

Artículo original

Efecto de la nisina sobre la microflora patógena del queso blanco artesanal tipo “telita” elaborado en una quesera de Upata, Estado Bolívar, Venezuela

José Gregorio Márquez^{a,*} y Carmen Elena García Rojas^b

^aCátedra de Microbiología. Escuela de Nutrición y Dietética. Universidad Central de Venezuela (UCV)

^bCentro Experimental de Recursos Autóctonos (CEDRA), Estado Vargas

Recibido 30 de abril de 2007; aceptado 10 de agosto de 2007

Resumen: Se evaluó el efecto inhibitorio de dos concentraciones de nisina (10,0 y 16,7 mg/kg) sobre la población de *Staphylococcus aureus*, coliformes totales, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes* en queso blanco tipo “telita” elaborado en una quesera de Upata, Estado Bolívar. El número de *S. aureus*, coliformes totales y *Escherichia coli* se determinó mediante la siembra en películas secas rehidratables Petrifilm 3M; siendo los recuentos de *S. aureus* significativamente menores ($p < 0,05$) en las muestras de queso “telita” con las dos concentraciones de nisina ensayadas con respecto a las muestras control. No se detectó *Salmonella* spp ni *Listeria monocytogenes* en ninguna de las muestras analizadas. Se encontró que las dos concentraciones de nisina adicionadas al queso “telita” ejercieron un efecto inhibitorio sobre la población de *S. aureus* presente como microflora contaminante en las mismas.

Palabras claves: Queso blanco artesanal, nisina, bacteriocina, *Staphylococcus aureus*

Effect of nisin over the pathogenic microflora of artisan “telita” type white cheese produced at a cheese factory in Upata, Bolivar State, Venezuela

Abstract: The inhibitory effect of two nisin concentrations (10.0 and 16.7 mg/kg) over the *Staphylococcus aureus*, total coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes* population was evaluated in “telita” type white cheese produced at a cheese factory in Upata, Bolivar State. The number of *S. aureus*, total coliforms and *Escherichia coli* was determined by inoculation in Petrifilm 3M dry rehydratable films. The *S. aureus* counts were significantly smaller ($p < 0.05$) in the “telita” cheese samples with the two nisin concentrations tested as compared with the control samples. No *Salmonella* spp or *Listeria monocytogenes* were detected in any of the samples analyzed. It was determined that the two nisin concentrations added to the “telita” cheese exerted an inhibitory effect over the *S. aureus* present in them as contaminant microflora.

Key words: artisan white cheese, nisin, bacteriocin, *Staphylococcus aureus*

* Correspondencia:
E-mail: josej25@cantv.net

Introducción

En Venezuela aproximadamente el 60 % de la producción total de leche se destina a la elaboración de quesos, y cerca de un 40 % de ésta es usada cruda en la elaboración de queso artesanal [1,2]. El queso blanco venezolano tipo “telita” es un queso de pasta cocida, único de Venezuela, elaborado exclusivamente con leche cruda de vaca, con una presentación típica y completamente artesanal, muy

consumido en el país [3]. El queso tipo “telita” elaborado en fincas y asentamientos campesinos, por pequeños productores de diferentes estados del país, es un producto alimenticio tradicional en la dieta del venezolano, y constituye un producto importante para la economía informal ya que el mismo es vendido sumergido en suero en envases plásticos tamaño cuñete a través de redes informales de distribución, este no es madurado, se consume fresco, no está protegido por ningún tipo de empaque y debido a su

tecnología, condiciones de almacenamiento y comercialización, tiene una corta vida de almacenamiento. En Venezuela la experiencia epidemiológica coloca a los quesos blancos duro, semiduro, blando, criollo, llanero, de cincho y pasteurizado, entre los vehículos que producen enfermedades alimentarias con mayor frecuencia, debido a su deficiente calidad microbiológica, siendo las asociaciones más frecuentemente encontradas las de quesos blancos artesanales con *Staphylococcus aureus* [4,5]. Varios investigadores han revelado la presencia de microorganismos patógenos como *S. aureus* enterotoxigénico, *Escherichia coli*, *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* en quesos blancos blandos elaborados con leche sin pasteurizar, como el queso tipo “telita” [5, 6, 7]. Aray estudiando la calidad microbiológica del queso blanco tipo “telita” expendido en diferentes mercados de la ciudad de Caracas, encontró altos recuentos de coliformes totales, *E. coli* y *S. aureus*; indicando que el producto presentaba una deficiente calidad microbiológica, probablemente debido a malas prácticas de higiene durante su elaboración [8]. El tiempo de vida útil del queso blanco artesanal tipo “telita” se puede prolongar con la adición de algún conservante natural como la nisina. La actividad de la nisina fue primeramente observada en 1928 y estudiada como sustancia antimicrobiana en 1944 [9]. La nisina tiene un amplio espectro de acción sobre bacterias grampositivas, es la única bacteriocina que ha recibido amplia aceptación internacional como aditivo alimentario, por lo que su empleo es permitido en más de cincuenta países, para la inhibición de *Clostridium spp* en queso, alimentos enlatados, leche pasteurizada y para controlar el crecimiento de bacterias ácidolácticas en la producción de cerveza [9-15]. La legislación venezolana permite su uso a niveles de 12,5 mg/kg en quesos madurados [16]. En Venezuela se han realizado muy pocos estudios sobre la calidad sanitaria del queso “telita” [8], y sobre el efecto de la nisina en la misma [17], lo que podría ser riesgoso para la salud pública, debido a que este tipo de queso ampliamente consumido, posee fuerte potencialidad para la transmisión de enfermedades alimentarias.

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de dos concentraciones de nisina sobre la calidad microbiológica del queso blanco venezolano tipo “telita” elaborado en una quesera piloto seleccionada para la realización de todos los trabajos de la Red de Cooperación Productiva Queso Telita.

Métodos

Preparación de las muestras de queso “telita”

Considerando las características del queso “telita”, el alto contenido de grasa, la humedad, el bajo pH, empleo del calor durante el hilado de la pasta y posibles pérdidas de la nisina en el caldero (hilado) y los sucesivos cortes de la pasta sobre el mesón de trabajo, se decidió que una de las concentraciones fuera de 16.7 mg/Kg de queso, equivalentes a 100 mg/6 Kg (peso promedio de la cuajada mas otros ingredientes) para cada lote. Esta cantidad es superior a la concentración permitida internacionalmente de

12.5 mg/Kg de queso y es de fácil manejo desde el punto de vista de la dosificación para la escala industrial. La otra concentración ensayada fue de 10,0 mg/ Kg de queso, equivalente a 60 mg/6 Kg, inferior al límite señalado. El queso “telita” de manufactura artesanal se elaboró en la quesera “Virgen del Valle” en Upata, Municipio Piar, Estado Bolívar, se empleó un sistema piloto semiautomático con una cuba de 1000 L de capacidad, el cual fue desarrollado por El Centro Experimental de Recursos Autóctonos (CEDRA) [3] con el propósito de mejorar la calidad del queso “telita”, extender su vida útil y mejorar así su comercialización, por lo que se constituyó una red de cooperación científica en Upata, Estado Bolívar, financiada por Fonacit, con apoyo logístico del FUNDACYT-Guayana. La materia prima procedió de diferentes sitios, fue analizada antes de su utilización y se les identificó como partidas de leche I, II, y III. Una vez formada la cuajada se separó en 3 lotes de 6 Kg c/u, los cuales se identificaron como A, B y C. A cada uno de estos lotes se agregó sal (4-5%), a dos de ellos se agregó nisina (Nisin E234, Chrisin, CHR HANSEN Dinamarca) como agente antimicrobiano, con una actividad comprobada. Al lote A de cada producción de quesos, se le agregó nisina a una concentración de 16,7mg/Kg, para así obtener AI, AII, AIII (serie A). Al lote B, se le agregó nisina a una concentración de 10,0 mg/Kg y se obtuvo BI, BII, BIII (serie B). El lote C sin nisina, se utilizó como control, obteniéndose CI, CII, CIII (serie C), según la partida de leche utilizada. Luego se procedió a la cocción de la pasta hasta alcanzar la textura de hilado (80-90°C), con posterior paleteo y moldeado final.

Muestreo

Se recolectaron aleatoriamente 48 muestras de queso telita sólo de las elaboradas con la partida de leche III (proveniente de una finca cercana a la quesera “Virgen del Valle”) para cada una de las series, así: 16 muestras de la serie AIII, 16 muestras de la serie BIII y 16 muestras de la serie CIII. Las muestras se tomaron inmediatamente después de la fabricación del queso telita y se transportaron en cavas con hielo para su análisis en el laboratorio después de 12-15 horas de haber sido elaborado.

Evaluación microbiológica

La preparación de la muestra para la evaluación microbiológica se realizó pesando 25 gramos de la rueda de queso telita, y homogeneizándola con 225 mL de agua peptonada (0,1 %) (DIFCO) con la ayuda de un “stomacher” (LAB BLENDER, modelo 400) se midió el pH con un potenciómetro (Fisher, modelo 325) ajustándose con NaOH 1N estéril hasta 6,9 cuando fue necesario. A partir de esta dilución (10^{-1}) se hicieron diluciones seriadas. Los análisis microbiológicos incluyeron recuentos de *Staphylococcus aureus*, coliformes totales y *E. coli* de acuerdo a la metodología descrita en BAM [18], utilizando para la cuantificación e identificación de *S. aureus* las placas Petrifilm 3M RSA, y para la cuantificación de coliformes

totales y *E. coli* las placas Petrifilm 3M para recuento de coliformes y *E. coli*. La identificación serológica de las cepas de *E. coli* aisladas se realizó con el empleo de los estuches de antiseros de FUVESIN Productos Biológicos, Instituto de Biomedicina, Caracas. La determinación de *Salmonella* spp y *L. monocytogenes* se realizó según metodología descrita en BAM [18].

Análisis estadístico

Las pruebas estadísticas realizadas se basaron en conocer si existían o no diferencias significativas entre los recuentos de los microorganismos encontrados en las muestras de queso telita sin nisina (serie CIII) y suplementadas con las dos concentraciones de nisina (serie AIII y BIII) ensayadas. Se utilizó como análisis estadístico de prueba la t de Student debido al tamaño muestral, para la comparación del log del recuento promedio con un 95 % de significancia. Adicionalmente se realizó el contraste de los recuentos de los microorganismos mediante pruebas no paramétricas (Kruskal-Wallis e índice de Friedman) con

un 95 % de confianza. El programa estadístico empleado fue el SPSS 11.0 para Windows.

Resultados

En la Tabla 1 se puede apreciar que las muestras de queso "telita" sin nisina presentaron un alto recuento de *S. aureus*, por el orden de 10^6 UFC/g, encontrándose valores por debajo de 10^4 UFC/g tanto para las muestras de queso "telita" suplementadas con 10,0 mg nisina/kg como para las que contenían 16,7 mg nisina/kg. No hubo variación en los valores de los conteos de coliformes totales (10^5 - 10^6 UFC/g) ni en los de *E. coli* (10^3 - 10^4 UFC/g) en ninguna de las muestras, con relación a esta última se encontró que de 120 cepas aisladas, el 70,8% (85) fueron identificadas con el serotipo O118, siendo el 29,1% (35) identificadas con el polivalente III (serotipo O8). Tampoco se detectó la presencia de *Salmonella* spp ni *L. monocytogenes*. La disminución de los recuentos de *S. aureus* en las muestras de queso "telita" con las dos concentraciones de nisina ensayadas evidencia la eficacia de esta bacteriocina en la inhibición del crecimiento de este microorganismo.

Tabla 1. Promedios de los recuentos (UFC/g) de microorganismos analizados en muestras de queso "telita" sin nisina y queso "telita" con 10,0 y 16,7 mg nisina/kg.

Concentración Nisina en Queso "telita"(mg/kg)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	Coliformes totales (UFC/g)	<i>Escherichia coli</i> (UFC/g)
16,7	$< 10^4$	$1,5 \times 10^5$	$6,5 \times 10^4$
10,0	$< 10^4$	$4,0 \times 10^6$	$2,6 \times 10^4$
0	$2,2 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$

Los recuentos (log media UFC/g) de *S. aureus* (Tabla 2) fue más bajo en las muestras de queso "telita" suplementadas tanto con 10,0 mg nisina/kg (4,08 log UFC/g) como con 16,7 mg nisina/kg (3,88 log UFC/g) en comparación con los obtenidos en las muestras de queso "telita" sin

nisina (6,28 log UFC/g), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). No se encontró diferencia significativa entre los promedios de los conteos de coliformes totales y *E. coli* (serotipos O118 y O8) en ninguna de las muestras de queso "telita" analizadas.

Tabla 2. recuentos (log media UFC/g) de microorganismos encontrados en queso "telita" sin nisina y queso "telita" con 10,0 y 16,7 mg nisina/kg.

Concentración Nisina en Queso "telita"(mg/kg)	<i>Staphylococcus aureus</i> (Media \pm DE)	Coliformes totales (Media \pm DE)	<i>Escherichia coli</i> (Media \pm DE)
16,7	$3,88 \pm 1,05^a$	$5,79 \pm 0,64$	$2,62 \pm 0,92$
10,0	$4,08 \pm 1,15^a$	$6,07 \pm 0,69$	$2,76 \pm 0,90$
0	$6,28 \pm 0,79^b$	$6,12 \pm 1,09$	$2,75 \pm 0,77$

DE: Desviación estándar

a, b: valores con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Discusión

Los resultados encontrados en este estudio confirman el efecto inhibitorio de la nisina sobre el crecimiento del *S. aureus* [10,15]. Cava y col [17] estudiando el efecto inhibitorio de la adición de nisina (16,7 y 10,0 mg/kg) en queso blanco tipo "telita" sobre la supervivencia de *S. aureus*, encontraron que ambas concentraciones de nisina utilizadas mostraron un efecto bacteriostático sobre el *S. aureus* a las 2 semanas de almacenamiento a 8 ± 2 °C, concluyendo que este efecto fue dependiente de la concen-

tración de nisina adicionada al producto y de la población inicial de *S. aureus* presente en el queso "telita". La reducción en los niveles de *S. aureus* en las muestras de queso telita con 10,0 y 16,7 mg nisina/kg parece estar relacionada con la fuerte actividad antiestafilocócica, ejercida por la nisina cuando se usa a niveles de 3,75-12,50 mg/kg (150-500 UI/g) en el producto terminado, como ha sido reportado por varios autores [9,19]. La nisina es una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*, que inhibe bacterias grampositivas, incluyendo el *S. aureus* y otros microorganismos patógenos, es atóxica, estable, se inactiva por las

enzimas del tracto digestivo del humano y su uso en productos lácteos es permitido en más de cincuenta países [19,20]. Los recuentos de *S. aureus* encontrados en las muestras de queso "telita" sin nisina están por encima de los límites microbiológicos ($< 10^3$ UFC/g) indicados en la norma COVENIN venezolana para quesos de pasta hilada [21], esto pudo deberse a que la partida de leche cruda III, por causas no conocidas, no se refrigeró antes de su uso, su temperatura al momento de incorporarla al proceso productivo era aproximadamente 30°C, esto probablemente incidió en los altos recuentos de *S. aureus* encontrados en las muestras de queso "telita" sin nisina. El *S. aureus* puede estar presente en productos lácteos elaborados con leche cruda sin refrigerar [6]. Los recuentos de coliformes totales y de *E. coli* (serotipos O118 y O8) encontrados en las muestras de queso "telita" sin nisina no mostraron variación alguna al compararlos con los encontrados en las muestras de queso "telita" suplementadas con las dos concentraciones de nisina ensayadas, debido al espectro antimicrobiano de la nisina, el cual es considerado estrecho al no inhibir flora gramnegativa (coliformes y *E. coli*), mohos y levaduras [9,19,20]. En el presente trabajo no se pudo asociar la ausencia de *L. monocytogenes* en ninguna de las muestras de queso "telita", con la presencia de nisina. Sin embargo, algunos autores [15-20,22] incluyen dentro del espectro antimicrobiano de la nisina una fuerte actividad antilisteria. Lauková y col. [23] encontraron que una bacteriocina, la enterocina CCM 423 disminuyó el recuento de células viables de *L. monocytogenes* y *S. aureus* inoculadas en diferentes productos lácteos.

La presencia de nisina en concentraciones de 10,0 y 16,7 mg/kg en queso blanco artesanal tipo "telita" ejerció un efecto inhibitorio sobre la población de *S. aureus*, por lo que podría ser empleado, junto con buenas prácticas de manufactura, como un agente antimicrobiano natural en este tipo de queso blanco artesanal, para inhibir el crecimiento y multiplicación de los estafilococos, y así prevenir la aparición de casos de intoxicaciones estafilocócicas, prolongando la vida útil de este tipo de queso blanco fresco.

Agradecimiento

Los autores agradecen al FONACIT por el financiamiento parcial de esta investigación (Proyecto N° 2001001864), a la Lic. Delia Pequenez del laboratorio de Enfermedades Entéricas del Instituto de Biomedicina y a la Sra. Isidra Albornoz por su apoyo en la preparación de las muestras.

Referencias

- CAVEPAS. Sistema Lácteo Venezolano. Flujo Físico 1998. Venezuela. Caracas. 1999.
- CODEX-STAN A-6. Norma General del Codex para el queso no madurado. 2001.
- CEDRA. Definición del proceso, protocolo de producción, entrenamiento y detalles técnicos del SPS Queso Telita [publicación en línea] 2001 marzo. Disponible en: URL: <http://www.Cedraweb.net/telita/index.htm>.
- Ríos M, Novoa ML. Apoyo del Departamento de Microbiología de Alimentos del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INH "RR") a la Investigación de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA). Rev Inst Nac Hig "Rafael Rangel". 1999; 30:8-13.
- Miró A, Ríos M. Calidad microbiológica de los quesos blancos venezolanos, analizados en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Período: Enero 1988 a Junio 1998. Rev Inst Nac Hig. "Rafael Rangel". 1999; 30:14-20.
- Araujo VS, Pagliares VA, Queiroz ML, Freitas-Almeida AC. Occurrence of *Staphylococcus* and Enteropathogens in Soft Cheese Commercialized in the City of Rio de Janeiro, Brazil. J Appl Microbiol 2002; 92:1172-7.
- Leuschner RG, Boughtflower MP. Laboratory-Scale Preparation of Soft Cheese Artificially Contaminated with Low Levels of *E. coli* O157, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovars *Typhimurium*, *Enteritidis* and *Dublin*. J Food Prot. 2002; 65:508-14.
- Aray C. Calidad microbiológica del queso blanco venezolano tipo "Telita". Trabajo de Especialización. Universidad Simón Bolívar. Sartenejas, Estado Miranda. 2002.
- Hurst A. Nisin. Advances in Applied Microbiology. 27. Academic Press. 1981. p. 85-123.
- Hansen N J. Nisin as a model food preservative. Crit Rev Food Sci Nutr 1994; 34 :69-93.
- De Vuyst L. Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. J Appl Bact 1995; 78: 28-33.
- Scott VN, Taylor SL. Effect of nisin on the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. J Food Sci 1981; 46: 117-20.
- Fowler GG, Mc Cann B. The growing use of nisin in the dairy industry. Aust J Dairy Tech 1971; 6: 44-6.
- Fowler GG. The potential of nisin. Food Manuf 1979; 54: 57-9.
- Delves-Broughton J. Nisin and its uses as a food preservative. Food Technol 1990; 44:100-7.
- Ministerio de Fomento. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) N° 1813:2000. Norma General de Quesos (2da revisión). Fondonorma. Caracas, Venezuela. 2000.
- Cava R, Sangronis E, Lucci E, Woyzechowsky L. Efecto de la adición de nisina en queso blanco tipo "Telita" sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus*. An Venez Nutr 2006; 19:69-73.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual (BAM) 1998, 8th edition. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Rodríguez JM. Espectro antimicrobiano, estructura, propiedades y modo de acción de la nisina, una bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*. Food Sci Technol Int. 1996; 2:61-68.
- Thomas LV, Clarkson MR, Delves-Broughton J. Nisina. En: Natural Food Antimicrobial System. Naidu A. S. eds.. Boca Ratón, Florida, USA. CRC Press, Inc 2000.
- Ministerio de Fomento. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) N° 3822: 2003 Queso de Pasta Hilada. Fondonorma. Caracas, Venezuela 2003.
- Chiu I, Skoog JA, Tatini SR, Mc Kay L. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by associative growth of nisin producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in fermented milk. J Animal Sci 1989; 67 (Suppl 1): 138-44.
- Lauková A, Czikková S, Dobránský T, Burdová O. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by enterocin CCM 4231 in milk products. Food Microbiol 1999; 16: 93-9.