

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE MANABÍ
MANUEL FÉLIX LÓPEZ**

DIRECCIÓN DE POSGRADO Y FORMACIÓN CONTINUA

**INFORME DE INVESTIGACIÓN
PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MAGISTER EN
AGROINDUSTRIA**

MODALIDAD:

Trabajo de Titulación

TEMA:

**EFFECTO DE LA ϵ -POLILISINA Y PROPÓLEO COMO
CONSERVANTES EN LA VIDA ÚTIL DEL YOGURT**

AUTORAS:

LIC. NIEVE ESTHER LECTONG CUSME

ING. NEIVA MARICELA QUIÑONEZ BECERRA

TUTOR:

ING. JOSÉ FERNANDO ZAMBRANO RUEDAS, MG.

CALCETA, DICIEMBRE 2020

DERECHOS DE AUTORÍA

NIEVE ESTHER LECTONG CUSME y NEIVA MARICELA QUIÑONEZ BECERRA declaramos bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de nuestra autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional, que se han respetado los derechos de autor de terceros, por lo que asumimos la responsabilidad sobre el contenido del mismo, así como ante la reclamación de terceros, conforme a los artículos 4, 5 y 6 de la Ley de Propiedad Intelectual.

A través de la presente declaración, cedemos los derechos de propiedad intelectual a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido en el artículo 46 de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.



NIEVE ESTHER LECTONG CUSME



NEIVA MARICELA QUIÑONEZ BECERRA

CERTIFICACIÓN DE TUTOR

Mg. FERNANDO ZAMBRANO RUEDAS, certifica haber tutelado el trabajo de titulación de, **EFFECTO DE ϵ -POLILISINA Y PROPÓLEO COMO CONSERVANTES EN LA VIDA ÚTIL DEL YOGURT** que ha sido desarrollado por **NIEVE ESTHER LECTONG CUSME Y NEIVA MARICELA QUIÑONEZ BECERRA**, previo la obtención del título de Magister en Agroindustria de acuerdo al Reglamento de unidad de titulación de los programas de Posgrado de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



Mg. FERNANDO ZAMBRANO RUEDAS

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos, integrantes del tribunal correspondiente, declaramos que hemos APROBADO el trabajo de titulación EFECTO DE LA ϵ -POLILISINA Y PROPÓLEO COMO CONSERVANTES EN LA VIDA ÚTIL DEL YOGURT, que ha sido propuesto, desarrollado y sustentado por NIEVE ESTHER LECTONG CUSME Y NEIVA MARICELA QUIÑONEZ BECERRA, previa la obtención del título de Magister en Agroindustria, de acuerdo al Reglamento de la unidad de titulación de los programas de Posgrado de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.



Mg. FRANCISCO DEMERA LUCAS

MIEMBRO



Mg. NELSON MENDOZA GANCHOZO

MIEMBRO



Mg. ROSANNA KATERINE LOOR CUSME

PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

Queremos expresar nuestra gratitud a Dios, quien con su bendición llena siempre nuestras vidas, por guiarnos a lo largo de nuestra existencia, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad y a toda nuestra familia por estar siempre presente.

A la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López nuestro agradecimiento inmenso por darnos la oportunidad de crecer profesionalmente.

Gracias a nuestros padres por la vida que nos dieron, que sin lugar a duda desde el cielo nos dan esa fuerza necesaria y sean los principales promotores de nuestros sueños, por confiar y creer en nuestras expectativas, por los consejos, valores y principios que nos inculcaron.

Agradecemos a nuestros docentes, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de nuestra maestría, a los tutores de nuestro proyecto de investigación quienes guiaron con su paciencia y su rectitud como docentes, por habernos orientado en todos los momentos que necesitamos su apoyo incondicional.



Lcda. Nieve Esther Lectong Cusme



Ing. Neiva Maricela Quiñonez Becerra

DEDICATORIA

“Un triunfador es aquel que se levanta y busca las circunstancias que desea y si no las encuentra, las fabrica”.

Cada día, en cada paso que damos, la vida nos enseña que debemos luchar incansablemente por lo que tanto anhelamos, sin importar cuán difícil haya sido el recorrido. El deseo de superarnos nos hace indestructibles, las ganas de llegar a la cima nos hacen seres sedientos de conocimientos, pero es gratificante cuando eres el principal testigo de que en el transcurso de la lucha no importaron las circunstancias, siempre estuviste allí dando lo mejor de sí mismo para lograrlo.

Por ello, quiero dejar constancia en este documento que, por todo lo realizado dedico el presente trabajo a Dios Nuestro Señor por permitirme llegar hasta la finalización del presente trabajo con optimismo, además, por la salud, la fe y el amor que me ha dado por lograr cumplir uno de los objetivos de mi vida.

A mi familia por ser el pilar ineludible de lo que soy y lo que he avanzado.

A mis amigos y compañeros, por el apoyo recibido en cada fase de este escalón de formación profesional.

A los docentes, por el apoyo, paciencia, dedicación y baluarte demostrado con sus enseñanzas en cada etapa de la Maestría.



Lcda. Nieve Esther Lectong Cusme

DEDICATORIA

Dedico este proyecto académico a Dios por ser la fuente eterna y por darme el conocimiento en el saber, quién con su misericordia suprema me da vitalidad, intelectual, física y espiritual, con todas las dificultades y superar todas las debilidades y así arribar a la orilla del éxito en esta tarea científica del cuarto nivel.

Elevo también esta dedicatoria a mis padres Wilfrido Quiñonez y Neiva Becerra quienes cual antorcha de luz iluminaron la senda noble de los principios que me orientaron el camino para vivir con valores éticos y firmeza en el estudio y el trabajo, hoy desde el más allá, es decir desde el cielo me siguen mis padres guiándome para lograr mis pequeñas y grandes metas, tanto académica, el buen vivir y la disciplina del alma.

En el sentido dedico muy agradecidamente a mis hermanos Mercedes y Luis Quiñonez a mi esposo Eduardo Tenorio, a mis hijos Eduardo y Katherine Tenorio ya que me ofrendaron un abanico de apoyo incondicional como una diáfana primavera que se fundieron en un solo sueño, y al fin se materializó la concreción de mi meta de estudio.

También mi más efusiva dedicatoria a mis catedráticos que fueron fuentes de conocimiento que nutrieron mis conocimientos en el procedimiento de la enseñanza aprendizaje, fueron facilitadores idóneos y del más alto niveles del conocimiento.



Ing. Neiva Maricela Quiñonez Becerra

CONTENIDO GENERAL

DERECHOS DE AUTORÍA	ii
CERTIFICACIÓN DE TUTOR	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
DEDICATORIA.....	vi
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
1.2. JUSTIFICACIÓN	4
1.3. OBJETIVOS	7
1.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	7
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
1.4. HIPÓTESIS	7
CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1. YOGURT	8
2.2. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAM).....	16
2.2.1. ϵ -POLILISINA	22
2.3. PROPÓLEO	25
2.4. LECHE	29
2.4.1. LECHE FERMENTADAS	31
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO	33
3.1. UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	33
3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN	33
3.3. FACTOR EN ESTUDIO	33
3.4. TRATAMIENTOS	33
3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL	34
3.6. UNIDAD EXPERIMENTAL	34
3.7. ELABORACIÓN DEL YOGURT	35
3.7.1. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO.....	36
3.8. VARIABLES A MEDIR Y MÉTODO DE EVALUACIÓN.....	38
3.8.1. ACIDEZ TITULABLE	38
3.8.2. pH.....	39
3.8.3. CONTEO DE ESCHERICHIA COLI	39
3.8.4. CONTEO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.....	39
3.8.5. RECUENTO DE MOHOS Y LEVADURAS	39
3.8.6. EVALUACIÓN SENSORIAL.....	39
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	40
3.9.1. TRATAMIENTO DE DATOS.....	41
3.9.2. ESTUDIO DE VIDA ÚTIL.....	41
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
4.1. EFECTOS DE LOS CONSERVANTES SOBRE EL pH Y LA ACIDEZ.....	42
4.2. EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO SOBRE EL pH Y LA ACIDEZ.....	45
4.3. CONTEO DE ESCHERICHIA COLI	47
4.4. CONTEO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.....	48
4.5. VIDA ÚTIL DEL YOGURT	48
4.6. EVALUACIÓN SENSORIAL.....	52
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52

4.1. CONCLUSIONES	53
4.2. RECOMENDACIONES	53
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	67

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de proceso para la elaboración de yogurt.	36
Figura 2. Efecto de los tratamientos con diferentes concentraciones de conservantes (ϵ -polilisina + propóleo) sobre el pH de muestras de yogurt mantenidas a 4°C durante 30 días,	43
Figura 3. Efecto de los tratamientos con diferentes concentraciones de conservantes (ϵ -polilisina + propóleo) sobre la acidez de muestras de yogurt mantenidas a 4°C durante 30 días.	44
Figura 4. Representación cinética del efecto de los tratamientos con diferentes concentraciones de conservantes (ϵ -polilisina + propóleo) sobre el pH de muestras de yogurt mantenidas a 4°C evaluadas en 0, 15 y 30 días de almacenamiento.	45
Figura 5. Representación cinética del efecto de los tratamientos con diferentes concentraciones de conservantes (ϵ -polilisina + propóleo) sobre la acidez de muestras de yogurt mantenidas a 4°C evaluadas en 0, 15 y 30 días de almacenamiento.	45
Figura 6. Comportamiento de las UP/g de mohos en el tratamiento 1 de yogurt con conservantes naturales de ϵ -polilisina y propóleo.	48
Figura 7. Comportamiento de las UP/g de mohos en el tratamiento 2 de yogurt con conservantes naturales de ϵ -polilisina y propóleo.	48
Figura 8. Comportamiento de las UP/g de mohos en el tratamiento 3 de yogurt con conservantes naturales de ϵ -polilisina y propóleo.	49
Figura 9. Comportamiento de las UP/g de mohos en el tratamiento 4 de yogurt con conservantes naturales de ϵ -polilisina y propóleo.	49
Figura 10. Comportamiento de las UP/g de mohos en el tratamiento 5 de yogurt con conservantes naturales de ϵ -polilisina y propóleo.	50

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. Cantidad máxima de inhibición in vitro de la ϵ -polilisina para diferentes bacterias.	25
Tabla 2. Niveles de los tratamientos.	34
Tabla 3. Características de los tratamientos.	34
Tabla 4. Componentes y pesos utilizados para la preparación del Yogurt, así como cantidad de conservantes agregados en cada tratamiento.	35
Tabla 5. Esquema de ANOVA.	40
Tabla 6. Verificación del supuesto de normalidad en los datos de pH y acidez titulable de muestras de yogurt a tratamientos con mezcla de preservantes, propóleo y ϵ -polilisina (factor a) mediante la prueba de Shapiro-Wilk a un 95% de confianza.	42
Tabla 7. Verificación del supuesto de homogeneidad de varianzas en los datos de pH y acidez titulable de muestras de yogurt sometidas a tratamientos con mezcla de preservantes propóleo y ϵ -polilisina (factor a), mediante la prueba de Levene, con un 95% de confianza.	42
Tabla 8. Resultados del análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis para tratamientos.	43
Tabla 9. Valores para el modelo cinético de la variable pH.	44
Tabla 10. Valores para el modelo cinético de la variable acidez.	45
Tabla 11. Recuento de E. coli en muestras de yogurt con combinación de preservantes ϵ -polilisina y propóleo, durante su almacenamiento a 4°C.	46
Tabla 12. Recuento de S. aureus en muestras de yogurt con combinación de preservantes ϵ -polilisina y propóleo, durante su almacenamiento a 4°C.	47

Tabla 13. Recuento de mohos y levaduras (UP/g) en muestras de yogurt con combinación de preservantes ϵ -polilisina y propóleo, durante su almacenamiento a 4°C. 47

Tabla 14. Análisis de los resultados de la evaluación por 75 panelistas no entrenados de muestras de Yogurt sometidas a tres tratamientos con combinación de conservantes ϵ -polilisina y propóleo, luego de 30 días de almacenamiento a 4°C. 51

CONTENIDO DE ANEXOS

Anexo 1. Desinfección de materiales para elaboración del yogurt en el laboratorio de lácteos, UTM, extensión Chone. 67

Anexo 2. Descremado de la leche en el laboratorio de lácteos, UTM, extensión Chone. 68

Anexo 3. Datos de los análisis de pH, acidez y mohos y levaduras en las muestras de yogurt con conservantes. 69

Anexo 4. Escala hedónica utilizada en la evaluación sensorial del yogurt. 70

Anexo 5. Evaluación sensorial de las muestras de yogurt en la ESPAM por parte de panelistas no entrenados. 71

Anexo 6. Certificado de resultados de los análisis de calidad a las muestras de yogurt. 72

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de las diferentes mezclas de ϵ - Polilisina y Propóleo en la vida útil del yogurt, siendo una investigación de tipo experimental. Se realizaron 5 tratamientos de mezcla de ϵ - polilisina y propóleo en un diseño completamente aleatorizado con 3 réplicas. Se estudió el comportamiento de la mezcla de conservantes sobre el pH, la acidez, el recuento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, mohos y levaduras, así como el comportamiento cinético de las propiedades físico químicas del yogurt almacenado a una temperatura de 4 °C durante 30 días. El pH disminuyó significativamente con los conservantes, siendo el valor de los tratamientos T4-T5 ($4,33\pm 0,36$) mayor al de T1-T2-T3 ($4,06\pm 0,21$), considerados más ajustados a las normas internacionales. No se registró presencia de *E. coli* ni *S. aureus*. Se calculó el tiempo de vida útil del producto teniendo como indicador el recuento de mohos y levaduras, mediante la ecuación de Labuza, siendo el tratamiento 1 (5 mg ϵ -polilisina – 1 mL propóleo) el que permitió un tiempo más prolongado de vida útil (123 días). El análisis sensorial se realizó con 75 panelistas no entrenados, quienes indicaron que los tratamientos 2 (10 mg ϵ -polilisina y 0,9 mL propóleo) y 3 (15 mg ϵ -polilisina y 0,8 mL propóleo) tuvieron la mayor aceptabilidad general.

PALABRAS CLAVE

Leche fermentada, antimicrobiano, conservantes, mohos, levaduras.

ABSTRACT

This study evaluated the effect of the different mixtures of ϵ -Polylysine and Propolis on the shelf life of yogurt, being an experimental research. Five treatments with mixtures of ϵ -polylysin and propolis were evaluated in a completely randomized design with 3 replicas. The behavior of the preservative mixtures on pH, acidity, counts of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and molds and yeasts, as well as the kinetic behavior of the physical and chemical properties of yogurt stored at a temperature of 4 °C for 30 days was studied. A significant decrease of pH was observed with preservatives, with the value of T4-T5 treatments (4.33 ± 0.36) higher than T1-T2-T3 (4.06 ± 0.21), which were considered more in compliance with international standards. No presence of *E coli* or *S aureus* was recorded. The shelf life of the product was calculated taking as an indicator the count of molds and yeasts, using the Labuza equation, being treatment 1 (5 mg ϵ -polylysine – 1 mL propolis) the one that allowed a longer shelf life (123 days). Tasting analysis was performed with 75 untrained panelists, who indicated that treatments 2 (10 mg ϵ -polylysine and 0.9 mL propolis) and 3 (15 mg ϵ -polylysine and 0,8 mL propolis) had the highest overall acceptability.

KEY WORDS

Fermented milk, antimicrobial, preserving agents, mold, yeast.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

En la actualidad y debido a la evolución en la industria alimentaria, las nuevas tendencias en los estilos de vida y los hábitos alimentarios de la sociedad, los intereses del consumidor son cada vez más rigurosos. Estos exigen productos más saludables, inocuos y naturales, que sean de buena calidad, nutritivos y fáciles de consumir, pero a la vez, microbiológicamente seguros y estables. Todo esto se convierte en la prioridad en cuanto al mercado de los alimentos.

Para conservar un alimento es preciso aplicar un conjunto de técnicas que asumirán como objetivo principal extender el tiempo de vida útil y la disponibilidad de los alimentos para el consumo, como lo manifiestan Carrera y Henry (2016). La pérdida o disminución de la calidad en el alimento puede ser causada por microorganismos y/o por diversas reacciones fisicoquímicas, que se presentan una vez concluidos los procesos de preparación y acondicionamiento.

El yogurt, en particular, presenta problemas en la etapa de conservación, pues surgen inconvenientes tales como acidez excesiva ocasionada por presencia de microorganismos, sabor picante ocasionado por un exceso de conservantes como sorbato de potasio, y sabores extraños también ocasionado por la presencia de microorganismos (Iriberry, 2014). Para evitarlo, se puede emplear métodos de conservación físicos, químicos o la combinación de ambos.

Un factor importante que permiten identificar las causas del deterioro de un alimento, son sus propiedades fisicoquímicas, las cuales condicionan la posibilidad de crecimiento de microorganismos (Clayton et al., 2016). Sin embargo, la aplicación exclusiva de procedimientos físicos no permite garantizar la conservación de los alimentos. En este sentido, se agregan conservantes químicos cuyo propósito es reducir a un mínimo el crecimiento de microorganismos deterioradores o patogénicos, provocando condiciones de estrés en el ciclo celular

de los microorganismos, que causen su muerte o inhiban su tasa de crecimiento (Alzamora et al., 2004). También debe considerarse que, de todas las alteraciones, la causada por microorganismos es una de las más preocupantes en la industria alimentaria, porque además de que se degraden los nutrientes pueden dar lugar a intoxicaciones graves (Southgate, 1992).

Las sustancias químicas que se usan como conservantes no han variado desde hace tiempo, pues ha sido difícil encontrar nuevos compuestos con acciones mejores o más amplias, que a la vez carezcan o posean una débil toxicidad (Cubero et al., 2002).

En la actualidad, existe una alta demanda de alimentos con etiquetas limpias, es decir, con cantidades mínimas de conservantes artificiales, debido a que se les asocia con enfermedades e intoxicaciones (Carrera y Henry, 2016). Lo anterior, ha llevado a la industria a buscar nuevas alternativas de conservación de alimentos que cumplan las mismas funciones que las sustancias químicas artificiales y tengan buena compatibilidad, siendo una de estas alternativas los bioconservantes (Gálvez et al., 2011).

Con estos antecedentes, los antimicrobianos naturales son compuestos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos. Uno de estos compuestos es la ϵ -polilisina, que es un homopolímero que contiene aproximadamente 30 subunidades de L-lisina, unidas por un enlace peptídico entre el grupo carboxílico y el grupo ϵ amino de las moléculas de lisina adyacentes (Chheda & Vernekar, 2015; Hiraki, 2003).

La ϵ -polilisina se produce a partir de la fermentación bacteriana aeróbica de *Streptomyces albulus*. Este compuesto natural es estable a altas temperaturas, en condiciones ácidas y alcalinas y tiene una amplia gama de actividad antimicrobiana. Las propiedades ventajosas de ϵ -polilisina son adecuadas para la preparación de películas antimicrobianas (Zhang et al., 2015).

Otro bioconservante que presenta buenas características de conservación es el propóleo, que ha sido ampliamente reconocido por sus propiedades

antimicrobianas (Gutiérrez-Cortés y Suarez, 2014). Para Vargas-Sánchez et al. (2014) es un producto compuesto principalmente por resinas y exudados de árboles recolectados por las abejas; también contienen cera, polen y algunas secreciones. En la colmena, por ejemplo, es usado para sellar las entradas y cumple funciones de antioxidante, antimicrobiano y anti fúngicas. Varios estudios destacan los beneficios que puede brindar en la salud del hombre como: efecto antioxidante, antitumoral, antiinflamatorio (Carrera y Henry, 2016).

No obstante, la actividad antimicrobiana constituye la propiedad biológica más estudiada y lo convierte en un potencial bioconservante. Bogdanov (2011) señala el efecto del propóleo contra bacterias, parásitos y virus.

Dentro de su capacidad bioconservadora, el propóleo contiene compuestos activos que desempeñan las diferentes funciones biológicas, como son: los flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres. Los flavonoides están más correlacionados con la actividad biológica, sin embargo, no es exclusivo de estas moléculas. La sinergia entre las moléculas que componen el propóleo tiene efecto sobre las bacterias (Carrera y Henry, 2016).

En cuanto al mecanismo de acción del propóleo, su efecto antimicrobiano es debido a que los flavonoides presentes en los propóleos poseen una acción directa sobre las membranas de algunas bacterias, reduciendo su capacidad de permeabilidad y haciéndola más frágil. Además, los flavonoides se caracterizan por actuar de forma similar al ácido nicotínico, dándole propiedades oxido reductoras, en sinergia con el ácido ascórbico (López et al., 2012). Diferentes estudios corroboran esta afirmación, aunque la principal causa de su efectividad antimicrobiana dependerá del origen botánico, composición química y estación del año en que se recolecta (Vargas-Sánchez et al., 2014).

Debido a que se ha demostrado el efecto inhibidor de la ϵ -polilisina y de la actividad antimicrobiana del propóleo en varias investigaciones, aún no se conoce su efecto en bebidas lácteas fermentadas como el yogurt.

Por lo antes expuesto, la pregunta de investigación es la siguiente: ¿Es posible que el añadir mezclas de ϵ -polilisina y propóleo afecten la vida útil del yogurt?

1.2. JUSTIFICACIÓN

La industria de alimentos está en constante desarrollo, mejorando los productos con nuevos ingredientes y tecnologías de procesado, que sirvan de alternativa frente a los conservantes químicos y tratamientos térmicos convencionales. Esto permitirá obtener alimentos seguros, inocuos y que los mismos conserven las propiedades organolépticas y nutricionales del alimento. Al respecto, Castellano et al. (2008) consideran que en la actualidad se está dando un interés primordial en las técnicas de preservación de los alimentos que sean capaces de eliminar o impedir el desarrollo de microorganismos.

La creciente demanda de productos que utilicen menores cantidades de sustancias químicas, ha llevado a esfuerzos por parte de la industria en estudiar estos comportamientos del mercado y más que nada en la utilización de sustitutos como es el caso de los agentes bioconservantes, debido a que los consumidores se inclinan por los alimentos sin conservantes químicos.

Los conservantes químicos son sustancias que se añaden a los productos alimenticios para protegerlos de alteraciones biológicas como fermentación, enmohecimiento y putrefacción. Un aspecto a considerar es que ningún aditivo conservador es eficaz sobre todo el espectro contaminante, por lo que se requiere un antimicrobiano natural que, aunque aumente la dosis, no cause efectos adversos al consumidor, encaminados a obtener una máxima inhibición de la actividad microbiana y un mínimo deterioro del valor nutritivo o de la aceptabilidad del producto (Maldonado, 2015).

La inocuidad es uno de los cuatro grupos básicos de características que, junto con los nutricionales, los organolépticos y las comerciales, componen la calidad total de los alimentos; siendo de esta manera un producto que no ocasiona daño o

enfermedades a la persona que lo consume, obteniendo en el consumidor una gran importancia fundamental e indiscutible (De la Fuente y Corona, 2012).

Los conservantes, motivado a sus propiedades antimicrobianas, desempeñan papel fundamental para prevenir alteraciones y asegurar la inocuidad de gran cantidad de alimentos, como: pescado, carne, vegetales, frutas, entre otros. Esto ha provocado que, en el ámbito científico, se manifieste interés sobre la bioconservación de alimentos, para proporcionar valiosa información del potencial de los conservantes (Villada Moreno, 2010).

En la actualidad se han realizado investigaciones del propóleo como agente antimicrobiano en *Listeria spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Escherichia coli* y especies de *Pseudomonas* (Stan et al., 2013), *Bacillus subtilis* (Shahbaz et al., 2015), *Staphylococcus aureus* (Manrique y Santana, 2008; Shahbaz et al., 2015; Kai et al., 2015). En otro estudio, Villanueva et al. (2015) demostraron la efectividad antibacteriana in vitro, sobre 10 cepas de *Helicobacter pylori* a partir de la evaluación de 22 propóleos, de origen botánico diferente. Así mismo, el extracto etanólico de propóleo, demostró actividad bactericida contra *Listeria monocytogenes* en estudios in vitro, sin embargo, no resultó efectivo al tratar melones inoculados con *L. monocytogenes* (Vicente y Escobar, 2012).

También existe evidencia científica sobre el uso de ϵ -polilisinina en la industria alimentaria. A fines de la década de 1980, debido a su seguridad y fuerte actividad antimicrobiana, ϵ -polilisinina fue aprobado por el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar de Japón como conservante de alimentos (Chheda & Vernekar, 2015). Desde entonces, se ha utilizado en Japón y Corea como conservante para múltiples alimentos (Hiraki, 2000; Otsuka, et al., 1992). En 2004, la FDA aprobó su uso en sushi y arroz cocido como conservante de alimentos (Food and Drugs Administration US, 2004).

La FDA (Food and Drug Administration de los EE. UU) en el 2004 confirmó que la ϵ -polilisinina es un aditivo GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) que se puede utilizar para la conservación de diferentes alimentos (Chheda & Vernekar, 2015).

La ϵ -polilisina se utiliza en la conservación de alimentos como arroz, sopas, fideos y verduras cocidas en concentraciones de 10 a 500 ppm, mientras que en el pescado y el sushi se utilizan concentraciones más altas: 1000 a 5000 ppm (Wang et al., 2012).

Varios estudios relacionados con la ϵ -polilisina han demostrado su efecto antimicrobiano frente a *L. monocytogenes* y *Bacillus cereus* (Najjar et al., 2007), frente a *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, y *Saccharomyces cerevisiae* (Gao et al., 2013), contra *E. coli* O157:H7 (Shi et al., 2016; Zahi et al., 2017).

Una de las ventajas que presenta la ϵ -polilisina es que es termoestable, biodegradable y soluble en agua, sin toxicidad para la salud humana y el medio ambiente. Debido a estas características, se ha utilizado en muchas aplicaciones novedosas como es el campo de la alimentación, la medicina, el medio ambiente y la agricultura (Pandey & Kumar, 2014). En la alimentación, se ha aplicado la ϵ -polilisina como conservante natural de carnes, por tener una excelente actividad antimicrobiana y estabilidad térmica (Chheda & Vernekar, 2015).

En base a lo expuesto anteriormente, el interés de la presente investigación es demostrar el uso potencial de la ϵ -polilisina y propóleo como bioconservantes, y el uso de temperaturas de refrigeración para la conservación de yogurt. Se pretende buscar una alternativa en la conservación en la industria alimentaria, brindando la posibilidad de producir alimentos utilizando bioconservantes para estar a la vanguardia de las tendencias del mercado y el cuidado de la salud de los consumidores. Se aporta así a mejorar la economía de las empresas lácteas y al desarrollo de nuevos productos en el ámbito agroindustrial, siendo fundamental en el progreso de la provincia y del país.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la mezcla de ϵ -polilisina y propóleo en la vida útil del yogurt.

1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el tiempo de vida útil del yogurt, bajo el efecto de conservantes naturales como inhibidores de crecimiento microbiano.
- Identificar mediante análisis estadístico de las características físico químicas, los mejores tratamientos en concentración de conservantes y tiempo de almacenamiento del yogurt.
- Establecer la aceptabilidad sensorial de los mejores tratamientos, mediante catadores no entrenados.

1.4. HIPÓTESIS

La aplicación adecuada de ϵ -polilisina y propóleo combinados influye en las características físico-químicas, y aceptabilidad sensorial del yogurt, alargando de manera significativa su vida útil sin afectar sus características organolépticas.

CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. YOGURT

No existen registros históricos, confiables o disponibles sobre el origen del yogurt (Shah, 2003; Hussain et al., 2009), pero se cree que la fermentación fue la primera técnica empleada por los humanos para preservar alimentos (Shah, 2003). Continúa este autor indicando que los primeros registros ubican el origen del yogurt en el Cercano Oriente, en zonas de Bulgaria habitadas por los tracios, y en Turquía.

Otras referencias históricas y literarias sobre el yogurt consideran que su origen remite a la costumbre de los pastores de llevar leche durante sus largas jornadas de trabajo, en odres hechos con piel de animales que contenían fermentos propios y por acción del calor, la leche sufría transformaciones que la convertían naturalmente en yogurt.

El yogurt contiene mayor biodisponibilidad de nutrientes que la leche (Hui, 1993), destacando el incremento de la digestibilidad de la proteína y de la grasa debido a ciertas reacciones de predigestión durante la fermentación (Kumar & Mishra, 2004). Comparando la leche con el yogurt, este último es más nutritivo en términos de contenido de vitaminas, digestibilidad y como fuente de calcio y fósforo (Zahoor et al., 2003).

Su composición depende del tipo de leche de la cual proviene y de una gama de factores estacionales como: leche entera o leche descremada, estación del año, periodo de lactación y el modo de alimentación del bovino (Hussain et al., 2009; Adolfsson et al., 2004).

El proceso de elaboración de yogurt tiene como principal objetivo, desde el punto de vista fisicoquímico, provocar el descenso de pH de la leche hasta alcanzar las condiciones favorables para su coagulación (Pauletti et al., 2003). La popularidad del yogurt se deriva de características como el sabor agradable, consistencia

cremosa y espesa, esta reputación como alimento ha estado asociado con la buena salud.

Al respecto y debido al aumento en la población mundial, es importante la prevención y tratamiento de enfermedades y maximizar la calidad de vida. Se ha observado in vitro e in vivo que los productos lácteos fermentados con bacterias ácido-lácticas (BAL) tiene propiedades funcionales porque ayudan a incrementar la habilidad del cuerpo para resistir la invasión de patógenos y mantener bien la salud del hospedero que las aloja.

Estas BAL desempeñan un papel importante en los procesos de fermentación; ellas son muy utilizadas en la industria alimentaria, no solamente por su habilidad por acidificar y por lo tanto preservar alimentos de las esporas, sino también su implicación en la textura, sabor, olor y desarrollo de aroma de alimentos fermentados (Parra, 2010).

● **Clasificación del yogurt**

El yogurt puede ser clasificado según el método de elaboración, por el sabor y por el contenido de grasa (Alcázar, 2002).

Por el contenido de grasa

- Yogurt entero.
- Yogurt semi descremado.
- Yogurt descremado.

● **Características químicas del yogurt**

a) Acidez y pH

La acidez y pH indica la coagulación acida de la caseína, es decir, la formación en el punto isoeléctrico aproximadamente a un pH 4,65 de un gel de yogurt, es otro

signo de marca final de la incubación y de la fermentación. Este gel ha de presentar un aspecto cuajado homogéneo, no debiendo exudar agua (suero) (Spreer, 1991).

- **Características físicas**

Viscosidad

Según Sandoval y Giurfa (2001) los factores que afectan la viscosidad del yogurt son los siguientes:

- Contenido de grasa.
- Temperatura de incubación. A mayor temperatura la viscosidad disminuye.
- pH durante el enfriamiento, están en función del punto isoeléctrico de las proteínas.
- Almacenamiento.
- Concentración de sólidos en la leche.
- Velocidad de enfriamiento.

- **Características microbiológicas**

Para el desarrollo de las bacterias lácticas *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en el yogurt, deben sembrarse simultáneamente y encontrarse viables en el producto en una cantidad como mínimo de 10^7 bacterias/g. la cantidad de ácido láctico no debe ser inferior a 0,7g/100g en el momento de la venta al consumidor (Mahaut et al., 2004).

- **Proceso de elaboración del yogurt batido**

a) Recepción de la leche

La recepción de la leche es el proceso mediante el cual la planta procesadora realiza los análisis de plataforma con el fin de aceptarla o rechazarla, verifica las

cantidades recibidas y obtiene muestras para efectuar los análisis de laboratorio que permiten determinar la calidad de la materia prima (Mazzeo, 2007).

b) Estandarización

La estandarización es la normalización del contenido de grasa y sólidos. La grasa entre 0,5 a 1,5% y sólidos 11 a 12%. Los sólidos se pueden ajustar con leche o suero en polvo. También se puede ajustar los sólidos por concentración con calor, aumentando los sólidos totales en un 2 a 4% (Mazzeo, 2007).

La estandarización se puede efectuar mediante la adición de leche descremada o crema según se desee bajar o subir el contenido de grasa, por medio de la separación parcial de la grasa en un desnatador centrífugo o descremadora, ajustando de esta manera el contenido de la grasa de la leche (Alcázar, 2002). Además, la homogenización impide la separación de la materia grasa durante la coagulación, mejora la retención de agua y la firmeza del producto final (Mahaut et al., 2004).

c) Tratamiento térmico de la leche

El tratamiento térmico tiene como propósito disminuir, mediante calor, casi toda la flora microbiana y la totalidad de la flora patógena, alterando lo menos posible la estructura física de la leche, su equilibrio químico y las sustancias con actividad biológica, por ejemplo, enzimas y vitaminas. La pasteurización no destruye todos los microorganismos, aunque reduce mucho su número y en muchos casos no destruye los microorganismos esporulados.

El tratamiento debe cumplir unos mínimos de temperatura y duración, como es de 62,8 °C durante 30 minutos o de 72,8 °C durante 16 segundos (Santos, 2007; Amiot, 1991). Se puede distinguir dos tipos de pasteurización: pasteurización baja, el cual se define por un calentamiento a 63 °C durante 30 minutos.

Por lo consiguiente es un método lento y discontinuo, pero presenta la ventaja de no modificar las propiedades de la leche. Otro tipo es la pasteurización alta, la cual

se define como el calentamiento a 72 °C durante 15 segundos, este método es rápido y continuo, pero modifica ligeramente las propiedades de la leche (Veisseyre, 1980).

d) Enfriamiento

Es necesario realizar el enfriamiento rápidamente luego de la pasteurización, y se debe bajar la temperatura hasta 42 a 45 °C para la inoculación del fermento. Luego del enfriamiento, se debe llevar tan pronto sea posible, para que el yogurt no se acidifique en exceso y por ende la post acidificación o acidificación posterior a la incubación sea lo más lenta posible. En el caso del yogurt, el enfriamiento debe llegar hasta una temperatura menor a 20 °C habiendo estado sin agitación hasta entonces, para no ocasionar problemas tales como formación de grumos, desuerado, sinéresis y baja viscosidad (Mazzeo, 2007).

e) Inoculación

La inoculación se realiza en los tanques de incubación y el cultivo en proporción de 2 a 3% con agitación por 5 minutos (Mazzeo, 2007), el porcentaje de siembra varía según la actividad de los cultivos entre el 1% y el 7%, y en función de la relación estreptococo/lactobacilos, que es de 1,2 a 2,1 para los yogures naturales, pudiendo alcanzar la proporción de 10,1 en los yogures de frutas (Mahaut et al., 2004).

f) Incubación

Para los yogures batidos, la incubación es realizada a temperaturas entre 42 y 45 °C durante un tiempo entre 2 horas 30 minutos y 3 horas 30 minutos. El objetivo de esta fase es alcanzar una acidez de 70 a 80 °D en los yogures firmes incubados en estufa y de 100 a 120 °C en los yogurts batidos (Mahaut et al., 2004), hasta que el pH disminuya a 4,6, punto en que empieza a formarse el coágulo por precipitación de la caseína (punto isoeléctrico) (Mazzeo, 2007).

g) Envasado

Para el envasado de yogurt suelen utilizarse envases rígidos de vidrio, semirrígidos de PVC, polietileno, polipropileno, poliestireno, y flexibles como papel, polietileno, cartón, plástico y papel aluminio (Mazzeo, 2007). La adición de azúcar y de aromatizantes se efectúa inmediatamente después de la siembra en el caso de los yogures firmes, mientras que, en los batidos, las frutas se incorporan justo después del enfriamiento (Mahaut et al., 2004).

• Insumos permitidos en la elaboración del yogurt

a) Conservantes

Los conservantes químicos contribuyen a garantizar la conservación del producto. Los conservantes más específicos para el yogurt son el ácido sórbico y sus sales de potasio y calcio, y el ácido benzoico, empleándose el 0,05%, en el producto final; también el bromato de potasio 0,2 a 0,5 g/L (Sandoval y Giurfa, 2001). El efecto del sorbato de potasio sobre la actividad de los cultivos del yogurt provoca una disminución del desarrollo de la acidez y de la producción de acetaldehídos; las cantidades de sorbato potásico son de 0,05 a 0,01% en peso lo que equivale a 375 y 750 ppm de ácido sórbico (Robinson y Tamime, 1991).

Por otra parte, considerando la tradición de que el yogurt es un alimento natural resulta razonable que se promueva el uso de conservantes orgánicos derivados de vegetales, como propóleo o ϵ -polilisina, para su conservación. En los últimos años se han realizado ensayos, como el de Lafta (2019) quien añadió ϵ -polilisina como conservante del yogurt para beber, encontrando que una baja concentración (0,007%) de ϵ -polilisina fue suficiente para lograr un pH más elevado, menor acidez titulable y, en general, alcanzar características consideradas preferibles por los degustadores, con respecto al control sin conservante.

En un ensayo comparando conservantes químicos y naturales en yogurt firme, Rajapaksha, et al. (2013) consiguieron que agregando 0,005% (p/v) de ϵ -polilisina o 0,1% (p/v) de sorbato de potasio, encontraron resultados equivalentes en cuanto

a lograr un pH más elevado y menor acidez luego de 20 días de conservación en frío, en comparación con una muestra control sin conservantes. Inti Barreto (2019) encontró que el uso de extractos etanólicos de propóleo en concentraciones de 0,4 a 1,6% en yogurt firme, permitió verificar un aumento de la vida útil y mejoras en los atributos color, olor, sabor y aceptabilidad por parte de degustadores.

b) Edulcorante

El edulcorante es una sustancia que actúa sobre el sabor de los alimentos produciendo una sensación dulce. Los edulcorantes pueden ser: edulcorantes naturales, artificiales y nutritivos alternos. Los edulcorantes naturales que poseen un valor nutritivo y energético por lo que no se pueden considerar como aditivos, sino como componentes del propio alimento.

Los azúcares más empleados en la elaboración de alimentos son la sacarosa, glucosa, lactosa, azúcar invertida y el sorbitol (Alcázar, 2002), el porcentaje de adición dependerá del tipo de yogurt. Se adiciona cuando se encuentra a 50 °C con el fin de disolverlo adecuadamente y eliminar en la pasteurización las bacterias presentes en ella (Sandoval y Giurfa, 2001).

c) Agentes fermentadores

Los cultivos o fermentos lácticos son una materia prima destinada a la elaboración de leches fermentadas, quesos, mantequillas y otros productos. Son definidos como un grupo de microorganismos seleccionados y purificados en laboratorios, a los cuales se les ha aplicado un método de conservación para su comercialización. Pueden estar conformados desde un solo género y varias especies hasta mezcla de varios géneros.

Continúa Mazzeo (2007) manifestando que el cultivo utilizado contiene: *Lactobacillus bulgáricus* (homofermentativas) que se desarrolla entre 45 a 50 °C y produce hasta un 3% de ácido láctico; *Streptococcus thermophilus* se desarrolla entre 37 a 40 °C y es termorresistente.

- **Contaminación por microorganismos en yogurt**

Staphilococcus aureus es una de las bacterias que con mayor frecuencia producen brotes alimentarios, dada su amplia distribución en la naturaleza, así como su capacidad de producir diversas enzimas y toxinas Archer & Young (1988). Se incluyen dentro de estas últimas, diversas enterotoxinas termoestables, destacándose la enterotoxina A, la cual es extremadamente potente, una cantidad tan pequeña como 100 ng es suficiente para causar síntomas de intoxicación (Carminati et al., 1989).

La producción de enterotoxinas se da bajo una gran gama de condiciones ambientales y de almacenamiento, especialmente en aquellas donde haya aerobiosis, un aW superior a 0,85, un pH superior a 5,0 y baja competencia microbiana. Por otro lado, estas enterotoxinas son muy resistentes al calor y son capaces de soportar tratamientos de cocción y hasta de esterilización Carvajal (1999).

Diversas investigaciones en las que se ha estudiado y evaluado el comportamiento de *L. monocytogenes* durante la elaboración, maduración y almacenamiento de diversos productos lácteos, han demostrado que el microorganismo es capaz de sobrevivir durante los procesos de manufactura y maduración y/o fermentación y en algunos casos también durante el almacenamiento (Ryser & Marth 1987; Papageorgiou & Marth, 1989; Zúñiga-Estrada et al., 1995).

Por otro lado, varios autores incluyendo a Schaack & Marth (1988) y Carminati et al. (1989) han demostrado que los cultivos lácticos tienen propiedades antagónicas contra *L. monocytogenes*. Dada esta divergencia de criterios, se pretende en este estudio evaluar el efecto de los cultivos probióticos sobre el comportamiento de *L. monocytogenes* durante la elaboración y almacenamiento de yogurt.

2.2. PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAM)

Los péptidos antimicrobianos, frecuentes en plantas, insectos y mamíferos (Lehmann et al., 2002; Ganz & Lehrer, 2002), son una familia de péptidos antimicrobianos catiónicos endógenos, con un amplio espectro de actividad sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas y varios hongos patógenos (Schneider et al., 2005; Schwaab et al., 2009).

Desde la pasada década se han descubierto cientos de péptidos antimicrobianos (PAM) naturales, generados por microorganismos, y con un amplio rango de acción contra otros microorganismos (Piers et al., 1993; Hancock & Chapple, 1999). Se caracterizan por tener de 15 a 34 residuos de aminoácidos en su secuencia y un considerable número de lisinas o argininas que los convierten en péptidos antimicrobianos catiónicos (Piers et al., 1993; Peschel & Sahl, 2006).

En este grupo de los péptidos antimicrobianos catiónicos pueden encontrarse moléculas como defensinas, cecropinas, magaininas, melitinas, e-poli-L-lisina, polimixinas, g-poli-L-glutamato y cianoficina (Hancock & Chapple, 1999; Ganz & Lehrer, 2002; He et al., 2007). Su función es permitirle al organismo productor defenderse activamente del ataque de patógenos, haciendo parte así de su inmunidad innata (Hancock & Chapple, 1999; Corrales-García y Gelmy, 2010).

El uso de antimicrobianos de origen natural es destacado por Zhang et al. (2015) quienes clonaron a *E. coli* y caracterizaron el gen de la endolysina (lysZ5) del genoma del fago FWLLm3 de *L. monocytogenes*. El análisis de la secuencia comparativa reveló que LysZ5 se asemejaba a la mureína hidrolasa Ply511. La adición de esta proteína purificada mostró que LysZ5 podría lisar *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. welshimeri*, pero no *Staphylococcus aureus* o *Enterococcus faecalis*. La proteína purificada fue capaz de eliminar *L. monocytogenes* que crecía en leche de soja, con una reducción de más de 4 log UFC/mL después de 3h de incubación a 4 °C.

El proceso biotecnológico para producir ϵ -polilisina (EPL) fue patentado en 1999 por Hiraki y Suzuki (Patente de Estados Unidos Número 5 900 363). En 2003 fue aprobado como GRAS por la FDA, para uso como conservador en productos de arroz a un nivel de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente, este compuesto se produjo de acuerdo con el proceso patentado, por Purac Biochem Ltd. y en 2010, el compuesto sería GRAS para su uso como conservador en diversos tipos de alimentos. Posteriormente, Purac Biochem Ltd. extendió su uso para incluir numerosos tipos de alimentos con niveles adicionales de hasta 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Yu et al., 2010).

Hiraki (2003) reporta que la ϵ -polilisina resultó prácticamente no tóxica en un estudio oral en ratas. No hubo mortalidad ni mutagénesis hasta en 5g/kg en ensayos bacterianos. Los estudios de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de la ϵ -polilisina en los cuales fueron administrados 100 mg/kg en una sola dosis a ratas macho en ayunas, revelaron una baja absorción en el tracto gastrointestinal. Todas las cantidades de la radioactividad dosificada fueron eliminadas por excreción en un 97% en la orina y en las heces dentro de las 168h posteriores, y 3% en el aire expirado en las siguientes 48h. La radiografía de todo el cuerpo no mostró concentraciones de ϵ -polilisina absorbida en ningún tejido u órgano. Basándose en los resultados de los estudios de ADME y la falta de toxicidad en los estudios de seguridad, propusieron que el uso de ϵ -polilisina como conservador en los alimentos se considera seguro.

Adicionalmente, se ha sugerido que ϵ -polilisina tiene una acción anti-obesidad ya que puede suprimir la absorción de grasas en el intestino delgado, al inhibir la actividad de la lipasa pancreática, incluso después de la incubación con enzimas digestivas como tripsina y pepsina (Hyldgaard et al., 2014).

Hyldgaard et al. (2014) utilizaron *E. coli* (Gram negativa) y *L. innocua* (Gram positiva) para elucidar el mecanismo de acción de EPL. Ellos propusieron que ϵ -polilisina en el caso de *E. coli*, interactúa con la membrana a través de un mecanismo de formación de vesículas o micelas por la interacción con los grupos de fosfolípidos de la membrana bacteriana.

Debido a que ϵ -polilisina interactúa más fácilmente con grupos cargados negativamente, tiene una toxicidad relativamente baja contra células de mamíferos y de levadura, así mismo, las diferencias en la susceptibilidad entre las Gram positivas y Gram negativas podrían deberse a diferencias en la composición de la membrana. Tal es el caso de la membrana de *L. innocua* la cual contiene fosfatidilglicerol derivado de lisina y lisil-cardiolipina. La lisil-cardiolipina es bipolar y por lo tanto, no tiene carga negativa neta, lo que provoca que la bacteria disminuya su afinidad por los péptidos catiónicos.

Ye et al. (2013) hipotetizaron el mecanismo de acción de ϵ -polilisina contra *E. coli* O157:H7 y de acuerdo con sus resultados, la actividad de ϵ -polilisina involucra otras acciones además de la ruptura de la membrana. La presencia de ϵ -polilisina (EPL) aumenta la concentración de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés).

Adicionalmente, Li et al. (2017) propusieron el modo de acción de ϵ -polilisina (EPL) contra *L. monocytogenes*. Inicialmente, las cargas positivas de la solución de EPL neutralizan las cargas negativas de la membrana celular. En segundo lugar, ocurre la pérdida de materiales intracelulares, enzimas y proteínas solubles después del tratamiento con EPL. Ellos encontraron que ϵ -polilisina mostró un efecto destructivo contra las enzimas hexoquinasa, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa del glicólisis. Además, la ϵ -polilisina (posee actividad inhibitoria en el metabolismo respiratorio de *L. monocytogenes* que se ve reflejado en la producción de energía y acumulación de biomasa).

Zahi et al. (2017) investigaron el sinergismo entre ϵ -polilisina y D-limoneno para desarrollar un sistema de nanoemulsión. Los resultados del método de tablero mostraron que la ϵ -polilisina EPL y el D-limoneno presentan fuertes efectos sinérgicos y útiles contra *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae*. Los resultados demostraron una amplia mejora de la actividad antimicrobiana de la nanoemulsión de D-limoneno luego de la inclusión de ϵ -polilisina. Estos resultados contribuyen al desarrollo de un sistema antimicrobiano más eficiente en la industria alimentaria.

Es posible que las bacterias Gram positivas sean más susceptibles a la ϵ -polilisina que las Gram negativas como lo es *L. monocytogenes*. Li et al. (2014) investigaron las características y mecanismos antibacterianos de ϵ -polilisina contra *E. coli* y *S. aureus* (bacterias Gram positivas) obteniendo un valor CMI de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ y Ye et al. (2013) evaluaron la ϵ -polilisina (contra *E. coli* usando 5 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto). Adicionalmente, ellos sugirieron que cuando una carga positiva de ϵ -polilisina entra en contacto con la bacteria, el compuesto es unido a la superficie de la membrana por atracción electrostática.

La acumulación de tal interacción resulta en la alteración de la membrana celular y conduce a cambios que dan como resultado fracturas en la estructura de la membrana. Sin embargo, las bacterias Gram negativas tienen una capa de membrana externa que podría dificultar el acceso de ϵ -polilisina a la membrana celular. Esto concuerda con los resultados reportados por Kozak et al. (2017) quienes evaluaron ϵ -polilisina contra *L. monocytogenes* en caldo de cultivo a pH de 5,5, obteniendo un valor de CMI de 100 $\mu\text{g/mL}$; y de acuerdo con los resultados obtenidos por Geornaras et al. (2007) la adición de ϵ -polilisina al 0,02% y al 0,04% (200 y 400 $\mu\text{g/mL}$) al caldo de cultivo no tuvo efecto bactericida sobre *L. monocytogenes*.

Recientemente, Li et al. (2018) estudiaron el mecanismo de acción de ϵ -polilisina contra *L. monocytogenes* y reportaron que las cargas positivas de ϵ -polilisina pueden neutralizar las cargas negativas de la membrana celular en la superficie de la bacteria, dando como resultado la destrucción de esta. Además, se produce una pérdida de materiales intracelulares, enzimas y proteínas solubles; finalmente, ϵ -polilisina posee actividad de inhibición en el metabolismo de respiración de *L. monocytogenes*, lo cual se refleja directamente en la producción de energía. También Hyldgaard et al. (2014) plantearon que ϵ -polilisina desestabiliza las membranas al interactuar con grupos fosfolípidos cargados negativamente lo cual desplaza los cationes divalentes y obligan a la formación de vesículas o micelas. A pesar de esto, ϵ -polilisina es un compuesto muy similar a nisina. Ambos compuestos se producen por la fermentación de bacterias como *L. lactis* en el caso de NIS, y *S. albulus* para ϵ -polilisina. Además, ambos están formados por aminoácidos.

El mecanismo de acción de nisina ha sido reportado como la unión de este péptido a los lípidos aniónicos insertándose luego entre los grupos fosfolípidos de la membrana. La acumulación de nisina en la monocapa lipídica externa de la membrana impulsa a la agregación de monómeros de nisina, seguida por la formación de poros en la estructura (Breukink y de Kruijff, 2006). Es posible que ϵ -polilisina, al ser un compuesto de la misma naturaleza que nisina, actúe de manera similar evitando la posible sinergia, mientras que el Etil lauroil arginato HCl por su parte, actúa como un surfactante permitiendo la combinación de diferentes mecanismos de acción al mezclarse con ϵ -polilisina y nisina.

Por otro lado, la ϵ -polilisina ha demostrado ser susceptible y degradado por enzimas proteasas y peptidasas de diferentes bacterias comercialmente disponibles. Al respecto, Nampoothiri et al. (2014) sugieren que hay microorganismos tolerantes a ϵ -polilisina y que tienen algún tipo de proteasa que hidroliza el ϵ -polilisina. En la evaluación en queso, no solo se encontraba *L. monocytogenes*, sino también aquellas bacterias que son propias del alimento, bacterias ácido lácticas; este tipo de bacterias poseen enzimas proteasas y peptidasas que posiblemente degradaron a ϵ -polilisina evitando así una mayor actividad contra *Listeria* (Teusink & Molenaar, 2017).

Actualmente, diversos estudios han proporcionado evidencia y resaltado la importancia de la resistencia bacteriana a distintos antimicrobianos (Fister et al., 2016; Labrie et al., 2010). Los mecanismos de resistencia exhibidos por patógenos transmitidos por los alimentos, les permiten adaptarse y evolucionar con las condiciones ambientales cambiantes (Nair et al., 2014).

En base a estos y otros antecedentes, en el grupo de trabajo del Dr Michael Miller, en el departamento de Food Science and Human Nutrition en la Universidad de Illinois, Estados Unidos, se propuso realizar investigación concerniente a la endolisina PlyP100, que como ya se mencionó antes en este apartado, proviene del bacteriófago P100. Este fago fue aprobado en 2005 por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos (FDA) como un compuesto antimicrobiano

generalmente reconocido como seguro (GRAS) e incluso, es actualmente comercializado como LISTEX P100 (Microcos, Ltd.).

Lu et ál. (2005) reportaron la actividad de los extractos etanólicos del propóleo recolectado en diferentes épocas del año en Taipéi, Mingchien y Fanglia (Taiwán), contra el patógeno oral *S. aureus*. El autor planteó que el mecanismo de actividad antimicrobiana es complicado y puede atribuirse a un sinergismo entre los ácidos de sesquiterpenos y flavonoides hidroxidados.

Kujumgiev et al. (1999) estudiaron los extractos de los propóleos provenientes de Bulgaria, Albania, Mongolia, Egipto, Brasil, y España, y evaluaron la actividad antibacteriana, contra las cepas de *S. aureus* 28 y *E. coli*, la antifúngica contra *Candida albicans*, y la actividad antiviral usando como modelo el virus de la influenza aviar. Los resultados revelaron la actividad de la mayoría de los extractos contra las bacterias Gram positivas y el virus estudiado.

En los estudios realizados por Silici y Katluca (2005), se evaluaron muestras de propóleos provenientes de tres razas de *Apis mellifera*, mediante ensayos de actividad antimicrobiana, contra las cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *C. albicans*. Los resultados mostraron que el propóleo de *A. mellifera caucasica* es más activo que los de *A. mellifera anatolica* y *A. mellifera carnica*. Todos los extractos etanólicos mostraron una actividad antibacteriana alta contra cocos gram positivos, principalmente las cepas de *S. aureus*, y actividad baja contra bacterias gram negativas como *E. coli* y *P. aeruginosa* y la levadura *C. albicans*. Se caracterizaron 48 compuestos mediante GC-MS, de los cuales 32 corresponden a estructuras nuevas en el propóleo. Se proponen como fuentes de estos compuestos las especies de sauces como *Populus alba*, *P. tremuloides* y *Salix alba*.

Stepanovic et al. (2003) estudiaron la actividad de 13 extractos etanólicos de propóleos contra 39 microorganismos 29 resistentes a antibióticos correspondientes a cepas de *S. aureus*, *S. sciuri*, *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marscescens*, *Providencia stuartii*, *P. rettgeri*, *Morganella morganii* y *Salmonella enteritidis*. También evaluaron la actividad sinergista entre propóleos y antibióticos contra *S. aureus* resistente a

oxacilina, *K. pneumoniae* y *C. albicans*. Los resultados mostraron actividad considerable de los extractos contra las bacterias grampositivas y levaduras, y actividad reducida contra bacterias gram-negativas. Se observó actividad sinérgica del propóleo con antibióticos comerciales y con compuestos antifúngicos.

Scazzocchio et al. (2006) reportaron la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de propóleo a concentraciones subinhibitorias. Evaluaron 140 cepas de *Staphylococcus spp.* y 123 cepas de *Streptococcus spp.* y confirmaron que los extractos causaban daño estructural a las células bacterianas empleando el método de captura de yoduro de propilo.

Diversos autores han tratado el tema de la actividad antifúngica de propóleo contra hongos fitopatógenos y alteradores de la calidad de los alimentos (Koc et al., 2007; Tripathi & Dubey, 2004; Aly & Elewa, 2007). En particular, Aly & Elewa (2007) encontraron actividad antifúngica contra *Aspergillus versicolor* en la conservación de quesos egipcios. Del mismo modo, Pepeljnjak, et al. (1982) lograron controlar el crecimiento del hongo *A. sulphureus* para examinar la biosíntesis de la ocratoxina Tripathi & Dubey (2004) consideraron que los propóleos son una alternativa para el control de hongos en poscosecha de frutas y vegetales.

Adicionalmente, se han evaluado la actividad antimicótica de propóleo de diferentes regiones de Argentina, encontrando que la actividad contra los hongos fitopatógenos *Fusarium sp*, *Macropomina sp*, *Phomosis sp*, *A. niger* y *Thichoderma spp*, está relacionada con los flavonoides galangina y pinocembrina (Chaillou & Nazareno, 2009).

2.2.1. ϵ -POLILISINA

Actualmente, la ϵ -polilisina es producida y comercializada a nivel biotecnológico (Chisso Corporation, Japón) y usada como aditivo en alimentos por su acción antibacteriana sobre un amplio espectro de microorganismos (bacterias Gram positivas, Gram negativas, levaduras y mohos) (Yoshida y Nagasawa, 2003).

Es inocua para los humanos (FDA, 2004), soluble en agua, estable a altas temperaturas y tiene bajo impacto ambiental por ser biodegradable (Nishikawa y Ogawa, 2002; Shima y Sakai, 1977, 26). Por tales propiedades, es usada como conservante natural de alimentos tales como pescados, vegetales, sopas, arroz cocido, pastas, leche, entre otros (Geornaras et al., 2007). En 2004, la FDA declara, en referencia a ϵ -polilisisina, “no tener cuestionamientos a las investigaciones y resultados del fabricante” y, por tanto, la declara como GRAS (Food and Drugs Administration US, 2004).

Se produce típicamente como un homopolipéptido de aproximadamente 25-30 residuos de L-lisina (Shima y Sakai 1977). La ϵ -polilisisina se adsorbe electrostáticamente a la superficie celular de la bacteria, seguida de una separación de la membrana externa. Esto eventualmente conduce a una distribución anormal del citoplasma que causa daño a la célula bacteriana (Shima, 1984) que se produce por fermentación bacteriana. La ϵ -polilisisina se utiliza como conservante natural en productos alimenticios.

La producción de ϵ -polilisisina por fermentación natural solo se observa en cepas de bacterias del género *Streptomyces*. En particular, *Streptomyces albulus* se usa con mayor frecuencia en estudios científicos y también se usa para la producción comercial de ϵ -polilisisina. La producción de este compuesto por fermentación natural fue descrita por primera vez por los investigadores Shoji Shima y Heiichi Sakai en 1977. La ϵ -polilisisina se usa comercialmente como conservante de alimentos en Japón, Corea y en artículos importados vendidos en los Estados Unidos. Los productos alimenticios que contienen ϵ -polilisisina se encuentran principalmente en Japón. El uso de ϵ -polilisisina es común en aplicaciones alimenticias como arroz hervido, vegetales cocidos, sopas, fideos y pescado en rodajas (sushi) (Hiraki, 2003).

Los estudios de literatura han reportado un efecto antimicrobiano de la ϵ -polilisisina contra levaduras, hongos, bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Hiraki, 1995). ϵ -polilisisina tiene un aspecto amarillo claro y tiene un sabor ligeramente amargo, ya sea en polvo o en forma líquida.

- **Propiedades**

En 1977, Shima y Sakai extrajeron ϵ -polilisina de microorganismos. Este compuesto es un homopolímero que contiene 25–35 residuos de L-lisina (Pandey & Kumar, 2014). Este polímero de lisina se forma a través de la unión de los residuos de lisina por enlaces amida, que están formados por grupos α -carboxilo y grupos ϵ -amino; por lo tanto, se llama ϵ -polilisina (Shima & Sakai, 1977).

Dicho compuesto tiene actividad bacteriostática cuando el peso molecular es superior a 1.300 dalton (Da), y muestra una alta actividad bacteriostática con un peso molecular de 3.600 a 4.300 Da (Shima et al., 1984). La ϵ - polilisina pura es un polvo amarillo claro con un sabor amargo y una fuerte higroscopicidad. Es soluble en agua y ligeramente soluble en etanol, pero es insoluble en acetato de etilo, éter y otros solventes orgánicos (Hiraki, 1995). Es altamente termoestable, sin un punto de fusión fijo, y comienza a ablandarse y descomponerse por encima de 250 °C. Su pH bacteriostático óptimo es de 5-8, y el punto isoeléctrico es de aproximadamente 9.0 (Hiraki, 1995; Singh et al., 2008).

- **Dosis aplicadas**

Existen varios trabajos relacionados con el uso de ϵ - polilisina en alimentos, los cuales han usado varias dosis. En el estudio realizado por Hosomi et al., (2015), se usó una concentración relativamente alta de ϵ -polilisina (20,000 $\mu\text{g} / \text{g}$) en ratas por el método dietético peroral, y los resultados mostraron que no se observaron cambios histopatológicos obvios ni carcinogenicidad, contra *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes* (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Najjar, et al., 2007). En leche entera se adicionó 50 mg/L de ϵ -polilisina contra la proliferación de *E. coli* en la (Gao et al., 2013).

Se utilizaron diferentes concentraciones de ϵ -polilisina (0,2%, 0,4%, 0,6%) para la conservación de los filetes de tilapia, que se almacenaron a 4 °C (Ma et al., 2014). Se roció aproximadamente 1% de ácido láctico, quitosano y solución de quitosano que contenía 250 mg/mL ϵ -polilisina y 64 mg / mL de nisina sobre las zanahorias recién cortadas (Song et al., 2017).

Se usaron recubrimientos comestibles a base de alginato, que contenían diferentes concentraciones de ϵ -polilisina (0,05%, 0,01%, 0,15%) para mejorar la calidad y la vida útil del kiwi recién cortado, y las muestras se almacenaron a $4 \pm 0,5$ °C durante 14 días (Li et al., 2017). En yogurt, Rajapaksha et al. (2013) aplicaron 0,005% de ϵ -polilisina (50mg/kg).

De esta manera, EPL se usa ampliamente para preservar diferentes alimentos gracias a su amplia actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas, Gram negativas, levaduras y hongos; como se muestra en la continuación (Tabla 1) con algunos valores de cantidad máxima de inhibición (CMI) para diferentes especies de bacterias.

Tabla 1. Cantidad máxima de inhibición in vitro de la ϵ -polilisina para diferentes bacterias.

Microorganismo	CMI (ug/mL)	Referencia
<i>Listeria monocytógenes</i>	20-100	(Kozak et al., 2017)
<i>Listeria innocua</i>	750	(Hyldgaard et al., 2014)
<i>E. coli</i>	15,63	(Liu et al., 2015)
	12,5	(Li et al., 2014)
	75	(Hyldgaard et al., 2014)
	600-900	(Miya et al., 2014)
	50	(Yoshida & Nagasawa, 2003)
	2	(Shima et al., 1984)
	<i>Bacillus subtilis</i>	62,5
33		(Yoshida & Nagasawa, 2003)
13		(SHIMA et al., 1984; Yoshida & Nagasawa, 2003)
<i>Staphylococcus aureus</i>	31,25	(Liu et al., 2015)
	12,5	(Li et al., 2014)
	12,5	(Yoshida & Nagasawa, 2003)

2.3. PROPÓLEO

El término propóleo proviene del griego “pro” que significa para o en la defensa, y “polis” que significa la ciudad; dando como resultado la palabra própolis que significa para la defensa de la colmena (Puente Calderón, 2010). El propóleo o

própolis se define como una sustancia natural, con característica resinosa, gomosa y balsámica, de consistencia viscosa, de color verde pardo, sabor amargo, olor agradable y dulce; dicha sustancia es “recolectada por abejas melíferas africanizadas (*Apis mellifera* L) de las yemas, hojas de árboles y plantas mezcladas con polen y enzimas que las abejas secretan” (Popova et al., 2007; Londoño Orozoco et al., 2008).

La función de las abejas es usar el propóleo para sellar las paredes interiores de sus colmenas y formar una barrera protectora contra intrusos externos como los insectos y demás animales, considerados responsables de la baja incidencia de bacterias y hongos en las colmenas. Su color es variable, de amarillo claro a marrón oscuro, pasando por una gran cantidad de tonos castaño (Sánchez et al., 2013).

“La actividad biológica antimicrobiana es debido a la presencia de compuestos de flavonoides y fenol” (Castaldo y Capasso, 2002). “Los propóleos son compuestos de bálsamo y resina vegetal (50% v/v), cera (30% v/v), aceites esenciales de hierbas (10% v/v), incluyendo restos orgánicos” (Bankova, 2005).

- **PROPIEDADES DEL PROPÓLEO**

Es importante destacar que el propóleo es una mezcla de varios componentes, en cantidades distintas, contiene entre 50 a 60% de resinas y bálsamos, 30 a 40% de cera, 5 a 10% de polen, y 8 a 10% de aceites esenciales. Se han aislado 180 compuestos en el propóleo, sus principales componentes flavonoides y ácidos fenólicos o ésteres (50%), contienen cantidades muy variables de ceras (7,5 a 35%) que afectarán a los respectivos componentes restantes, aceites volátiles (10%), polen (5%) e impurezas (4,4 a 19,5%). Además, contiene pequeñas cantidades de terpenos, taninos, restos de la secreción de las glándulas salivales de las abejas y posibles contaminantes (Romaní y Humire, 2009).

Seguidamente se describen las actividades del propóleo:

a) Antimicrobiana se refiere al propóleo como agente activo frente a numerosos microorganismos como: *Bacillus larvae*, *B. subtilis*, Bacilo de Koch,

Staphylococcus aureus, *Streptomyces sobrinys*, *S. mutans*, *S. cricetus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Giardia lamblia*, *Bacteroides nodosus*, *Klebsiella pneumoniae*, e incluso contra algunos resistentes a los antibióticos como, el *Streptococcus piogenes*. El propóleo es más activo frente a los cocos gram-positivos (Lu et al., 2005).

- b) Antifúngica:** El propóleo muestra, en distintos grados, efectos fungicidas frente a numerosas especies como: *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Ascospaera apis* y *Plasmopara vitícola*. La mayor inhibición observada corresponde a una concentración de propóleo del 4%. Sin embargo, independientemente de su efecto intrínseco, parece ser que el propóleo estimula la actividad antifúngica de los macrófagos (Grosso, 2017).
- c) Antiviral:** El propóleo ejerce efectos inhibidores frente a los virus de la viruela vacuna, la influenza, la enfermedad de Newcastle, el herpesvirus, la fiebre del valle de Rift, la gripe aviaria, la infección vírica bursal, el reovirus y el virus de la gripe Hong Kong. En un estudio clínico se ha comprobado que una pomada de propóleo canadiense, rica en flavonoides, es más efectiva que el Aciclovir en el tratamiento del herpes genital (Grosso, 2017).
- d) Antiprotozoaria:** Se ha aislado cuatro componentes del propóleo brasileño con una moderada actividad frente al *Trypanosoma cruzi*. El máximo efecto se obtiene contra los tripomastigotas, que desaparecen de la sangre en 24 horas. También inhibe la infección protozoaria de los macrófagos peritoneales y de las células miocárdicas. Frente a la *Acanthamoeba castellanii*, el extracto etanólico del propolis es amebicida en concentraciones del orden de los 8 mg/mL (Grosso, 2017).

- **Conservante natural**

Los diversos estudios han demostrado que el propóleo posee “propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antifúngicas, mismas que dependen del origen botánico, composición química, estación climática, método de extracción, edad y zona geográfica de recolección. El propóleo por ser un producto natural recibe la

denominación GRAS (generalmente reconocido como seguro)” (Sánchez et al., 2013).

Los efectos de los extractos de propóleo sobre bacterias y hongos, así como los patógenos de interés sobre los alimentos, tienen la capacidad para ralentizar o prevenir reacciones de oxidación, lo cual los convierte en productos naturales potencialmente atractivos para ser usados como conservantes alimentarios sustituyendo los aditivos sintéticos.

Una investigación sobre los extractos etanólicos de propóleo (EEP) a películas comestibles, para su aplicación en alimentos a base de hidroxipropil metil celulosa (HPMC); y los extractos etanólicos de propóleo (EEP) en uvas de variedad Moscatel, considerando que los recubrimientos mejoraron la apariencia de la uva y pueden ser buenos revestimientos para obtener productos más saludables, “reduciendo la pérdida de peso y controlando la producción de CO₂; estas películas revelaron una notable actividad antifúngica contra los hongos probados, mostrando un mayor efecto inhibitorio sobre *Aspergillus niger*”.

La actividad antibacteriana de los propóleos varía dependiendo de la composición química, dosis y solvente de extracción o preparación (especialmente extractos etanólicos). Vargas-Sánchez et al. (2011) evaluaron las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de propóleos de diferentes fuentes: propóleo comercial y extracto no comercial obtenido de la región de Pueblo de Álamos, Sonora, México (PAP). En este estudio se evaluó in vitro la concentración mínima inhibitoria de los extractos (300, 60, 30 y 15 µg·mL⁻¹) frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.*, y *E. coli* O157:H7.

Además, se trataron hamburguesas de carne bovina con extractos de propóleo (2%), las cuales fueron almacenadas a 2 °C, sin iluminación durante dos semanas. Los extractos de propóleos presentaron alta actividad frente bacterias gram - positivas (*S. aureus* y *L. monocytogenes*) y disminuyeron la población (UFC/g) de microorganismos mesófilos y psicrótrofos aerobios. Estos resultados muestran que el propóleo es una alternativa prometedora a los antibacterianos existentes y puede ser también empleado para extender la vida de anaquel de la carne fresca.

Pineda et al. (2010) evaluaron el efecto antifúngico del propóleo en etanol (0, 15, 20 y 30%) sobre aislados de *Colletotrichum gloeosporioides* provenientes de aguacate (*Persea americana*), papaya (*Carica papaya*) y maracuyá (*Passiflora edulis*). En otro estudio realizado por Macías y Yunda (2015), se utilizó como conservante el extracto etanólico de propóleo al 1% de concentración aplicado en carne de res molida, además se utilizaron cepas de control microbiológico *E. coli* ATCC 25922.

2.4. LECHE

La leche es el fluido biológico que secretan las hembras de los mamíferos y cuyo papel es aportar los nutrientes requeridos por el recién nacido de la especie correspondiente, durante los primeros meses de vida. En general, con la denominación de leche, en Ecuador, se entiende única y exclusivamente la leche de vaca, *Bos primigenius taurus* (Baró et al., 2010). La leche de otras especies se designa indicando el nombre de la especie respectiva. Existe una gran cantidad de productos lácteos, incluyendo leches con contenido variable en grasa, leches fermentadas, yogures y quesos, entre los más consumidos (Moreno et al., 2013).

- **Características nutricionales de la leche**

El contenido proteico de los lácteos varía dependiendo del tipo de lácteo que se considere. La leche contiene entre 3-4% de proteínas, y esta fracción proteica se distribuye entre caseínas (78% del nitrógeno de la leche) y proteínas del lactosuero o cero proteínas (17% del nitrógeno de la leche), presentando un 5% de nitrógeno no proteico (5%) (Jenkins & McGuire, 2006).

Según Del Valle et al. (2011) las proteínas de los lácteos son de un elevado valor biológico. La caseína favorece la absorción del calcio, ya que forma con este mineral caseína-fosfopéptidos, que son complejos solubles y fácilmente absorbibles.

En cuanto a los hidratos de carbono, el principal de la leche es la lactosa, y proporciona más de la cuarta parte de la energía de la leche si se trata de leche entera, llegando a superar el 50% cuando se trata de desnatada. La lactosa es un disacárido exclusivo de la leche, compuesto de glucosa y galactosa, con un débil sabor dulce, sensible al calor y que es fermentable por algunas bacterias, aspecto aprovechado para la fabricación de quesos y yogures (Baró et al., 2010).

Los productos fermentados frescos, como el yogurt, pueden tener un contenido final de lactosa similar o inferior al de la leche de partida, ya que, aunque se añaden sólidos lácteos con lactosa en su elaboración, una parte de la misma es transformada en ácido láctico (Mataix et al., 2009). A pesar de esto, las leches fermentadas son mejor toleradas que la leche, ya que las enzimas bacterianas contribuyen a la hidrólisis de la lactosa en el intestino (Moreno et al., 2013). Además, hoy en día hay disponibles en el mercado leches de consumo con reducido contenido en lactosa (Baró et al., 2010).

Cuantitativamente, la grasa de la leche es el componente más fácilmente modificable (Jenkis & McGuire, 2006). La grasa de la leche entera proporciona la mitad de las calorías de este producto, aunque hay que considerar que el contenido graso varía mucho dependiendo del tipo de leche (entera, semidesnatada o desnatada).

La composición de la leche de vaca depende de una serie de factores tales como la dieta, la genética, el estado de lactación, la edad y el estado fisiológico del animal, entre otros (Jensen, 2002). Las leches fermentadas se comercializan en general con un contenido graso ligeramente menor que el de la leche entera (Mataix et al., 2009).

Los lípidos en la leche se encuentran en forma de micro glóbulos emulsionados en la fase acuosa (Jensen, 2002), lo que favorece su hidrólisis por las enzimas digestivas (Ortega et al., 2004). Fundamentalmente, los lípidos de la leche están constituidos por triglicéridos (97-98% del contenido graso total), además de mono y diglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos libres, y colesterol libre y esterificado (German & Dillard, 2006).

Los lácteos son una excelente fuente de minerales, especialmente calcio, pero también fósforo, magnesio, cinc, sodio y potasio (Baró et al., 2010). De todos los minerales, el que aporta en menor cantidad es el hierro, lo que hace que no sea una buena fuente de este mineral (Mataix et al., 2009). Los minerales contribuyen no solo al valor nutricional de los lácteos, sino también a su estabilidad. Por ejemplo, calcio, fósforo y magnesio, se encuentran asociados en parte a las micelas de caseína, y otra parte en disolución, y la proporción entre ellos condiciona la estabilidad de la leche (Baró et al., 2010).

- **Productos lácteos**

Los productos lácteos son alimentos complejos desde el punto de vista de su composición, ya que aportan una gran variedad de nutrientes. Sus efectos sobre la salud son el resultado de la interacción de todos ellos, y van más allá de la simple suma de efectos individuales.

Para Moreno et al. (2013), los productos lácteos, aunque todos se elaboran a partir de leche, tienen una composición nutricional muy diferente, que depende del tipo y composición de la leche empleada y del proceso de elaboración a que haya sido sometida para obtener el producto final. Hay una gran variedad de alimentos dentro de este grupo: leches, yogures y otras leches fermentadas, con diferentes contenidos grasos, productos deshidratados y quesos con diferente grado de maduración. La nata y la mantequilla, aunque son productos obtenidos a partir de la leche, por su elevado contenido graso deben consumirse de forma más ocasional.

2.4.1. LECHE FERMENTADAS

La leche fermentada es un producto lácteo obtenido por medio de la fermentación de la leche por la adición de bacterias que la acidifican y que son responsables de las transformaciones metabólicas en los carbohidratos, las proteínas y los lípidos, que conducen al desarrollo de su sabor y textura característicos. La transformación más importante es la fermentación láctica que utiliza la lactosa de la leche como

sustrato. Principalmente la glucosa procedente de la hidrólisis de la lactosa da lugar a ácido láctico y a pequeñas cantidades de una serie de compuestos que contribuyen al aroma (Moreno et al., 2013).

En las leches fermentadas se incorporan sólidos lácteos por lo que el contenido en proteínas suele ser mayor que en la leche, y además son de alta digestibilidad, debido por una parte a que en el proceso de elaboración del producto las bacterias actúan sobre las proteínas liberando péptidos y aminoácidos, y por otro a la coagulación de la caseína en finas partículas por el descenso del pH, lo que facilita la acción de las enzimas intestinales (Baró et al., 2010; Mataix y Rivas, 2009).

Como consecuencia del descenso del pH, se dificulta el desarrollo de microorganismos indeseables, el calcio y fósforo coloidales de la leche pasan a la forma soluble y las proteínas mayoritarias, las caseínas, libres de calcio, precipitan en forma de un coágulo fino, lo que facilita la acción de las enzimas proteolíticas humanas y en consecuencia se favorece la digestibilidad (Moreno et al., 2013).

- **Productos lácteos fermentados**

Uno de los tipos más conocidos de leches fermentadas es el yogurt. Sólo dos tipos de bacterias son las encargadas de la fermentación para obtener yogurt *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricum* (Codex Alimentarius, 2003). Gracias a estas bacterias, que se encuentran activas en el producto final, la lactosa de la leche se transforma en ácido láctico.

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1. UBICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El desarrollo de esta investigación se la efectuó en el Laboratorio de procesos Agroindustriales de la Universidad Técnica de Manabí, Extensión Chone Km 2 ½ Vía Chone Boyacá (17 M 597469.14 m E 9923947.68 m S) y en el Laboratorio de Investigación de Ciencias de Alimentos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, ubicada en la Avenida Circunvalación, Vía San Mateo en la ciudad de Manta – Manabí – Ecuador (17 M 528298.46 m E 9894841.59 m S); añadiendo a esto la evaluación sensorial, la cual fue realizada en el edificio de posgrado de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí MFL (17 M 591015.08 m E 9908655.91 m S).

3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Esta investigación fue de tipo experimental; la misma que se realizó bajo condiciones controladas con el propósito de obtener resultados confiables.

3.3. FACTOR EN ESTUDIO

El factor que se manejó para el desarrollo y estudio del yogurt fue:

Factor A: Mezcla de conservantes ϵ -polilisina y propóleo.

3.4. TRATAMIENTOS

De acuerdo a las concentraciones de ϵ -polilisina – propóleo como mezcla, se obtuvieron como resultado 5 tratamientos, los cuales se especifican a continuación (Tabla 2):

Tabla 2.. Características de los tratamientos.

Tratamientos	Código	Descripción
Tratamiento 1	T1	5 mg ϵ -polilisina – 1 mL propóleo
Tratamiento 2	T2	10 mg ϵ -polilisina – 0,9 mL propóleo
Tratamiento 3	T3	15 mg ϵ -polilisina – 0,8 mL propóleo
Tratamiento 4	T4	20 mg ϵ -polilisina – 0,7 mL propóleo
Tratamiento 5	T5	25 mg ϵ -polilisina – 0,6 mL propóleo

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

En correlación con el principio único o múltiple de los diseños, esta investigación es de tipo experimental, se utilizó un DCA (Diseño completo al azar) de un factor con tres réplicas por tratamiento, considerando en la metodología el estudio para las variables dependientes en 3 tiempos establecidos como: 0, 15 y 30 días.

3.6. UNIDAD EXPERIMENTAL

La unidad experimental fue 1 L de yogurt por cada tratamiento incluyendo las réplicas y triplicando por los tres tiempos de estudio dando un total de 45L se colocaron en envases plásticos, y se almacenaron a 4 °C, que se utilizaron para los diferentes análisis fisicoquímicos y microbiológicos.

El producto final (yogurt) estuvo compuesto por el 90% de leche semidescremada, y 10% de azúcar: El porcentaje de fermento láctico YOFLEX YF-L812 CHR HANSEN liofilizado se agregó en relación a la mezcla anterior y de acuerdo a la dosis recomendada por el fabricante (aproximadamente (0,01% – 0,02%) (Tabla 3).

El extracto etanólico de propóleo se obtuvo del producto comercial propóleo de la empresa naturista Nature's Garden, S.A., que se expende con una concentración de 20% p/v. Se utilizó ϵ -polilisina comercial de la empresa Zhengzhou Binafo Bioengineering Co., Ltd localizada en Zhengzhou City, Henan Province, China (<http://en.bnfs.com/>), la cual tuvo las siguientes características: pureza \geq 95%, Extracción de cepa bacteriana *Streptomyces albus*. Polvo amarillo claro, con fórmula química $[C_6H_{12}N_2O \cdot HCl]_n \cdot H_2O$, CAS NO. 28211-04-3, soluble en agua.

Las concentraciones de los conservantes fueron establecidas en unidad de masa para la ϵ -polilisina en miligramos y la unidad de volumen para el propóleo fue en mililitros consideradas en combinación por litro de yogurt.

Tabla 3. Componentes y pesos utilizados para la preparación del Yogurt, así como cantidad de conservantes agregados en cada tratamiento.

	%	Unidad	T1	T2	T3	T4	T5
Leche semidescremada	90,0	g	900	900	900	900	900
Azúcar	9,08	g	90,8	90,8	90,8	90,8	90,8
Yoflex - YF-L812	0,02	g	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
TOTAL	100	g	1000	1000	1000	1000	1000
ϵ -Polilisina		mg	5	10	15	20	25
Propoleo		mL	1	0,9	0,8	0,7	0,6

3.7. ELABORACIÓN DEL YOGURT

El proceso de elaboración del yogurt se llevó a cabo siguiendo la secuencia descrita en el diagrama de proceso (Figura 1).

3.7.1. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

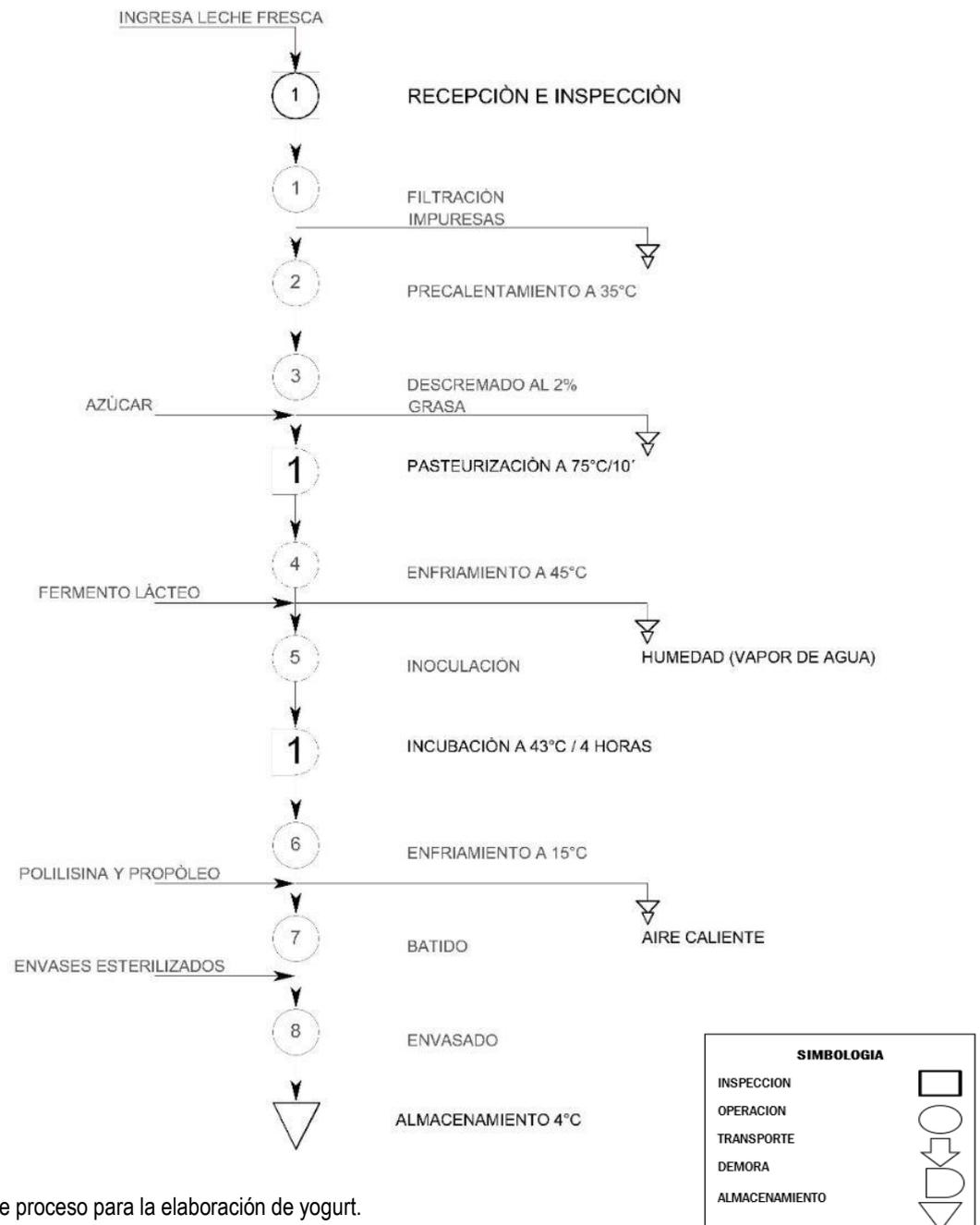


Figura 1. Diagrama de proceso para la elaboración de yogurt.

Recepción

La recepción de la leche es el proceso mediante el cual la planta procesadora realiza los análisis de plataforma con el fin de aceptarla o rechazarla, verifica las

cantidades recibidas y obtiene muestras para efectuar los análisis de laboratorio que permiten determinar la calidad de la materia prima. La leche fue recibida en baldes de acero inoxidable con un volumen de 45 L.

Pre calentamiento

Se realizó un pre calentamiento a 35 °C en una marmita de doble chaqueta con capacidad de 80 L, marca Proingal. La temperatura de la leche se midió con un termómetro digital de precisión 0,1 °C.

Descremado

Se realizó el descremado de la leche con una descremadora SICH 100 con el fin de obtener una materia prima con aproximadamente el 2% de grasa (Anexo 2).

Pasteurización

La leche fue calentada en la marmita de doble chaqueta, hasta alcanzar la temperatura de 75 °C y se mantuvo a esta temperatura por 10 min. Concluida este proceso, se enfrió inmediatamente la leche en la misma marmita hasta que alcanzó 45 °C.

Inoculación

Luego de la pasteurización, a la leche mantenida en la marmita, se le adicionó 0,15 g/L (6,75 g) del fermento YOFLEX YF-L812 CHR HANSEN que contiene las bacterias que la transforman la leche en yogurt.

Incubación

Adicionado el fermento, la leche se mantuvo a 43 °C hasta que alcanzó un pH igual o menor a 4,6, medidos con un pH-metro HANNA-2221; por lo general se logra a las 4 h.

Enfriamiento

Alcanzado el pH indicado, el yogurt se colocó en recipientes de acero inoxidable de 80 L de capacidad y se trasladaron a la sección de 4 °C en un refrigerador de marca INDURAMA, hasta que alcanzó 15 °C, con la finalidad de paralizar la fermentación láctica y evitar que el yogurt continuara acidificándose. Seguidamente, se llenaron los recipientes de los tratamientos con el yogurt y se les adicionó los conservantes en las proporciones descritas en la sección 3.4.

Batido

Se realizó manualmente con un batidor metálico inoxidable con la finalidad de romper y uniformizar la textura del producto y asegurar una mezcla uniforme de los conservantes.

Almacenamiento

El producto, fue almacenado en un refrigerador de marca INDURAMA a temperatura de 4 °C, donde permaneció durante los 30 días del ensayo.

3.8. VARIABLES A MEDIR Y MÉTODO DE EVALUACIÓN

Para las variables fisicoquímicas (pH, acidez), microbiológicas (Recuento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y mohos y levaduras) y evaluación sensorial (olor, color; sabor, Textura y calificación global), se midieron después de elaborados los tratamientos en los días 0, 15 y 30 días de almacenamiento.

3.8.1. ACIDEZ TITULABLE

El análisis de acidez se realizó según el método 16.267 AOAC 2000. En el método se usó como indicador fenolftaleína y NaOH 0,1 N para la titulación, expresada cómo % de ácido láctico.

3.8.2. pH

El análisis de pH se realizó por valoración potenciométrica según la metodología AOAC 973.41 (AOAC, 2005).

3.8.3. CONTEO DE *ESCHERICHIA COLI*

Para la detección y recuento de *E. coli* presuntiva por la técnica del número más probable, se utilizó la metodología basada en Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-8: 2016.

3.8.4. CONTEO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Para determinar la presencia/ausencia de *S. aureus* se utilizó la metodología basada en Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-14:2013.

3.8.5. RECUENTO DE MOHOS Y LEVADURAS

La cuantificación de hongos y levaduras se realizó con la metodología según la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1 529-10.2013 por medio de recuento en placa profunda en agar Sabouraud. Para esto, se ejecutaron los conteos en los días 0, 15 y 30 días, posteriormente se realizó una regresión lineal para determinar el tiempo de vida útil del producto.

3.8.6. EVALUACIÓN SENSORIAL

Para evaluar si la concentración de ϵ -polilisina y el propóleo con la leche semidescremada tiene efectos en el yogurt en los atributos de color, olor, sabor, textura y calificación global de yogurt, se seleccionó un grupo de 75 panelistas no entrenados, empleándose una prueba hedónica (ver en anexo 4).

La escala de intervalo empleada para la evaluación sensorial de las muestras de yogurt fue de 1 a 9 como se muestra a continuación: 1: me disgusta muchísimo; 2:

me disgusta mucho; 3: me disgusta bastante; 4: me disgusta ligeramente; 5: ni me gusta ni me disgusta, 6 me gusta ligeramente, 7 me gusta bastante, 8 me gusta mucho, 9 me gusta muchísimo. Para ello, las muestras de yogurt se presentaron en vasos desechables transparentes en volúmenes de 50 ml, a una temperatura de 4 ± 2 °C y codificadas al azar de acuerdo a la metodología propuesta por (Huertas, 2013).

3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados de los tratamientos en cuanto a las características de calidad del yogurt (pH, acidez, bacterias, mohos y levaduras) se evaluaron mediante una prueba de ANOVA (Tabla 4). Se identificó que los datos cumplieran con el supuesto de normalidad mediante pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, así como con el supuesto de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene.

Tabla 4. Esquema de ANOVA.

FUENTE DE VARIACIÓN	GI
Total	14
Tratamientos	4
Error	10

Cuando alguno de estos supuestos no se cumplió, se trató de corregir las desviaciones transformando los datos a logaritmo decimal (pH, acidez) o raíz cuadrada (recuento de microorganismos). Si aun este procedimiento no corregía las desviaciones, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y su respectiva prueba *a posteriori*. Se empleó el análisis de regresión lineal simple para el estudio del modelo cinético en las variables pH y acidez, así como para evaluar los cambios en el recuento de mohos y levaduras con el tiempo de almacenamiento (vida útil del yogurt), aplicando el modelo matemático de Labuza (1982). La evaluación de los resultados de las pruebas sensoriales por parte de catadores no entrenados a los que se les presentaron muestras de yogurt de los mejores tratamientos, se realizó mediante el empleo del coeficiente de concordancia de Kendall.

3.9.1. TRATAMIENTO DE DATOS

Los datos fueron procesados utilizando los paquetes estadísticos SPSS versión libre (IBM, 2020), Infostat versión libre (Infostat, 2020) y Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2019).

3.9.2. ESTUDIO DE VIDA ÚTIL

El estudio se realizó para la variable microbiológica mohos y levaduras como indicador para determinar el tiempo de vida útil del yogurt mediante un análisis de regresión lineal simple y la aplicación del modelo matemático desarrollado por Labuza (1982), cuya fórmula es explicada a continuación:

$$\ln(A) = \ln(A_0) - k * t \quad (3.1)$$

Siendo:

A: calidad al tiempo t.

A₀: calidad al tiempo cero.

k: constante de velocidad de reacción

t: tiempo de almacenamiento.

Y despejando el tiempo, se obtiene la vida útil que el yogurt tendrá para mantenerse en unas condiciones de calidad iguales o mejores que A, siendo este último valor el estándar de calidad mínimo aceptable para que el yogurt sea consumido.

$$t = \frac{\ln(A) - \ln(A_0)}{k} \quad (3.2)$$

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se verificó si los datos de las variables respuesta cumplían con los supuestos del ANOVA (distribución normal de los datos y homogeneidad de las varianzas entre los tratamientos). Se encontró que las variables acidez y pH no cumplían el supuesto de normalidad (Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, $p < 0,05$) (Tabla 6), mientras que las varianzas del pH en los tratamientos fueron heterogéneas, pero no así las varianzas de la acidez (Tabla 7). La transformación de los datos de pH y acidez a logaritmo decimal no corrigió las deficiencias en normalidad ni en heterogeneidad de las varianzas. En consecuencia, se aplicaron pruebas de anova no paramétrico de Kruskal-Wallis para la comparación de pH y acidez entre los tratamientos.

Tabla 6. Verificación del supuesto de normalidad en los datos de pH y acidez titulable de muestras de yogurt a tratamientos con mezcla de preservantes, propóleo y ϵ -polilisina (factor a) mediante la prueba de Shapiro-Wilk a un 95% de confianza.

	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	p	Estadístico	Gl	P
pH	0,241	45	<0,0001	0,829	45	<0,0001
Acidez	0,152	45	0,010	0,930	45	0,009

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Tabla 7. Verificación del supuesto de homogeneidad de varianzas en los datos de pH y acidez titulable de muestras de yogurt sometidas a tratamientos con mezcla de preservantes propóleo y ϵ -polilisina (factor a), mediante la prueba de Levene, con un 95% de confianza.

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	P
pH	6,157	4	40	0,001
Acidez	1,564	4	40	0,203

4.1. EFECTOS DE LOS CONSERVANTES SOBRE EL pH Y LA ACIDEZ.

El resultado de la prueba de Kruskal-Wallis indicó que la variable pH presentó diferencia significativa entre los tratamientos (Tabla 8), existiendo similitud entre los

tratamientos T1- T2- T3, cuyos pH resultaron ser significativamente menores a los de los tratamientos T4- T5, los cuales no difirieron entre sí (Figura 2).

Los niveles de pH de los tratamientos T1, T2 y T3 se ajustaron mejor a las normas internacionales (NTP: 202.192. 2014 (INDECOPI-PERÚ, 2014) y BOE-A-2014-4515 (España-Ministerio de la Presidencia, 2014), las cuales exigen un pH menor o igual a 4,6. Algunas réplicas de los tratamientos T4 y T5 superaron el nivel de pH 4,6. La norma ecuatoriana NTE-INEN-2395: 2011 sobre Leches fermentadas, no contempla niveles de pH.

Tabla 8. Resultados del análisis de varianza no paramétrica de Kruskal Wallis para tratamientos.

Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
La distribución de pH es la misma entre categorías de Tratamientos	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	0,042	Rechazar la hipótesis nula
La distribución de Acidez es la misma entre categorías de Tratamientos	Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes	0,479	Retener la hipótesis nula

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es 0,05

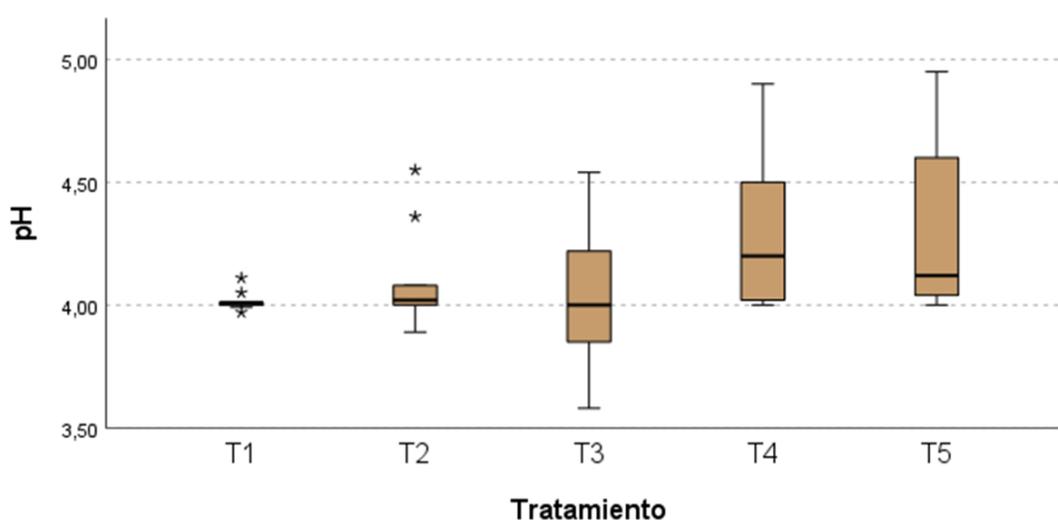


Figura 2. Efecto de los tratamientos con diferentes concentraciones de conservantes (ϵ -polilisina + propóleo) sobre el pH de muestras de yogurt mantenidas a 4°C durante 30 días,

El resultado de la prueba de Kruskal-Wallis indicó que la variable acidez no presentó diferencia significativa entre los tratamientos (Tabla 8), (Figura 3).

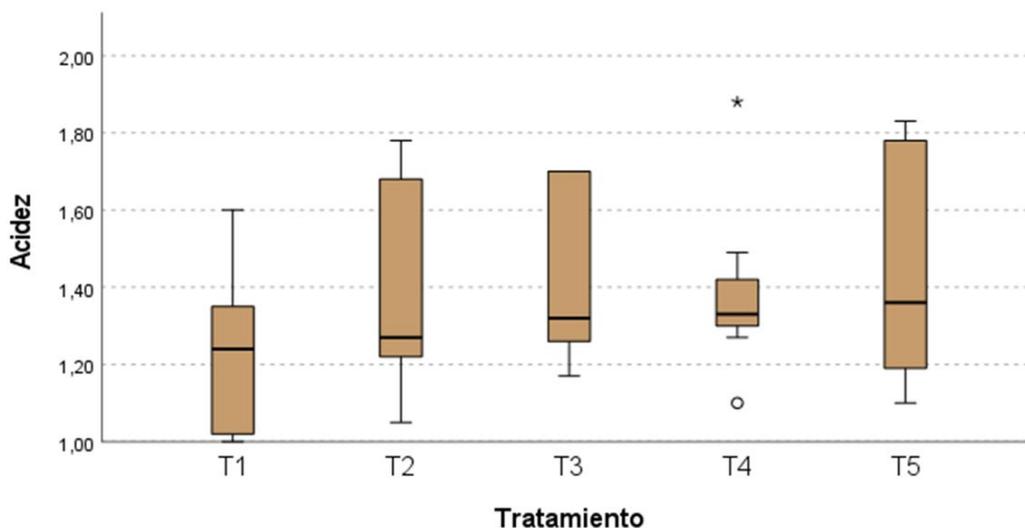


Figura 3. Efecto de los tratamientos con diferentes concentraciones de conservantes (ϵ -polilisina + propóleo) sobre la acidez de muestras de yogur mantenidas a 4°C durante 30 días.

En el presente estudio se encontró que el pH no se estabilizó con los tratamientos con conservantes. Los tratamientos con mayores niveles de propóleo, T1 y T2, mostraron valores menores de pH, lo que sugiere que el propóleo causó un descenso pronunciado en el pH al día inicial de su mezcla con el yogur, y pudiera ser debida a interacciones químicas de algunos de sus numerosos componentes. Sin embargo, es difícil atribuirle este carácter a alguno de los componentes ya que se ha detectado una alta variabilidad en la composición de los propóleos, sin que exista un componente en particular que se mantenga como predominante entre ellos (Guaraca y Palomino, 2018; Inti Barreto, 2019).

En contraste, los tratamientos T4 y T5, con mayores niveles de polilisina, manifestaron un efecto bacteriostático más intenso, lo cual permitiría que el pH disminuyera menos con respecto al pH inicial del yogur recién preparado. Este hecho apoya lo encontrado por Lafta (2019), quien añadió ϵ -polilisina como conservante del yogur para beber, encontrando que una baja concentración (0,007%) del ϵ -polilisina fue suficiente para lograr un pH más elevado y menor acidez titulable.

4.2. EFECTO DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO SOBRE EL pH Y LA ACIDEZ.

En la tabla 9. se detalla el resumen de los resultados para el modelo cinético de la variable pH. Se evidenció que en los tratamientos T4 y T5 el pH se ajustó mejor al modelo lineal (r^2 : 0,9305 y 0,9842, respectivamente) (Figura 4). Sin embargo, los valores del intercepto para los tratamientos T1 (pH= 4,005), T2 (pH= 4,2478) y T3 (pH= 4,3978) se encuentran entre los niveles establecidos de normas internacionales (NTP: 202.192. 2014 (INDECOPI-PERÚ, 2014) y BOE-A-2014-4515 (España-Ministerio de la Presidencia, 2014), las cuales exigen un pH menor o igual a 4,6, en contraste con los tratamientos T4 y T5 que superan ese valor.

En referencia a lo anteriormente expresado, el pH y la acidez cambian durante el tiempo de almacenamiento por la presencia de las bacterias ácido lácticas. Se corrobora que los conservantes tienen efectos antimicóticos y bacteriostáticos. Inti Barreto (2019), trabajando con extracto etanólico de propóleo como único conservante de yogurt, en concentraciones de 0,4 a 1,6%, encuentra una disminución progresiva del pH durante 42 días de almacenamiento a temperatura de 4 – 5 °C. Este autor destaca que el descenso de pH prosiguió hasta que se alcanza un intervalo de pH de 3,75 a 3,8 cuando se observa una estabilización de este parámetro. La disminución de pH fue más pronunciada en los tratamientos con menor concentración de propóleo, a lo que atribuye el autor que este conservante actúa como bacteriostático de la actividad de los microorganismos que convierten la lactosa en ácido láctico.

En contraste, en el presente estudio se encontró que el pH alcanzó mayores valores en los tratamientos con menor concentración de propóleo pero mayor de ϵ -polilisina (a4-a5). Por su parte, el propóleo causó un descenso pronunciado en el pH al día inicial de su mezcla con el yogurt, lo cual sugiere una interacción química de alguno de sus numerosos componentes. Sin embargo, es difícil atribuirle este carácter a alguno de los componentes ya que se ha detectado una alta variabilidad en la composición de los propóleos, sin que exista un componente en particular que se

mantenga como predominante entre ellos (Guaraca y Palomino, 2018; Inti Barreto, 2019).

Tanto el presente estudio como otros consultados trabajando sobre el empleo de conservantes naturales en yogurt (Rajapashka et al., 2013; Cedeño Carpio, 2018; Lafta, 2019; Inti Barreto, 2019), evidencian que los conservantes no impiden la reducción del pH durante el tiempo de almacenamiento, pero si logran mantener niveles más elevados de pH en comparación con el control sin conservante, lo cual prolonga la vida útil del yogurt.

Tabla 9. Valores para el modelo cinético de la variable pH.

TRATAMIENTOS	CONSTANTE	INTERCEPTO	r ²
T1	0,0008	4,005	0,25
T2	-0,01	4,2478	0,6595
T3	-0,0182	4,3078	0,8135
T4	-0,0249	4,6978	0,9305
T5	-0,0202	4,6311	0,9842

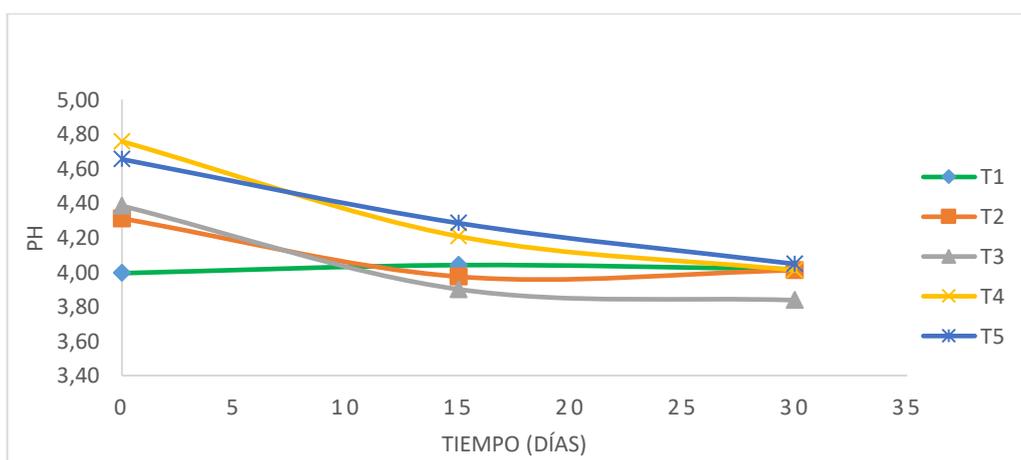


Figura 4. Representación cinética del efecto de los tratamientos con diferentes concentraciones de conservantes (ϵ -polilisina + propóleo) sobre el pH de muestras de yogurt mantenidas a 4°C evaluadas en 0, 15 y 30 días de almacenamiento.

En la tabla 10. se detalla el resumen de los resultados para el modelo cinético de la variable acidez, donde los tratamientos T1, T2 y T3 se ajustaron mejor a un modelo lineal (r^2 :0,82; 0,39; 0,69) (Figura 4), donde los valores del intercepto para los tratamientos T1 (% acidez= 1,008), T2 (% acidez= 1,19) y T3 (% acidez= 1,21)

muestran el comportamiento de la acidez durante los 30 días de almacenamiento y corrobora con la prueba de Kruskal Wallis la similitud que existe entre tratamientos (Figura 5).

Tabla 10. Valores para el modelo cinético de la variable Acidez.

TRATAMIENTOS	CONSTANTE	INTERCEPTO	r ²
T1	0,015	1,008	0,818
T2	0,014	1,190	0,385
T3	0,015	1,210	0,689
T4	0,0003	1,384	0,002
T5	0,014	1,218	0,337

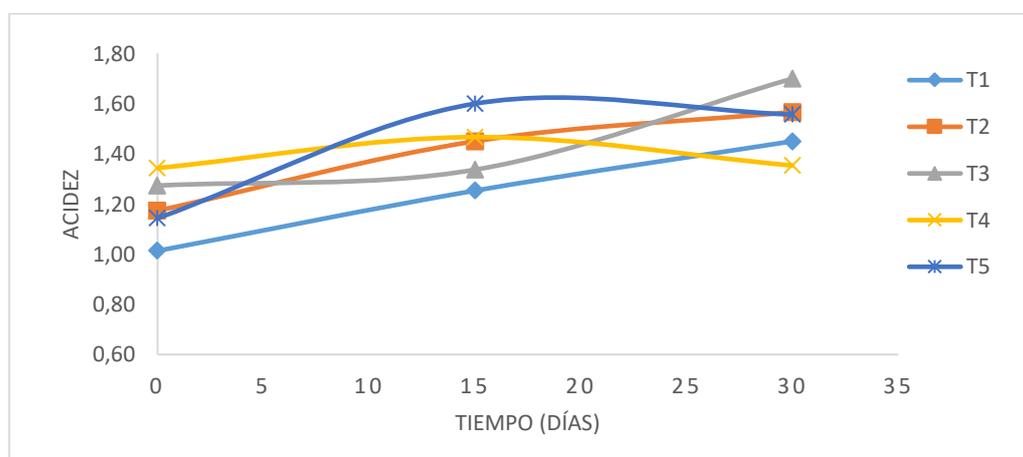


Figura 5. Representación cinética del efecto de los tratamientos con diferentes concentraciones de conservantes (ϵ -polilisina + propóleo) sobre la acidez de muestras de yogurt mantenidas a 4°C evaluadas en 0, 15 y 30 días de almacenamiento.

4.3. CONTEO DE ESCHERICHIA COLI

En las muestras evaluadas en el estudio no se detectó la presencia de *E. coli* (Tabla 11). Esto ha podido estar asociado a que los conservantes empleados inhibieron el crecimiento de dicha bacteria, aunque su ausencia en las muestras al inicio del estudio (día 0) revela que el inóculo no estuvo presente en la materia prima con la cual se elaboró el yogurt.

Tabla 11. Recuento de *E. coli* en muestras de yogurt con combinación de preservantes ϵ -polilisina y propóleo, durante su almacenamiento a 4°C.

Tratamiento	DÍA 0			DÍA 15			DÍA 30		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T1	Ausencia								
T2	Ausencia								
T3	Ausencia								
T4	Ausencia								
T5	Ausencia								

4.4. CONTEO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

No se observó presencia de *S. aureus*, en las muestras de yogurt evaluadas en este estudio (Tabla 12). Esto ha podido deberse a que los conservantes empleados inhibieron el crecimiento de *S. aureus*. Sin embargo, la ausencia de este microorganismo en las muestras iniciales (día 0) sugeriría que el inóculo no estuvo presente en la materia prima con la que se elaboró el yogurt.

Tabla 12. Recuento de *S. aureus* en muestras de yogurt con combinación de preservantes ϵ -polilisina y propóleo, durante su almacenamiento a 4°C.

Tratamiento	DÍA 0			DÍA 15			DÍA 30		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
T1	Ausencia								
T2	Ausencia								
T3	Ausencia								
T4	Ausencia								
T5	Ausencia								

4.5. VIDA ÚTIL DEL YOGURT

El estudio de determinación de la vida útil del yogurt con conservantes naturales ϵ -polilisina – propóleo se realizó a partir del recuento de mohos y levaduras como indicador de deterioro progresivo en 30 días a 4 °C de temperatura de almacenamiento (Tabla 13). Se observa como el número de UP de mohos y levaduras en el yogurt disminuye de manera significativa (ANOVA 1 vía, $p < 0,001$) durante el almacenamiento para el conjunto de todos los tratamientos.

Tabla 13. Recuento de mohos y levaduras (UP/g) en muestras de yogurt con combinación de preservantes ϵ -polilisina y propóleo de todos los tratamientos, durante su almacenamiento a 4 °C.

Días	Promedio	N	Desviación típica.	Error típico. de la media
Día 0	51,47	15	4,61	1,19
Día 15	37,20	15	6,93	1,79
Día 30	26,33	15	7,57	1,95
Total	38,33	45	12,19	1,82

Todos los estudios predictivos superaron los 30 días de vida útil que con normalidad sustenta el yogurt comercial a una temperatura de 4 °C. Cabe indicar que este estudio se lo realizó solamente con UP de mohos, debido a la ausencia de *E. coli* y *S. aureus* en las muestras evaluadas.

Se observó el decrecimiento de las UP de mohos durante la etapa de almacenamiento en el tratamiento T1 y se determinó que el tiempo de vida útil del producto alcanzaría 123 días cuando se tengan 10 UP/g (Figura 6).

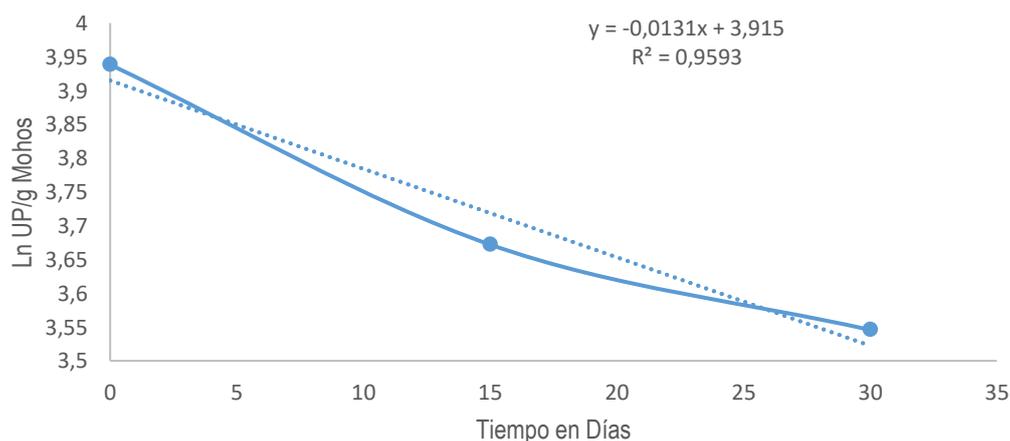


Figura 6. Comportamiento de las UP/g de mohos en el tratamiento 1 de yogurt con conservantes naturales de ϵ -polilisina y propóleo.

$$t = \frac{\ln A - \ln A_0}{k} \quad (4.1)$$

$$t = \frac{\ln (10) - 3,915}{-0,0131} = 123 \text{ días} \quad (4.2)$$

En el tratamiento T2 se observó el decrecimiento de las UP de mohos durante la etapa de almacenamiento, y se determinó que el tiempo de vida útil del producto sería de 83 días para alcanzar 10 UP/g (Figura 7).

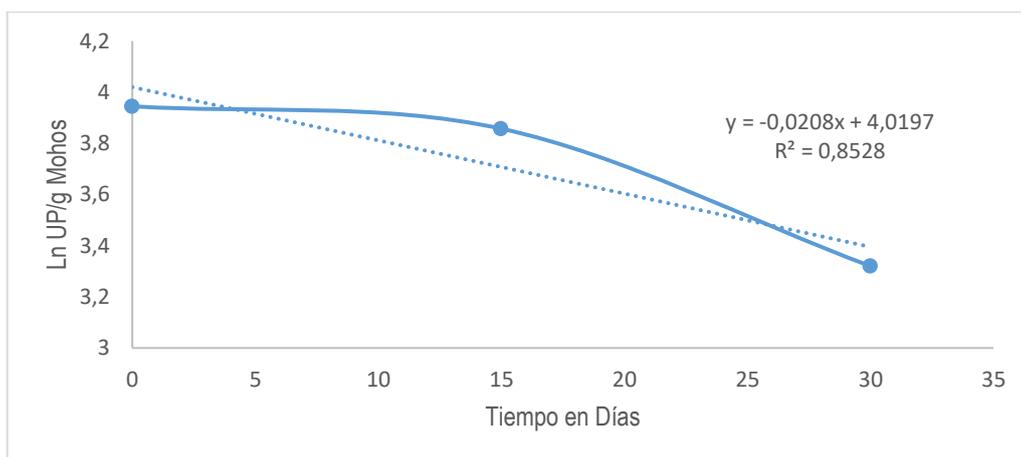


Figura 7. Comportamiento de las UP/g de mohos en el tratamiento 2 de yogurt con conservantes naturales de ϵ -polilisina y propóleo.

$$t = \frac{\ln A - \ln A_0}{k} \quad (4.3)$$

$$t = \frac{\ln(10) - 4,0197}{-0,0208} = 83 \text{ días} \quad (4.4)$$

En el tratamiento T3 se observó un decrecimiento de las UP de mohos durante la etapa de almacenamiento, estimándose el tiempo de vida útil del producto en 76 días para que se alcancen las 10 UP/g (Figura 8).

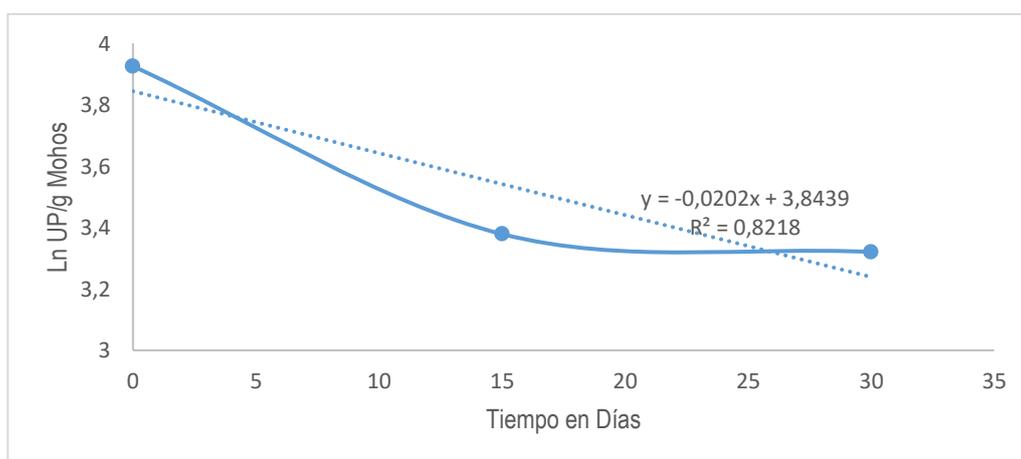


Figura 8. Comportamiento de las UP/g de mohos en el tratamiento 3 de yogurt con conservantes naturales de ϵ -polilisina y propóleo.

$$t = \frac{\ln A - \ln A_0}{k} \quad (4.5)$$

$$t = \frac{\ln(10) - 3,8439}{-0,0202} = 76 \text{ días} \quad (4.6)$$

En el tratamiento T4 se observó un decrecimiento de las UP de mohos durante la etapa de almacenamiento, estimándose el tiempo de vida útil del producto en 78 días para que se alcancen las 10 UP/g (Figura 9).

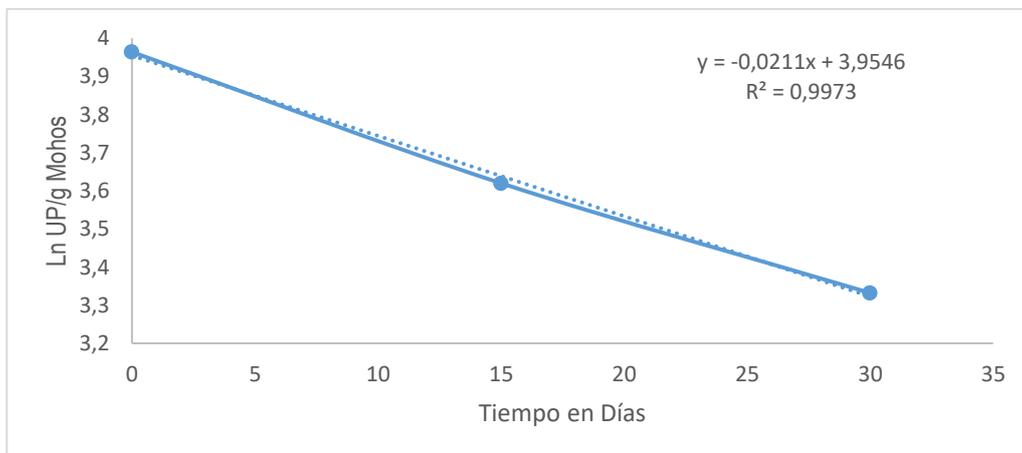


Figura 9. Comportamiento de las UP/g de mohos en el tratamiento 4 de yogurt con conservantes naturales de ϵ -polilisina y propóleo.

$$t = \frac{\ln A - \ln A_0}{k} \quad (4.7)$$

$$t = \frac{\ln(10) - 3,9546}{-0,0211} = 78 \text{ días} \quad (4.8)$$

En el tratamiento T5 se observó un decrecimiento de las UP de mohos durante la etapa de almacenamiento, estimándose el tiempo de vida útil del producto en 70 días para que se alcancen las 10 UP/g (Figura 10).

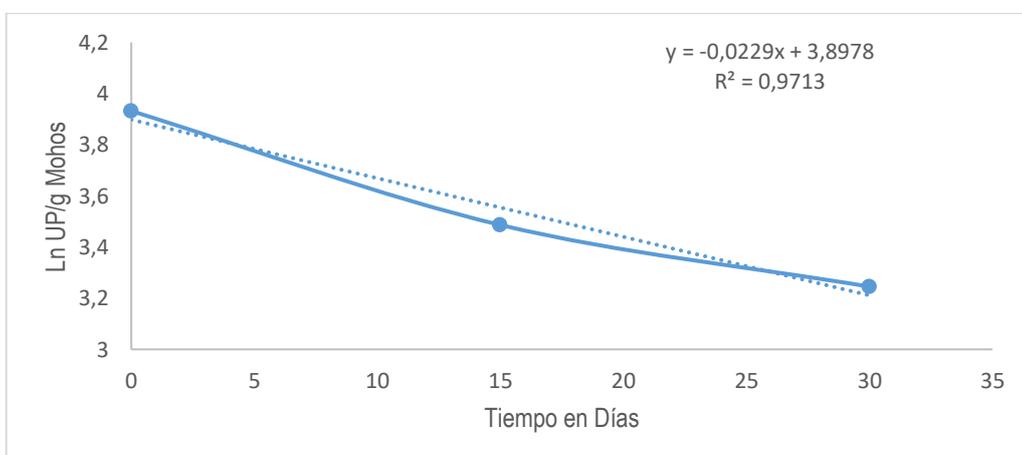


Figura 10. Comportamiento de las UP/g de mohos en el tratamiento 5 de yogurt con conservantes naturales de ϵ -polilisina y propóleo.

$$t = \frac{\ln A - \ln A_0}{k} \quad (4.9)$$

$$t = \frac{\ln(10) - 3,8978}{-0,0229} = 70 \text{ días} \quad (4.10)$$

Se evidencia que las combinaciones de los conservantes evaluados en el presente estudio lograron reducir el crecimiento de mohos y elevar substancialmente el tiempo de vida útil del yogurt, entre 70 y 123 días, en comparación con el tiempo esperado de anaquel de un yogurt (30 días).

4.6. EVALUACIÓN SENSORIAL

Los panelistas evaluadores consideraron que las muestras de yogurt correspondientes a tres tratamientos con combinación de distintas proporciones de conservantes (T1: 5 mg ϵ -polilisina – 1 ml Propóleo; T2: 10 mg ϵ -polilisina – 0,9 ml Propóleo y T3: 15 mg ϵ -polilisina – 0,8 ml Propóleo) y almacenadas durante 30 días a 4 °C, mostraron diferencias altamente significativas en cuanto a las cinco características evaluadas (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis de los resultados de la evaluación por 75 panelistas no entrenados de muestras de Yogurt sometidas a tres tratamientos con combinación de conservantes ϵ -polilisina y propóleo, luego de 30 días de almacenamiento a 4 °C.

Característica	W Kendall	p	Tratamiento*		
			T1	T2	T3
COLOR	0,304	0,0001	1,81 ^a	1,72 ^a	2,47 ^b
OLOR	0,874	0,0001	1,39 ^a	2,26 ^b	2,35 ^b
SABOR	0,169	0,0001	1,94 ^b	2,32 ^c	1,74 ^a
TEXTURA	0,264	0,0001	1,51 ^a	2,09 ^b	2,29 ^c
ACEPTABILIDAD GENERAL	0,169	0,0001	1,83 ^a	1,93 ^a	2,23 ^b

* Resultados con la misma letra no difieren significativamente.

En la prueba no paramétrica de Kendall, se estableció que todas las características organolépticas en estudio presentan diferencia significativa ($p < 0,05$) entre tratamientos, siendo los tratamientos T2 y T3 los mejores; T3 mejor en color, olor, textura y aceptabilidad general y T2 mejor en olor y sabor.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. CONCLUSIONES

- El tratamiento 1 (5 mg de ϵ -polilisina y 1 ml de propóleo) proporcionó el mayor tiempo estimado de vida útil de 123 días. Cabe indicar que todos los tratamientos estuvieron por encima de los 30 días de vida anaquel del yogurt comercial.
- El pH y la acidez tuvieron un comportamiento inversamente proporcional en el yogurt, siendo los tratamientos T1, T2 (10 mg de ϵ -polilisina y 0,9 ml de propóleo) y T3 (15 mg de ϵ -polilisina y 0,8 ml de propóleo) para el pH y la acidez los de mejor ajuste respecto a normas internacionales.
- La aceptabilidad sensorial del yogurt con aplicación de mezcla de conservantes ϵ -polilisina y propóleo, evaluada por 75 catadores no entrenados, indicó que los mejores tratamientos fueron el T2 (olor y sabor) y T3 (color, olor, textura y aceptabilidad general).

4.2. RECOMENDACIONES

- Extender el estudio de la vida útil del yogurt con aplicación de mezclas de ϵ -polilisina y propóleo a 90 días para obtener mayor precisión del efecto antimicótico en los tratamientos.
- Ensayar individualmente la aplicación ϵ -polilisina y el propóleo como conservantes en productos lácteos, para medir la eficiencia inhibitoria de ambos y el comportamiento bacteriostático en relación a la producción y estabilidad del ácido láctico indicador de las variables pH y acidez en un tiempo de almacenamiento de 90 días.
- Correlacionar la aceptabilidad sensorial con las variables pH y acidez de todos los tratamientos, considerando utilizar jueces entrenados para obtener un criterio más preciso del estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Adolfsson, O., Meydani, S. & Russell, R. (2004). Yogurt and gut function. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 245-256.
- Alcázar, J. (2002). *Diccionario Técnico de Industrias Alimentarias*, Editorial Cibercopy.
- Aly, S., & Elewa, N., (2007). The effect of Egyptian honeybee propolis on the growth of *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin biosynthesis in Ras cheese. *Journal of Dairy Research*, 74(1), 74-78.
- Amiot, J. (1991). *Ciencia y Tecnología de la Leche*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España.
- Alzamora S, Guerrero S, Nieto A, y Vidales S. (2004). *Conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas: Manual de capacitación*. 1er ed. Roma (Italia): [consultado 2019 oct 15] <http://www.fao.org/3/a-y5771s.pdf>.
- AOAC. (2000). *Official methods of analysis*. Association of Official Analytical Chemistry Washington D.C. capítulo 33:844.
- AOAC. (2005). *Official methods of analysis*. Association of Official Analytical Chemistry, Washington D.C. capítulo 33:844.
- Archer, D. L., & Young, F. E. (1988). Contemporary issues: diseases with a food vector. *Clinical Microbiology Reviews*, 1(4), 377-398.
- Baró, L., Lara, F. y Corral, E. (2010). Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Lácteos y derivados lácteos. Gil Hernández A, editor. *Tratado de nutrición*, 2, 2.
- Bankova, V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research., *eCAM*, 2(1), 29–32 <https://doi:10.1093/ecam/neh059>.
- Bogdanov, S. (2011). Jalea real, cría de abejas: composición, salud, medicina: una revisión. *Lípidos*, 3(8), 8-19.
- Breukink, E. & de Kruijff, B. (2006) Lipid II as target for antibiotics. *Nat Rev Drug Discov.*, 5, 321–332.

- Carminati, D., Giraffa, G., & Bossi, M. G. (1989). Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 52(9), 614-617.
- Carrera, Q., y Henry, R. (2016). *Evaluación del extracto etanólico de propóleo como conservante en queso cabaña*. Tesis de pregrado. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras.
- Carvajal, N. (1999). *Estudio del efecto del uso de cultivos probióticos en la elaboración de un producto similar al yogur* (Doctoral dissertation, Tecnología de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José).
- Castaldo, S. & Capasso, F. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73, S1-S6.
- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S. & Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science*, 79(3), 483-499.
- Cedeño Carpio, X.A. (2018). *Evaluación de propóleo como conservante natural en la leche chocolatada*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico de Leira, España.
- Chaillou, L.L. & Nazareno, M.A. (2009). Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *LWT Food Sci. Technol.*, 42(8), 1422-1427.
- Chheda, A.H. & Vernekar, M.R. (2015). A natural preservative ϵ -poly-Llysine: Fermentative production and applications in food industry. *International Food Research Journal*, 22, 23–30.
- Clayton, K, Bush, D. y Keener, K. 2016. *Emprendimientos alimentarios: Métodos para la conservación de alimentos*. PURDUE EXTENSION. EEUU; (consultado 2019 oct 23). <https://www.extension.purdue.edu/extmedia/FS/FS-15-S-W.pdf>.
- Codex Alimentarius (2003). *Normas del Codex para leches fermentadas*. CODEX STAN 243-2003. 2003; Available at: http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=400. Accessed 23 de agosto, 2019.
- Corrales-García, L.L. y Gelmy, C. (2010). Péptidos con actividad antimicrobiana producidos por microorganismos nativos. *Vitae*, 17(2), 181-190.

- Cubero, N., Monferrer, A. y Villalta, J. (2002). *Aditivos alimentarios*. Mundi-prensa.
- De la Fuente Salcido, N. M. y Corona, J. E. B. (2010). Inocuidad y bioconservación de alimentos. *Acta Universitaria*, 20(1), 43-52.
- Del Valle, H. B., Yaktine, A. L., Taylor, C. L., & Ross, A. C. (Eds.). (2011). *Dietary reference intakes for calcium and vitamin D*. National Academies Press.
- España - Ministerio de la Presidencia (2014). Real Decreto 271/2014, de 11 de abril, por el que se aprueba la Norma de Calidad para el yogur o yoghurt. *Boletín Oficial del Estado*, 102 de 28 de abril de 2014. (BOE-A-2014-4515).
- Fister S, Fuchs S, Stessl B, Schoder D, Wagner M. & Rossmann P, (2016). Screening and characterization of bacteriophage P100 insensitive *Listeria monocytogenes* isolates in Austrian dairy plants. *Zoonoses and Public Health*, 59:108-17.
- Food and Drugs Administration (U.S.) (2004). *GRAS Notice 000135: ε-Polylysine*. Office of Food Additive Safety. Retrieved from <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedAsSafeGRAS/GRASListings/ucm153957.htm>.
- Food and Drugs Administration (U.S.) (2010) *F. Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000135*. 2004 [updated 2009 May 22 cited 2010 Feb 07]; Available from: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedAsSafeGRAS/GRASListings/ucm153957.htm>.
- Gálvez, H. J., Rodríguez, C. M., Toro, C. R. y Bolívar, G. (2011). Efecto de bioconservación de carne molida de cerdo, tipo hamburguesa con *Lactobacillus acidophilus* cepa ATCC 4356 y *Staphylococcus carnosus* NRRLO2. *Alimentos Hoy*, 16(16), 33-42.
- Ganz, T., & Lehrer, R. I. (2002). Defensins of vertebrate animals. *Curr. Opin. Immunol*, 14(2), 96-102.
- Gao, Y., Li, D., & Liu, X. (2013). Evaluation of the factors affecting the activity of sakacin C2 against *E. coli* in milk. *Food Control*, 30, 453–458.
- Geornaras, I., Yoon, Y., Belk, K. E., Smith, G. C., & Sofos, J. N. (2007). Antimicrobial activity of ε-polylysine against *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in various food extracts. *Journal of Food Science*, 72(8), M330-M334.

- German, J. B., & Dillard, C. J. (2006). Composition, structure and absorption of milk lipids: a source of energy, fat-soluble nutrients and bioactive molecules. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(1), 57-92.
- Grosso, G. S. (2017). *Origen, naturaleza, propiedades fisicoquímicas y valor terapéutico del propóleo*. Sello Editorial Universidad del Tolima.
- Gutiérrez-Cortés, C., & Suarez Mahecha, H. (2014). Antimicrobial Activity of Propolis and its Effect On The Physicochemical And Sensorial Characteristics In Sausages. *Vitae*, 21(2), 90-96.
- Hancock, R. E., & Chapple, D. S. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(6), 1317-1323.
- Hiraki, J. (1995). Estudios básicos y aplicados sobre ϵ -polilisina. *Revista de Agentes Antimicóticos Antibacterianos*, 23, 349–354.
- Hiraki, J. (2000). Polylysine, its development and utilization. *Fine Chemistry*, 29, 18–25.
- _____. (2003). Uso de estudios ADME para confirmar la seguridad de la ϵ -polilisina como conservante en los alimentos. *Toxicología Reglamentaria y Farmacología*, 37(2), 328–340.
- Hosomi, R., Yamamoto, D., Ren, O., Nishiyama, T., Yoshida, M., & Fukunaga, K. (2015). Dietary ϵ -polylysine decreased serum and liver lipid contents by enhancing fecal lipid excretion irrespective of increased hepatic fatty acid biosynthesis-related enzymes activities in rats. *Preventive Nutrition and Food Science*, 20, 43–51.
- Huertas, R. A. P. (2013). Efecto del té verde (*Camellia sinensis* L.) en las características fisicoquímicas, microbiológicas, proximales y sensoriales de yogurt durante el almacenamiento bajo refrigeración. @ *limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 11(1), 56-64.
- Hui, Y. (1993). *Dairy Science and Technology Handbook*. Vol. 2: Product manufacturing. VCH publishers, p1-53.
- Hussain, I., Rahman, A. & Atkinson N. (2009). Quality comparison of probiotic and natural yogurt. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8, 9-12.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., Vad, B.S., Stenvang, M., Otzen, D.E. & Meyer, R.L. (2014) The Antimicrobial Mechanism of Action of Epsilon-Poly-L-Lysine.

Applied and Environmental Microbiology.
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02204-14>.

IBM (2020) *IBM SPSS Statistics*. Recuperado de:
<https://www.ibm.com/products/spss-statistics>.

INDECOPI 2014. *Norma Técnica Peruana. Leche y Productos Lácteos. Leches fermentadas. Yogurt. Requisitos*. 5a. ed. NTP 202.092 2014. Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual, Lima, Perú.

INEN (2011). *Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2395:2011. Leches fermentadas. Requisitos*. 2da revisión. Servicio Ecuatoriano de Normalización, Quito, Ecuador.

_____. (2013). *Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-10:2013. Primera revisión. Control microbiológico de los alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuentos en placa por siembra en profundidad*. Servicio Ecuatoriano de Normalización, Quito, Ecuador.

_____. *Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-14:2013. Primera revisión. Control microbiológico de los alimentos. Staphylococcus aureus. Recuento en placa de siembra por extensión en superficie*. Servicio Ecuatoriano de Normalización, Quito, Ecuador.

_____. *Norma Técnica Ecuatoriana NTE 1529-8. Primera revisión. Control microbiológico de los alimentos. detección y recuento de Escherichia coli presuntiva por la técnica del número más probable*. Servicio Ecuatoriano de Normalización, Quito, Ecuador.

Infostat (2020). *Infostat paquete estadístico*. Recuperado de:
<https://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=37>.

Inti Barreto, J.C. (2019). *Caracterización de los propóleos del distrito de Huaraz y su efecto conservante en yogurt frutado*. Tesis doctoral, Universidad Nacional Fededrico Villareal, Lima Perú.

Iriberry, A. (2014). *Los Defectos más comunes en los Yogures y sus posibles soluciones*. Recuperado el 07 de noviembre de 2019, de [http://www.tecnocarnicos.com/project/tecnocarnicos/resumen/vortrag/Defectos %20 en %20yogures% -%20Tecnolacteos% 202014.pdf](http://www.tecnocarnicos.com/project/tecnocarnicos/resumen/vortrag/Defectos%20en%20yogures%20-%20Tecnolacteos%202014.pdf) (consultado 30 mayo 2020).

- Jenkins, T. C. & McGuire, M. A. (2006). Major advances in nutrition: impact on milk composition. *Journal of Dairy Science*, 89(4), 1302-1310. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72198-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72198-1)
- Jensen, R. G. (2002). The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, 85(2), 295-350.
- Kai, W., Xiao-Lu, J., Xiao-Ge S., Li-Ping, S., Li-Ming, W., Liang-Qin, W., Marcucci, M.C., Fu-Liang, H. & Lian-Xin, L. (2015). Effects of Chinese Propolis in Protecting Bovine Mammary Epithelial Cells against Mastitis Pathogens-Induced Cell Damage. *Mediators of Inflammation*, 2016(3), 1-12. doi:10.1155/2016/8028291.
- Koc, A.N., Silici, S., Mutlu-Sariguzel, F. & Sagdic, O. (2007). Antifungal Activity of Propolis in Four Different Fruit Juices. *Food Technol. Biotechnol.*, 45(1), 57–61.
- Kozak, S., Margison, K.M. & D'Amico, D.J. (2017). Synergistic Antimicrobial Combinations Inhibit and Inactivate *Listeria monocytogenes* in Neutral and Acidic Broth Systems. *J Food Prot*, 80(8), 1266–1272. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-035>.
- Kumar, P & Mishra, N. (2004). Yoghurt powder—a review of process technology, storage and utilization. *Food and Bioproducts Processing*, 82,133–142.
- Labrie, J., Pelletier-Jacques, G., Deslandes, V., Ramjeet, M., Auger, E., Nash, J.H., Jacques, M. (2010). Effects of growth conditions on biofilm formation by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Res.*, 41, 3. 17 pp.
- Labuza, T.P. (1982). *Shell-life dating of foods*. Cabdirect.org
- Lafta, S.S. (2019). Effect of the ϵ -polylysine utilization on the physiochemical, microbiological and rheological properties of the drinking yogurt. *Plant Archives*, 19(1), 870-874.
- Lehmann, J., Retz, M., Harder, J., Krams, M., Kellner, U., Hartmann, J., & Weichert-Jacobsen, K. (2002). Expression of human beta-defensins 1 and 2 in kidneys with chronic bacterial infection. *BMC Infectious Diseases*, 2(1), 20.
- Li, S., Zhang, L., Liu, M., Wang, X., Zhao, G., & Zong, W. (2017). Effect of poly- ϵ -lysine incorporated into alginate-based edible coatings on microbial and physicochemical properties of fresh-cut kiwifruit. *Postharvest Biology and Technology*, 134, 114–121.

- Londoño Orozco, A; Carrillo, P., García Tovar, J.G., Carrillo M., C.G., Quintero Mora, L., García Vázquez, M.L. Mendoza Saavedra, S.E., Cruz Sánchez, M.A. y Cruz Sánchez, T. (2008). Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México. *Tecnología en Marcha*, 21(1), 49-55.
- López, A., Cabrera, M., Alvarez, R. y Verdun, C. (2012). *Búsqueda de usos alternativos de propóleos en el control biológico de hongos fitopatógenos*. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina, 1-4.
- Lu, L., Chen, Y., & Chou, C. (2005). Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *Internat. J. Food. Microbiol.*, 102(2), 213-220.
- Ma, H., Cheng, L., Li, L., & Yang, X. (2014). Effect of ϵ -poly-L-lysine on vacuum packed tilapia stored at 4°C. *Advanced Materials Research*, 881–883, 751–756.
- Macías Pico, A. M. y Yunda Guacho, E. F. (2015). *Aplicación de extracto de propóleo como agente conservante en carne de res molida que se expenden en el mercado de Sauces IV de la ciudad de Guayaquil*. Tesis de pregrado, Universidad de Guayaquil. Facultad Ciencias Químicas, Guayaquil, Ecuador.
- Mahaut, M.; Jeantet, R.; Brulé, G.; y Schuck, P. (2004). *Productos Lácteos Industriales*, Editorial Acribia S.A., Zaragoza España.
- Maldonado Gaibor, D. E. (2015). *Desarrollo de un manual de buenas prácticas de manufactura y manipulación de alimentos para el Restaurante Don Boris de la Ciudad de Quito*. Tesis de pregrado, Hospitalidad y Servicios, Facultad de Ciencias Gastronómicas y Turismo, Universidad Técnica Equinoccial, Quito.
- Manrique, A. J. y Santana, W. C. (2008). Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela. *Zoot. Trop.*, 26(2), 157-166.
- Mataix, J. y Rivas, J. (2009). *Lácteos y derivados. Nutrientes y alimentos*. En J M, (editor). *Nutrición y alimentación humana* (tomo 1). Madrid: Ergon; pp. 391-406.
- Mazzeo, M. (2007). *Tecnología de Lácteos*. Editorial Universidad de Caldas, Colombia.

- Moreno Aznar, L. A., Cervera Ral, P., Anta, O., Rosa, M., Díaz Martín, J. J., Baladia, E. y Manera, M. (2013). Evidencia científica sobre el papel del yogur y otras leches fermentadas en la alimentación saludable de la población española. *Nutrición Hospitalaria*, 28(6), 2039-2089.
- Nair, N.V.T., Nannapaneni, R. Kiess, A., Mahmoud, B., & Shekhar-Sharma, C. (2014). Antimicrobial efficacy of lauric arginate against *Campylobacter jejuni* and spoilage organisms on chicken breast fillets. *Poultry Sci.*, 93(10), 2636-2640. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03858>
- Najjar, M. B., Kashtanov, D., & Chikindas, M. L. (2007). ϵ -poly-L-lysine and nisin A act synergistically against Gram-positive food-borne pathogens *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 13–18.
- Nampoothiri, K.M., Gopinath, V., Anusree, M, Gopalan, N., & Dhar, K.S. (2014). *Amino-Based Products from Biomass and Microbial Amino Acid Production*. En Vijai K. Gupta, Maria G. Tuohy, ... Feng Xu (Ed). *Bioenergy Research: Advances and Applications* p. 337-352. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59561-4.00019-X>.
- Nishikawa, M. y Ogawa, KI (2002). Distribución de microbios que producen polímeros antimicrobianos de ϵ -poli-L-lisina en la microflora del suelo determinado por un método novedoso. *Appl. Reinar. Microbiol*, 68 (7), 3575-3581.
- Ortega, R. M., Mena, M. C. y López-Sobaler, A. M. (2004). *Leche, lácteos y salud*. Madrid: Médica Panamericana. Pp. 21-30.
- Otsuka, N., Kuwahara, Y., & Manabe, M. (1992). Effect of epsilon-polylysine on preservation of boiled noodles. *Journal of Japanese Society of Food Science and Technology*, 39, 344–347.
- Pandey, A. K., & Kumar, A. (2014). Improved microbial biosynthesis strategies and multifarious applications of the natural biopolymer epsilon-poly-l-lysine. *Process Biochemistry*, 49, 496–505.
- Papageorgiou, D. K., & Marth, E. H. (1989). Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening and storage of Feta cheese. *Journal of Food Protection*, 52(2), 82-87.

- Parra Huertas, R.A: (2010). Bacterias ácido lácticas. Papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad del Cauca, 8(1), 93-105.
- Pauletti M, Santa Cruz L, Mazza G, Rozycki S, Sabbag N, y Costa S (2003). Fabricación de yogurt con células inmovilizadas. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4(3), 190-196, DOI: 10.1080/11358120409487760
- Pepeljnjak, S., Jalsenjak, I., & Maysinger, D. (1982). Inhibition of growth and biosynthesis of ochratoxin A in *Aspergillus sulphureus* NRRL 4077 by propolis extract. *Die Pharmazie*, 37(6), 439-440.
- Peschel, A. & Sahl, H. G. (2006). The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4(7), 529.
- Piers, K. L., Brown, M. H., & Hancock, R. E. (1993). Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene*, 134(1), 7-13.
- Pineda J, Pincipal J, Barrios C, Milla D, Solano Y. & Gil E (2010) Propiedad fungistática in vitro de propóleos sobre tres aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides*. *Zoot. Trop.* 28, 83-91.
- Popova, M. P., Bankova, V. S., Bogdanov, S., Tsvetkova, I., Naydenski, C., Marcazzan, G. L., & Sabatini, A. G. (2007). Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie*, 38(3), 306-311.
- Puente Calderón, A.D. (2010). *Actividad antibacteriana in vitro de soluciones de propóleo etanólicos sobre dos bacterias periodonto patógenas frecuentes en la enfermedad gingivoperiodontal*. Colegio de Odontólogos de Perú, Lima. Obtenido de <http://www.cop.org.pe/bib/tesis/ALANDANNYCALDERONPUENTEDELA VEGA.pdf>.
- Rajakaksha, D. S. W., Kodithuwakku, K. H. T., Silva, K. S. T., & Rupasinghe, R. J. L. (2013). Evaluation of potassium sorbate and ϵ -polylysine for their inhibitory activity on post-acidification of set yoghurt under cold storage for 20 days. *Journal of Chitin and Chitosan Science*, 2, 16–20.
- Robinson, R. y Tamime, A. (1991). *Yogurt Ciencia y Tecnología*, Editorial Acribia Zaragoza, España.

- Romaní, K. M. H. y Humire, S. G. N. (2009). Acción antimicrobiana del própolis de *Apis mellifera* L. y de *Solanum mammosum* L. (teta de vaca) contra microorganismos de la cavidad oral (*Streptococcus mutans* y *Streptococcus mitis*). *Ciencia y Desarrollo*, 10, 11-22.
- Ryser, E.T., & Marth, E.H. (1987). Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Camembert cheese. *Journal of Food Protection*, 50(5), 372-378.
- Sánchez, R. D. V., Urrutia, G. R. T. y Escalante, A. S. (2013). El propóleo: conservador potencial para la industria alimentaria. *Interciencia*, 38(10), 705-711.
- Sandoval, C.H. y Giurfa, A. (2001). *Elaboración de Yogurt*, Editorial Macro E.I.R.L., Lima-Perú.
- Santos, A. (2007). *Leche y sus Derivados*, Editorial Trillas S.A., México.
- Scazzocchio, F., D'Auria, D., Alessandrinia, D. y Pantanella, F. (2006). Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbial Research*, 161, 327-333.
- Schwaab, M., Hansen, S., Pearson, MD, Shagdarsuren, S. y Dazert, S. (2009). B-defensinas humanas: en la primera línea del absceso periamigdalino. *Revista Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas*, 28 (7), 745.
- Schaack, M. M., & Marth, E. H. (1988). Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk during fermentation with mesophilic lactic starter cultures. *Journal of Food Protection*, 51(8), 600-606.
- Schneider, J. Unholzer J., Schaller, A., Schafer-Korting, M., Korting HC (2005). Human defensins. *J. Mol. Med.*, 83(8), 587-95.
- Shah, N. P. (2003). *Yogurt: the product and its manufacture*. In B. Caballero, L. C. Trugo, & P. M. Finglas (Eds.) (2nd ed.). *Encyclopedia of food science and nutrition*, Vol. 10 London: Academic Press.
- Shahbaz, M., Zahoor T.; Atif Randhawa, M. & Nawaz, H. (2015). Invitro antibacterial Activity of Hydroalcoholic Extract of Propolis against Pathogenic Bacteria. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences*, 13(3), 132-136.

- Shi, C., Zhao, X., Liu, Z., Meng, R., Chen, X., & Guo, N. (2016). Antimicrobial, antioxidant, and antitumor activity of epsilon-poly-L-lysine and citral, alone or in combination. *Food & Nutrition Research*, 60, 31891.
- Shima, S. (1984). Acción antimicrobiana de ϵ -poli-L-lisina. *Revista de Antibióticos*, 37(11), 1449–1455.
- Shima, S. y Sakai H. (1977). Polilisina producida por *Streptomyces*. *Química Agrícola y Biológica*, 41(9), 1807-1809.
- Silici S, & Kutluca S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J. Ethnopharmacol.*, 99, 69-73.
- Singh, M., Mishra, A. K., Misra, N. K., Tandon, P., Kunimoto, K., & Gupta, V. D. (2008). Phonon dispersion and heat capacity in microbial Poly(ϵ -L-lysine) (M- ϵ -PL). *Polymer Journal*, 40, 503–512.
- Song, Z., Li, F., Guan, H., Xu, Y., Fu, Q., & Li, D. (2017). Combination of nisin and ϵ -polylysine with chitosan coating inhibits the white blush of fresh-cut carrots. *Food Control*, 74, 34–44.
- Southgate, D. (1992). *Conservación de Frutas y Hortalizas*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Spreer, E. (1991). *Lactología Industrial*, Editorial Acribia, S.A.
- Stan T., Marutescu, L., Chifiriuc, C.M., Mateescu, C., & Lazar, V. (2013) Study of the antimicrobial and antibiofilm activity of romanian propolis. *Biointerface Research and Applied Chemistry*, 3, 541-550.
- Teusink, B., & Molenaar, D. (2017). Systems biology of lactic acid bacteria: For food and thought. *Current Opinion in Systems Biology*, 6, 7–13.
- Tripathi, P. & Dubey, N.K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 32(5), 232-245. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2003.11.005>
- Vargas-Sánchez R, Javier-Saiz E, Torrescano-Urrutia G, Acedo E, Carvajal E, González-Córdova A, Vallejo-Galland B, Torres-Llañez M, & Sánchez-Escalante (2011). *Antioxidant and antimicrobial properties of commercial propolis in beef patties*. Annu. Meet. Institute of Food Technologists. New Orleans, LA, EEUU.

- Vargas-Sánchez, R. D., Torrescano-Urrutia, G. R., Mendoza-Wilson, A. M., Vallejo-Galland, B., Acedo-Félix, E., SánchezEscalante, J. J. y Sánchez-Escalante, A. (2014). Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleo. *Biotechnia*, 16(1), 32-37.
- Veisseyre, R. (1980). *Lactología Técnica*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza – España.
- Vicente, R., Erick, B., Escobar, G. y Víctor, M. (2012). *Efecto antibacterial del propóleo sobre Listeria monocytogenes in vitro y en la superficie de melón (Cucumis melo)*. Tesis de pregrado, Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, Honduras.
- Villada Moreno, J.J. (2010). *Conservadores químicos utilizados en la industria alimentaria*. Tesis de pregrado Ing. de Alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México.
- Villanueva, M., González, M., Fernández, H., Wilson, M., Manquián, N., Otth, C. y Otth, L. (2015). Actividad antibacteriana in vitro de propóleos chilenos sobre *Helicobacter pylori*. *Revista Chilena de Infectología*, 32(5), 530-535.
- Wang, W., Bao, Y., Hendricks, G. M., & Guo, M. (2012). Consistency, microstructure and probiotic survivability of goats' milk yoghurt using polymerized whey protein as a co-thickening agent. *International Dairy Journal*, 24(2), 113-119.
- Ye, R., Xu, H., Wan, C., Peng, S., Wang, L., Xu, H., Aguilar, Z.P., Xiong, Y., Zeng, Z., & Wei, H. (2013). Antibacterial activity and mechanism of action of ϵ -poly-L-lysine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 439(1), 148-153. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.001>.
- Yoshida, T. y Nagasawa, T. (2003). ϵ -Poli-L-lisina: producción microbiana, biodegradación y potencial de aplicación. *Microbiología Aplicada y Biotecnología*, 62 (1), 21-26.
- Yu, H., Huang, Y. & Huang Q. (2010). Synthesis and Characterization of Novel Antimicrobial Emulsifiers from ϵ -Polylysine. *J. Agric. Food Chem.* 58(2), 1290–1295. <https://doi.org/10.1021/jf903300m>.
- Zahi, M. R., El Hattab, M., Liang, H., & Yuan, Q. (2017). Enhancing the antimicrobial activity of d -limonene nanoemulsion with the inclusion of ϵ -polylysine. *Food Chemistry*, 221, 18–23.

- Zahoor, T., Rahman, S. and Farooq, U. (2003). Viability of *Lactobacillus bulgaricus* Yoghurt Culture Under Different Preservation Methods. *International Journal of Agriculture and Biology*, 5, 46- 48.
- Zhang, L., Li, R., Dong, F., Tiang, A., Li, Z. & Dai, Y. (2015). Physical, mechanical and antimicrobial properties of starch films incorporated with ϵ -poly-L-lysine. *Food Chemistry*, 166, 107-111. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.008>.
- Zúñiga-Estrada, A., López-Merino, R.M.A. y Mota De La Garza, L. (1995). Sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* en leche fermentada con un cultivo iniciador para elaborar yogur. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 37(3), 257-265.

ANEXOS

Anexo 1. Desinfección de materiales para elaboración del yogurt en el laboratorio de lácteos, UTM, extensión Chone.



Anexo 2. Descremado de la leche en el laboratorio de lácteos, UTM, extensión Chone.



Anexo 3. Datos de los análisis de pH, acidez y mohos y levaduras en las muestras de yogurt con conservantes.

Mohos y levad (UP/g)	DÍA 0			DÍA 15			DÍA 30		
	Trat	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2
a1	51	51	52	40	38	40	25	41	38
a2	53	50	52	50	48	44	22	14	11
a3	52	50	50	33	24	31	28	28	27
a4	60	44	54	40	37	35	24	31	29
a5	41	55	57	36	29	33	25	26	26

pH	DÍA 0			DÍA 15			DÍA 30		
	Trat	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2
a1	4,01	4,00	3,97	4,01	4,11	4,00	4,01	3,99	4,05
a2	4,02	4,55	4,36	3,89	4,00	4,03	4,08	4,00	3,95
a3	4,22	4,54	4,39	4,00	3,85	3,80	4,01	3,92	3,58
a4	4,87	4,90	4,50	4,20	4,40	4,02	4,03	4,00	4,00
a5	4,89	4,95	4,12	4,24	4,01	4,60	4,10	4,00	4,04

Acidez (% ac. láctico)	DÍA 0			DÍA 15			DÍA 30		
	Trat	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2
a1	1,02	1,00	1,02	1,35	1,24	1,17	1,30	1,45	1,60
a2	1,20	1,27	1,05	1,22	1,78	1,35	1,77	1,25	1,68
a3	1,32	1,24	1,26	1,17	1,28	1,56	1,70	1,70	1,70
a4	1,40	1,33	1,30	1,42	1,10	1,88	1,30	1,49	1,27
a5	1,13	1,20	1,10	1,83	1,19	1,78	1,80	1,36	1,51

Anexo 4. Escala hedónica utilizada en la evaluación sensorial del yogurt.

EVALUACION SENSORIAL						
No GRUPO	NOMBRE DE JUEZ NO ENTRENADO		YOGURT NATURAL		FECHA	
	NOMBRE DEL PRODUCTO					
*En los vasos frente a ud. hay cinco muestras de Yogurt Natural, para que las compare en cuanto a:						
Color, Sabor, Textura, y Aceptabilidad general						
*Marque con una x en cada muestra						
*Mantenga el orden, al comparar: la primera muestra que debe calificar es el COLOR, luego el OLOR, luego el SABOR, luego es TEXTURA, y finalmente la ACEPTABILIDAD GENERAL.						
MUESTRA	A1B1		A2B3		A3B2	
COLOR	1	Me disgusta muchísimo	1	Me disgusta muchísimo	1	Me disgusta muchísimo
	2	Me disgusta mucho	2	Me disgusta mucho	2	Me disgusta mucho
	3	Me disgusta bastante	3	Me disgusta bastante	3	Me disgusta bastante
	4	Me disgusta ligeramente	4	Me disgusta ligeramente	4	Me disgusta ligeramente
	5	Ni me gusta ni me disgusta	5	Ni me gusta ni me disgusta	5	Ni me gusta ni me disgusta
	6	Me gusta ligeramente	6	Me gusta ligeramente	6	Me gusta ligeramente
	7	Me gusta bastante	7	Me gusta bastante	7	Me gusta bastante
	8	Me gusta mucho	8	Me gusta mucho	8	Me gusta mucho
	9	Me gusta muchísimo	9	Me gusta muchísimo	9	Me gusta muchísimo
OLOR	1	Me disgusta muchísimo	1	Me disgusta muchísimo	1	Me disgusta muchísimo
	2	Me disgusta mucho	2	Me disgusta mucho	2	Me disgusta mucho
	3	Me disgusta bastante	3	Me disgusta bastante	3	Me disgusta bastante
	4	Me disgusta ligeramente	4	Me disgusta ligeramente	4	Me disgusta ligeramente
	5	Ni me gusta ni me disgusta	5	Ni me gusta ni me disgusta	5	Ni me gusta ni me disgusta
	6	Me gusta ligeramente	6	Me gusta ligeramente	6	Me gusta ligeramente
	7	Me gusta bastante	7	Me gusta bastante	7	Me gusta bastante
	8	Me gusta mucho	8	Me gusta mucho	8	Me gusta mucho
	9	Me gusta muchísimo	9	Me gusta muchísimo	9	Me gusta muchísimo
SABOR	1	Me disgusta muchísimo	1	Me disgusta muchísimo	1	Me disgusta muchísimo
	2	Me disgusta mucho	2	Me disgusta mucho	2	Me disgusta mucho
	3	Me disgusta bastante	3	Me disgusta bastante	3	Me disgusta bastante
	4	Me disgusta ligeramente	4	Me disgusta ligeramente	4	Me disgusta ligeramente
	5	Ni me gusta ni me disgusta	5	Ni me gusta ni me disgusta	5	Ni me gusta ni me disgusta
	6	Me gusta ligeramente	6	Me gusta ligeramente	6	Me gusta ligeramente
	7	Me gusta bastante	7	Me gusta bastante	7	Me gusta bastante
	8	Me gusta mucho	8	Me gusta mucho	8	Me gusta mucho
	9	Me gusta muchísimo	9	Me gusta muchísimo	9	Me gusta muchísimo
TEXTURA	1	Me disgusta muchísimo	1	Me disgusta muchísimo	1	Me disgusta muchísimo
	2	Me disgusta mucho	2	Me disgusta mucho	2	Me disgusta mucho
	3	Me disgusta bastante	3	Me disgusta bastante	3	Me disgusta bastante
	4	Me disgusta ligeramente	4	Me disgusta ligeramente	4	Me disgusta ligeramente
	5	Ni me gusta ni me disgusta	5	Ni me gusta ni me disgusta	5	Ni me gusta ni me disgusta
	6	Me gusta ligeramente	6	Me gusta ligeramente	6	Me gusta ligeramente
	7	Me gusta bastante	7	Me gusta bastante	7	Me gusta bastante
	8	Me gusta mucho	8	Me gusta mucho	8	Me gusta mucho
	9	Me gusta muchísimo	9	Me gusta muchísimo	9	Me gusta muchísimo
ACEPTABILIDAD GENERAL	1	Me disgusta muchísimo	1	Me disgusta muchísimo	1	Me disgusta muchísimo
	2	Me disgusta mucho	2	Me disgusta mucho	2	Me disgusta mucho
	3	Me disgusta bastante	3	Me disgusta bastante	3	Me disgusta bastante
	4	Me disgusta ligeramente	4	Me disgusta ligeramente	4	Me disgusta ligeramente
	5	Ni me gusta ni me disgusta	5	Ni me gusta ni me disgusta	5	Ni me gusta ni me disgusta
	6	Me gusta ligeramente	6	Me gusta ligeramente	6	Me gusta ligeramente
	7	Me gusta bastante	7	Me gusta bastante	7	Me gusta bastante
	8	Me gusta mucho	8	Me gusta mucho	8	Me gusta mucho
	9	Me gusta muchísimo	9	Me gusta muchísimo	9	Me gusta muchísimo
Comentarios:						
.....						
.....						
MUCHAS GRACIAS						

Anexo 5. Evaluación sensorial de las muestras de yogurt en la ESPAM por parte de panelistas no entrenados.



Anexo 6. Certificado de resultados de los análisis de calidad a las muestras de yogurt.



Uleam
UNIVERSIDAD LAICA
ELOY ALFARO DE MANABÍ

Lab. De Análisis

Facultad Ciencias Agropecuarias

Manta 04 de febrero del 2020

A Quien Corresponda

Ciudad. -

CERTIFICO: Que los análisis presentados en este informe corresponden a la Loda. Nieve Esther Lectong Cusme C.I. 130697397-3 y a la Ing. Neiva Maricela Quiñonez Becerra C.I. 080078517-2, Estudiantes de Posgrado de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí (ESPAM MFL.). Los análisis fueron realizados en el Lab. De Investigación de Alimentos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la (ULEAM), siendo estos los siguientes: (Acidez titulable, pH, Recuento de *E. coll*, Recuento de Mohos y Levaduras y Recuento de *Staphylococcus aureus* en muestras de yogurt), dichos análisis corresponden al proyecto "EFECTO DE LA E-POLILISINA Y PROPÓLEO COMO CONSERVANTES EN LA VIDA ÚTIL DEL YOGURT.

Muestra	Acidez Titulable (%) Acido láctico									Método de ensayo
	Día 0			Día 15			Día 30			
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
a1	1,02	1,00	1,02	1,35	1,24	1,17	1,30	1,45	1,60	16.267 AOAC 2000
a2	1,20	1,27	1,05	1,22	1,78	1,35	1,77	1,25	1,68	16.267 AOAC 2000
a3	1,32	1,24	1,26	1,17	1,28	1,56	1,70	1,70	1,70	16.267 AOAC 2000
a4	1,40	1,33	1,30	1,42	1,10	1,88	1,30	1,49	1,27	16.267 AOAC 2000
a5	1,13	1,20	1,10	1,83	1,19	1,78	1,80	1,36	1,51	16.267 AOAC 2000

Muestra	pH									Método de ensayo
	Día 0			Día 15			Día 30			
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
a1	4,01	4,00	3,97	4,01	4,11	4,00	4,01	3,99	4,05	973.41 AOAC 2005
a2	4,02	4,55	4,36	3,89	4,00	4,03	4,08	4,00	3,95	973.41 AOAC 2005
a3	4,22	4,54	4,39	4,00	3,85	3,80	4,01	3,92	3,58	973.41 AOAC 2005
a4	4,87	4,90	4,50	4,20	4,40	4,02	4,03	4,00	4,00	973.41 AOAC 2005
a5	4,89	4,95	4,12	4,24	4,01	4,60	4,10	4,00	4,04	973.41 AOAC 2005

Atentamente,



Ing. Marlon Castro García, Mg.

Téc. Responsable de Lab. De Tecnologías de Lácteo
Téc. Responsable de Lab. De Investigación de Alimentos



www.uleam.edu.ec





Uleam
UNIVERSIDAD LAICA
ELOY ALFARO DE MANABÍ

Lab. De Análisis

Facultad Ciencias Agropecuarias

Recuento de <i>E.coli</i> (UFC/g)										
Muestra	Día 0			Día 15			Día 30			Método de ensayo
Código	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
a1	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	NTE INEN 1529-8
a2	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	NTE INEN 1529-8
a3	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	NTE INEN 1529-8
a4	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	NTE INEN 1529-8
a5	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	NTE INEN 1529-8

Mohos y Levaduras (UP/g)										
Muestra	Día 0			Día 15			Día 30			Método de ensayo
Código	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
a1	51	51	52	40	38	40	25	41	38	NTE INEN 1529-10-98
a2	53	50	52	50	48	44	22	14	11	NTE INEN 1529-10-98
a3	52	50	50	33	24	31	28	28	27	NTE INEN 1529-10-98
a4	60	44	54	40	37	35	24	31	29	NTE INEN 1529-10-98
a5	41	55	57	36	29	33	25	26	26	NTE INEN 1529-10-98

Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)										
Muestra	Día 0			Día 15			Día 30			Método de ensayo
Código	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
a1	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	NTE INEN 1529-14-98
a2	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	NTE INEN 1529-14-98
a3	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	NTE INEN 1529-14-98
a4	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	NTE INEN 1529-14-98
a5	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	SD	NTE INEN 1529-14-98

Atentamente,

Ing. Marlon Castro García, Mg.

Téc. Responsable de Lab. De Tecnologías de Lacteo

Téc. Responsable de Lab. De Investigación de Alimentos



www.uleam.edu.ec

Uleam