p>	<p style="text-align: center;">Imagen N.14</p>  <p style="text-align: center;">Día 6. <i>E. aureus</i>.-0,125gr Nisina: 100UFC.</p>

Diluciones Seriadas: Nisina-*B.cereus*

Imagen N.15	Imagen N. 16
 <p data-bbox="300 680 778 712"><i>B. Cereus</i>.-0,125gr Nisina: 300.000UFC</p>	 <p data-bbox="804 680 1203 743">Día 3. <i>B. Cereus</i>.-0,125gr Nisina: 100UFC.</p>

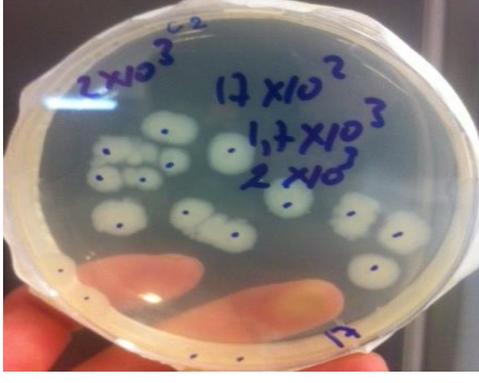
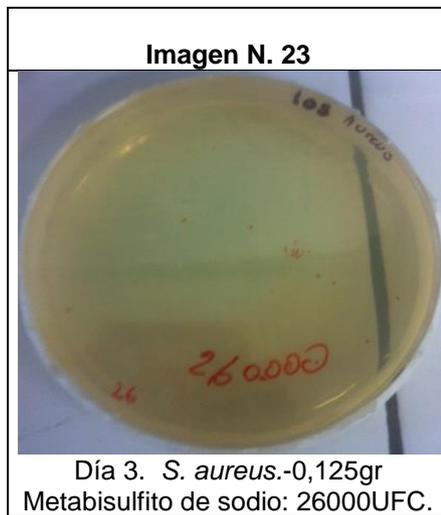
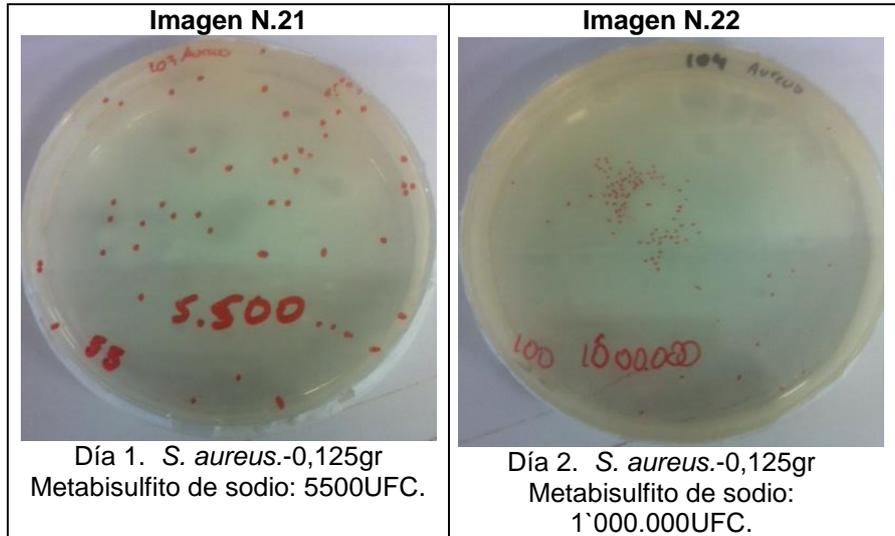
Imagen N.17	Imagen N.18
 <p data-bbox="339 1279 738 1341">Día 3. <i>B. Cereus</i>.-0,125gr Nisina: 100UFC.</p>	 <p data-bbox="906 1267 1217 1330">Día 4. <i>B. Cereus</i>.-0,125gr Nisina: 2000UFC.</p>

Imagen N.19	Imagen N.20
 <p data-bbox="316 1890 794 1921"><i>B. Cereus</i>.-0,125gr Nisina: 100000UFC.</p>	 <p data-bbox="850 1906 1281 1937"><i>B. Cereus</i>.-0,125gr Nisina: 200UFC.</p>

Diluciones seriadas con Metabisulfito de sodio-*S. aureus*.



Diluciones seriadas con Metabisulfito de sodio-B.Cereus.

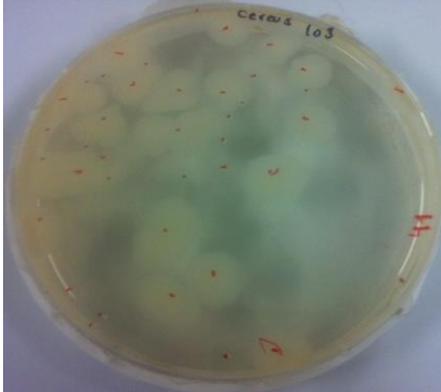
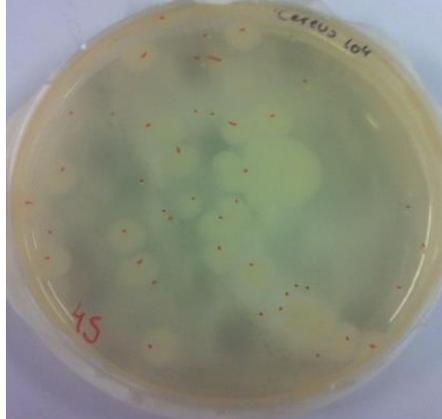
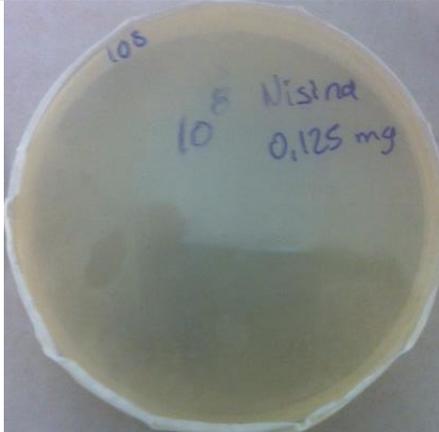
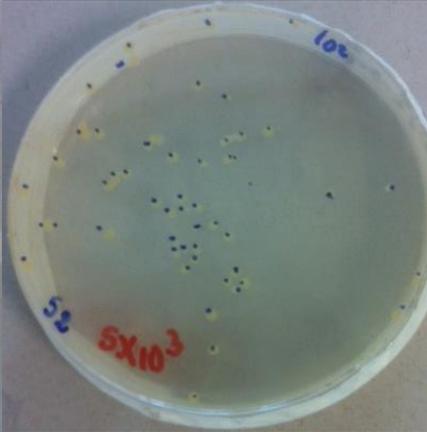
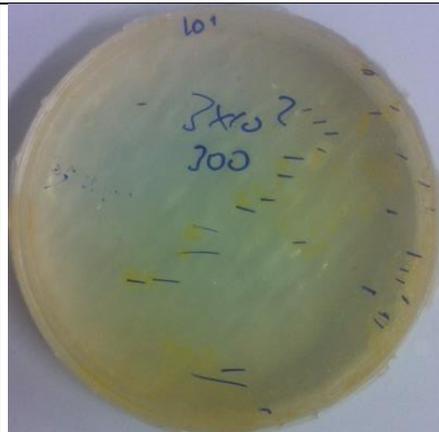
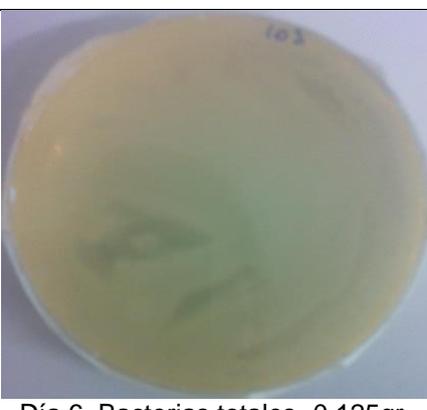
Imagen N.24	Imagen N.25
	
<p>Día 1. <i>B. cereus</i>.-0,125gr Metabisulfito de sodio: 3000UFC.</p>	<p>Día 2. <i>B. cereus</i>.-0,125gr Metabisulfito de sodio: 4000UFC.</p>

Imagen N.26

<p>Día 3. <i>B. cereus</i>.-0,125gr Metabisulfito de sodio: 45000UFC.</p>

Bacterias totales-Nisina

Imagen N. 27	Imagen N. 28
	
<p>Día 1. Bacterias totales- 0,125gr Nisina: 100000000 UFC.</p>	<p>Día 2. Bacterias totales- 0,125gr Nisina: 5000 UFC.</p>
Imagen N. 29	Imagen N.30
	
<p>Día 3. Bacterias totales- 0,125gr Nisina: 300 UFC.</p>	<p>Día 4. Bacterias totales- 0,125gr Nisina: 300 UFC.</p>
Imagen N.31	Imagen N.32
	
<p>Día 5. Bacterias totales- 0,125gr Nisina: 300 UFC.</p>	<p>Día 6. Bacterias totales- 0,125gr Nisina: incontable.</p>

ANEXO 7

Ficha de evaluación sensorial

Nombre _____ Fecha _____

Ante Ud. Hay tres muestras. **Dos de ellas son iguales entre si.**

Pruébelas e indique **cual es la muestra diferente.**

MARQUE CON UNA X LA MUESTRA DIFERENTE

445

127

518

Comentarios _____

MUCHAS GRACIAS

ANEXO 8

Cuadro de Diferencia Significativa

Número de respuestas correctas necesarias para establecer diferencia significativa			
Numero de Juicios	Nivel de Significancia		
	5%	1%	0.1%
7	5	6	7
8	6	7	8
9	6	7	8
10	7	8	9
11	7	8	9
12	8	9	10
13	8	9	10
14	9	10	11
15	9	10	12
16	10	11	12
17	10	11	13
18	10	12	13
19	11	12	14
20	11	13	14
21	12	13	15
22	12	14	15
23	13	14	16
24	13	14	16
25	13	15	17
35	18	19	21
40	20	22	24
45	22	24	26
50	24	26	28
60	28	30	33
70	32	34	37
80	35	38	41
85	37	40	43
90	39	42	45
95	41	44	47
100	43	46	49
200	80	84	89
300	117	122	127
400	152	158	165
500	188	194	202
1000	363	372	383
2000	709	722	737

