



**ESTUDIO DEL EFECTO DEL USO DE COMPONENTES
NATURALES ALTERNATIVOS A LA NATAMICINA SOBRE EL
CRECIMIENTO DE MOHOS EN LA SUPERFICIE DE QUESOS,
MEDIANTE ESTUDIOS ACELERADOS.**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2015/16

Alumno: Raquel Montalvo Rochas

Tutor: Daniel Sancho Rincón

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)
Universidad de Valladolid.

Resumen

El objeto del presente estudio es analizar el efecto antifúngico de distintas inmersiones aplicadas en la superficie del queso, mediante estudios acelerados, y el posible uso de componentes naturales como alternativa a la natamicina.

El queso producido industrialmente, debe mantener unas buenas características sensoriales, físico-químicas y de inocuidad durante toda su vida útil. La aparición de moho superficial en quesos de altas maduraciones es un problema habitual y supone un rechazo del producto por parte del consumidor y pérdidas económicas a nivel industrial.

Durante el presente estudio se han realizado distintas pruebas y ensayos, con el fin de ver la eficacia en la inhibición del crecimiento y proliferación de moho en la superficie de quesos, utilizando para ello diferentes inmersiones compuestas por distintas combinaciones de sustancias antifúngicas, con compuestos naturales y alternativos a la natamicina

Palabras clave: Queso, moho, antifúngico, natamicina, recubrimientos.

Abstract

The objective of this present research is to analyse the antifungal effect, through accelerated studies of distinct immersions applied at the cheeses' surface, as well as the use of natural components as an alternative to the natamicin.

When the cheese is produced industrially, it has to keep some well sensorial and physicochemical characteristics during a few months. The apparition of a mould at the surface of the high ripening cheese involves a customer's rejection, as well as an economic loss at the global level.

In this research different tests and trials have been done, with the aim of checking the growth's inhibition and the mould's proliferation at the surface of some mixed-milk cheeses, using different compound immersions for distinct antifungal substance combinations, natural and alternative to natamycin

Keywords: cheese, mould, antifungal, natamycin, coatings.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. EL QUESO	3
1.1.1. Definición y características del queso.	3
1.2. EL MOHO. TIPOS Y CARACTERÍSTICAS	4
1.2.1. Definición y características del moho.	4
1.2.2. El moho en el queso.	5
1.3. PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL QUESO	6
1.3.1. Elaboración del queso.	6
1.3.2. Tratamiento de cortezas.	7
1.3.3. Maduración del queso.....	7
1.4. COMPUESTOS ANTÍFÚNGICOS DE USO HABITUAL EN EL QUESO.	8
1.4.1. Natamicina	8
1.4.2. Sorbato de calcio y sus sales	9
1.4.3. Extractos naturales.....	9
1.5. ANÁLISIS DE INHIBICIÓN MICROBIOLÓGICA.	10
1.5.1. Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos	10
1.6. OBJETIVO.....	11
2. MATERIALES Y MÉTODOS	12
2.1. MATERIAS PRIMAS	12
2.1.1. Queso	12
2.1.2. Recubrimientos antifúngicos.....	12
2.1.3. Material de laboratorio para siembra de moho en placas.....	13
2.2. DESCRIPCIÓN DE PRUEBAS.	13
2.2.1. Pruebas de laboratorio (inhibición microbiológica).....	13
2.2.2. Pruebas aceleradas a escala piloto.	15
2.3. DESCRIPCIÓN DE ANÁLISIS REALIZADOS	17
2.3.1. Aspecto visual de cortezas	17
2.3.2. Análisis físico-químico	17
2.3.3. Análisis Microbiológico	17
2.3.4. Contenido en Natamicina.....	17
2.3.5. Análisis Sensorial	17
2.3.6. Análisis estadístico de las pruebas de halos de inhibición	18
3. RESULTADOS	19
3.1. PRUEBAS REALIZADAS.....	19
3.1.1 Pruebas de laboratorio (inhibición microbiológica)	19
3.1.1.1 Puesta a punto del método de análisis.	19
3.1.1.2 Efecto de los distintos recubrimientos.....	20
3.1.2. Pruebas aceleradas a escala piloto.	22
3.1.2.1 Aspecto visual de cortezas (% incidencia de moho).....	22
3.1.3. Análisis físico-químico	24
3.1.4. Análisis Microbiológico	24
3.1.5. Contenido en Natamicina.....	24

3.1.6.	Análisis sensorial	25
4.	CONCLUSIONES.....	27
5.	BIBLIOGRAFÍA.....	28

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL QUESO

1.1.1. Definición y características del queso.

Según el Real Decreto 1113/2006, de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos, se entiende por queso el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido de la leche, de la leche total o parcialmente desnatada, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos, coagulados total o parcialmente por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, antes de desuerado o después de la eliminación parcial de la parte acuosa, con o sin hidrólisis previa de la lactosa, siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche.

La maduración del queso, según el Real Decreto 1113/2006, consiste en mantenerlo durante un cierto tiempo a una temperatura y en condiciones tales que se produzcan cambios físicos y químicos característicos del mismo. Según el grado de maduración alcanzado a la salida de la fábrica, podemos clasificar los quesos de la siguiente manera (RD 1113/2006)

- **Tabla nº1:** Tiempo mínimo de maduración dependiendo de la denominación según RD1113/2006

DENOMINACIÓN	Tiempo mínimo de maduración (días)	
	≥ 1,5 kg	≤ 1,5 kg
Fresco	0	0
Tierno	7	7
Semicurado	35	20
Curado	105	45
Viejo	180	100
Añejo	270	-

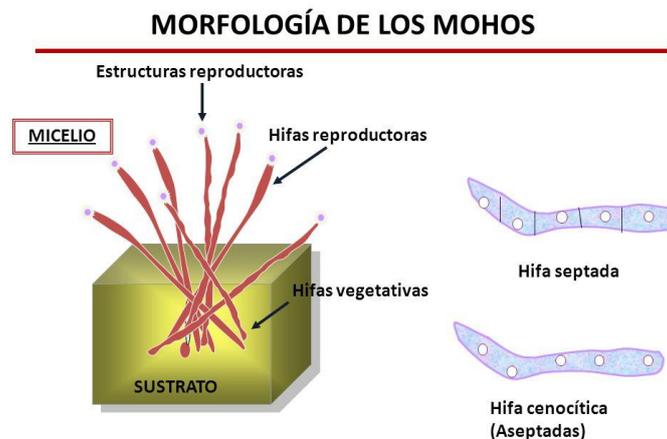
El queso fresco es el que está dispuesto para el consumo al finalizar el proceso de fabricación. La palabra madurado podrá sustituirse por los calificativos indicados en la tabla 1, según el grado de maduración alcanzado por el producto a la salida de fábrica.

1.2. EL MOHO. TIPOS Y CARACTERÍSTICAS

1.2.1. Definición y características del moho.

Los hongos son organismos microscópicos del reino *Fungi*. Están desprovistos de clorofila, por lo que son heterótrofos. El término moho se suele aplicar para designar a ciertos hongos filamentosos multicelulares cuyo crecimiento en la superficie de los alimentos se suele reconocer fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso.

La parte principal de su crecimiento suele tener un aspecto blanco, aunque también puede tener color oscuro, color a humo... La morfología de los mohos, es decir, forma y estructura, se utiliza para identificarlos y clasificarlos. El moho está formado por un entramado filamentosos llamado micelio. Este se compone de filamentos individuales llamados hifas. Pueden crecer sumergidos en el alimento o superficialmente, en cuyo caso el crecimiento se caracteriza por aspecto vellosos o algodonoso. Las hifas, fabrican enzimas que descomponen las moléculas. Y se clasifican en vegetativas, cuya misión fundamental es la incorporación de nutrientes y fértiles, que poseen las estructuras reproductoras en soportes aéreos.



➤ **Imagen 1:** Representación esquemática de moho con crecimiento micelar.

La reproducción de los mohos tiene lugar principalmente por esporas asexuales, pero también puede ocurrir por esporas sexuales. Las esporas asexuales, cuya función es propagar la especie, se producen en gran número y son pequeñas, ligeras y resistentes a la desecación. Por lo tanto, son fácilmente dispersables en el aire y cuando llegan a un material nutritivo conveniente, bajo condiciones favorables dan lugar a crecimientos fúngicos nuevos. (Hayes et al; 1993)

1.2.2. El moho en el queso.

El crecimiento fúngico en la superficie de los quesos durante los largos periodos de maduración es un problema habitual en este sector, dando lugar a la aparición de manchas coloreadas en la superficie (Imagen 2), ocasionando olores y sabores indeseables y cambios en la textura, que provocan una pérdida de calidad sensorial significativa.

Generalmente todo alimento enmohecido se considera no apto para consumo humano. Si bien es cierto, que algunos mohos son útiles en la elaboración de ciertos alimentos. Así algunos tipos de quesos son madurados por mohos, como por ejemplo el queso azul, el Roquefort, el de Camembert o el queso Brie. (Fraizer et al;1993)

El desarrollo de mohosidad sobre los quesos almacenados en cámaras y/o secaderos se produce, principalmente, debido a la presencia de mohos y esporas en el ambiente de las cámaras en las que se encuentran durante la fase de maduración. Principalmente los mohos y sus esporas se transportan a través del aire hasta la superficie del producto, rica en nutrientes y con una actividad de agua adecuada que favorece el desarrollo de los diferentes hongos, proliferando con facilidad, llegando a observarse de forma visible sobre el producto.(Eck et al; 1990).



➤ **Imagen 2:** Crecimiento de moho en superficie de queso

Los géneros principales de hongos causantes de la contaminación fúngica son: *Rhizopus*, *Cladosporium sp.*, *Geotrichum sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, con las siguientes características:

- No son patógenos ni tóxicos, es decir no son un riesgo para la seguridad alimentaria.

- Son capaces de crecer y desarrollarse porque tienen en la superficie del queso las condiciones necesarias (nutrientes, humedad, aire...)
- No producen sustancias que afecten a otros microorganismos o al desarrollo normal del proceso de fermentación del queso.
- Durante su desarrollo, segregan sustancias que aportan al producto sabores y aromas característicos, de ahí que cumplan un papel importantísimo en el afinado o maduración de los quesos. Es por ello que existen variedades de queso en las que se persigue su crecimiento, como son el *Penicillium Camemberti*, *Penicillium Roqueforti* ó *Geotrichum Candidum*.(El Blog de la Antigua; 2011)

1.3. PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL QUESO

1.3.1. **Elaboración del queso.**

Los quesos en Queserías Entrepinares, se elaboran a partir de leche pasteurizada, mezcla de leche de vaca, oveja y cabra, cuajo y sal. El proceso comienza con la recepción de la leche cruda y la pasteurización de la misma.

Tras la pasteurización la leche es almacenada en cubas. La coagulación se realiza en las cubas de cuajado, para lo cual se adiciona a la leche la enzima coagulante quimosina, en proporciones adecuadas. También se adicionan sales de calcio y flora láctica, para el perfecto desarrollo del proceso. Las sales de calcio son indispensables para cuajar la leche pasteurizada, si no la cuajada no tendría la consistencia necesaria para poder trabajar con ella. La función principal de las bacterias lácticas es la producción de ácido láctico mediante fermentación de la lactosa. El ácido láctico promueve la formación y desuerado de la cuajada. El coágulo resultante se corta mediante cuchillas, en porciones adecuadas para favorecer la eliminación del suero. A continuación, se produce el desuerado de la cuajada, es decir, se separa el suero o parte líquida de la cuajada o parte sólida.

Después del proceso realizado en la cuba, se produce el llenado de los moldes con la cuajada resultante y se realiza un prensado de forma gradual para facilitar la salida de suero y la compactación de la cuajada.

Tras desmoldear las piezas de queso, éstas se transportan hasta la salmuera. El salado en salmuera tiene como fin dar consistencia a la corteza, continuar con la expulsión del suero y provocar una concentración adecuada de la sal en el queso.

1.3.2. Tratamiento de cortezas.

Los quesos, que van a ser sometidos a largos periodos de maduración, pasan por un baño antifúngico. Mediante un proceso de inmersión, se aplica un producto con compuestos activos frente al crecimiento de mohos y levaduras. Posteriormente a la aplicación del antifúngico el queso se paletiza y pasa a cámara de maduración

1.3.3. Maduración del queso

La maduración es la parte final del proceso propiamente dicho de fabricación, donde el producto sigue evolucionando bajo unas condiciones controladas de humedad y temperatura, para así alcanzar los parámetros de apariencia, textura y sabor deseados, mediante el trabajo de los fermentos, los metabolismos de las grasas y proteínas y el intercambio de humedad.

Las cámaras de maduración deben tener muy controladas la humedad y temperatura, para tener las condiciones más adecuadas y ventajosas, y obtener un proceso de maduración aceptable tanto en el tiempo como en el desarrollo de los valores organolépticos del queso

La temperatura no debe ser elevada, ya que ésta afecta a los tiempos de generación de microorganismos según su fase de crecimiento y a las reacciones químicas de la cuajada. En general, las bajas temperaturas retrasan el crecimiento bacteriano y todas las reacciones bioquímicas que ocurren en la cuajada, normalmente se utilizan para quesos de larga maduración elaborados con leche cruda. Mientras que temperaturas más altas aceleran tales actividades. La humedad también debe ser controlada, ya que ésta contribuye al posterior control del nivel de humedad en el queso. (Robinson et al; 2010). Una cámara muy seca (por debajo del 70%) va a dar lugar a un queso muy duro, sobre todo si es de larga maduración. Un queso muy mantecoso precisará una humedad alta (por encima del 90%) para evitar que se seque.

Debido a las características del queso (alta humedad y acidez elevada) y las condiciones ambientales de las cámaras de maduración, durante el proceso de maduración se puede producir crecimiento de moho en la superficie de los quesos, haciéndose visible tras largos periodos de permanencia en dichas cámaras.

1.4. COMPUESTOS ANTÍFÚNGICOS DE USO HABITUAL EN EL QUESO.

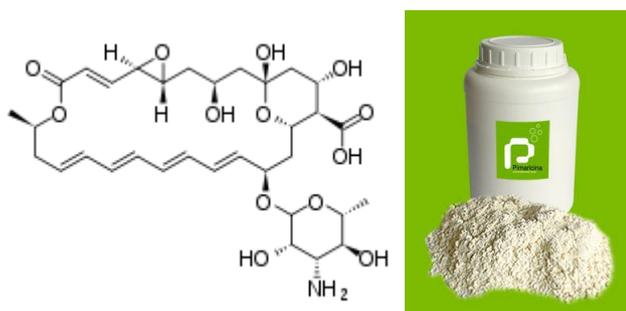
Determinados compuestos químicos se comportan como micostáticos, inhiben el crecimiento de los mohos (ejemplos de éstos compuestos son el ácido sórbico, los propionatos o los acetatos) o son específicamente fungicidas por destruirlos. (Frazier et al; 1993)

1.4.1. Natamicina

Este compuesto se lleva utilizando unos 30 años para prolongar el tiempo de vida útil de diferentes alimentos, entre los que se encuentra el queso, mediante la eliminación de levadura y mohos y la inhibición de la proliferación de micotoxinas debido a sus propiedades antifúngicas (*Codex alimentarius*, 2000). La natamicina o pimaricina es un conservante de alimentos aprobado y utilizado en más de 150 países.

En el reglamento europeo sobre los aditivos alimentarios, este inhibidor de moho se cataloga como un conservante (E-235) para el tratamiento de la superficie de quesos duros, semiduros y semiblandos, y de embutidos secados y curados. (<http://www.natamycin.com/es/regulatory>)

La natamicina se es un polieno macrólido antimicótico con propiedades fungicidas. Es eficaz contra las levaduras y los mohos por contacto y a dosis muy bajas (3-10 ppm), y también inhibe la proliferación de micotoxinas. Pero no tiene efectos sobre las bacterias. Tiene forma cristalina, por lo cual es un compuesto muy estable, tiene una masa molecular de 665,725 g/mol y su fórmula molecular es C₃₃H₄₇NO₁₃ (*Codex alimentarius* 2000 y EFSA, 2009:7(12):1412).



➤ **Imagen 3:** Fórmula química y apariencia de la natamicina

La producción industrial de la natamicina se produce por fermentación utilizando *Streptomyces natalensis* o *Streptomyces gilvosporeus*. Dado que sólo es ligeramente soluble en sistemas, tiende a permanecer en la superficie de los alimentos donde se aplica y es por tanto muy eficaz para prevenir la proliferación de levaduras y mohos en dichas superficies. (*Codex alimentarius*)

En el queso, la natamicina puede aplicarse a la superficie mediante rociado o baño con una suspensión acuosa, o aplicarse como parte del recubrimiento del queso con una emulsión.

Los límites legales del compuesto son: 1 mg/dm² en la superficie del queso y ausencia a una profundidad de 5mm. En este último, como marca la norma internacional ISO-9233-2:2007, el análisis consiste en analizar el contenido en natamicina en una capa de 5 mm de grosor desde el exterior hacia el interior de la pieza. (RE CE 2015/647)

1.4.2. Sorbato de calcio y sus sales

El ácido sórbico es un ácido graso de cadena lineal insaturado presente de forma natural en algunos vegetales, y fabricado para su uso en la industria alimentaria por síntesis química por polimerización del aldehído acético o a partir del ácido malónico. Puede estar presente en forma de ácido sórbico o en sus sales, sorbato cálcico, sorbato potásico y sorbato de sodio (Villalta et al., 1998).

Los sorbatos son agentes antimicrobianos y antifúngicos capaces de retrasar o prevenir el desarrollo de microorganismos como las levaduras y el moho principalmente y las bacterias aerobias gracias a la reducción del agua y el aumento de la acidez (Burdock et al; 1997). El sorbato sólo es fungistático, de manera que al reducirse la concentración en superficie, todos los mohos presentes empezarán a reproducirse.

Estos compuestos se encuentran dentro de la lista positiva de aditivos de uso alimentario con los siguientes números E: Sorbato de calcio (E-203) y sorbato potásico(E-202).

1.4.3. Extractos naturales

Los extractos vegetales forman una parte muy importante en la agroecología, ya que estos benefician al medio ambiente combatiendo organismos fitopatógenos sin recurrir a agentes químicos.

Existen varios reportes en la literatura donde se registran plantas con actividad fungicida, como es el caso de *Allium sativum*, el cual contiene como compuesto activo aliína, un aminoácido sulfurado. El aceite esencial de hoja de orégano, presenta fenoles timol y carvacol que son los principales componentes que le confieren poder antibacteriano y antifúngico. El aceite esencial de hojas de limón (*Cymbopogon citratus*) presentó actividad antifúngica en ensayos realizados *in vitro*. Los extractos de

tomillo (*Thymus vulgaris*) y romero (*Rosmarinus officinalis*) son interesantes desde el punto de vista de la inhibición de hongos. (Lizcano et al; 2007) y contribuyen al aporte de aromas característicos en los alimentos, incluido el queso

Los compuestos extraídos de los tejidos vegetales, los extractos vegetales, logran interactuar en las partes vitales de las células microbianas, limitan su fuente de energía, intervienen en sus reacciones enzimáticas y saturan su membrana celular hasta colapsarla y causarle de esta forma la muerte (Cristóbal et al; 2010),.

El uso de extractos vegetales como inhibidores del desarrollo de microorganismos patógenos en combinación con recubrimientos de uso alimentario es una alternativa a la conservación de alimentos.

1.5. ANÁLISIS DE INHIBICIÓN MICROBIOLÓGICA.

1.5.1. Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos

La lectura interpretada del antibiograma es una práctica habitual en el laboratorio de microbiología como complemento de la interpretación o de la categorización clínica de los resultados de sensibilidad. Es de uso extendido en los laboratorios de microbiología clínica. Y una herramienta imprescindible para establecer medidas epidemiológicas, adecuación de los tratamientos médicos y aplicación de políticas de antimicrobianos. (Cantón et al; 2010))

Las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos tienen como objetivo conocer si los microorganismos ensayados son sensibles o resistentes a los antimicrobianos, pudiendo servir para elegir de forma óptima y rápida un tratamiento antimicrobiano efectivo. (Cercenado et al; 2009)

La sensibilidad antimicrobiana puede evaluarse mediante los halos de inhibición. El halo de inhibición se conoce como la zona alrededor de un “disco” de antibiótico en un antibiograma en la que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen. Es una medida de la potencia del antibiótico frente al germen (*Galiano et al; 2010*) El antibiograma es un método in vitro que determina la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos específicos y estandarizado.

Una vez completado el proceso de inoculación, la placa se coloca en estufa de cultivo, y comienza por un lado el crecimiento del microorganismo y por otro la difusión del antibiótico. Esto da lugar a que a una determinada distancia del “disco” la dilución con el antimicrobiano no alcance a inhibir el crecimiento del microorganismo y se forme un

halo de inhibición circular. Cuyo diámetro será directamente proporcional al poder antimicrobiano de la solución. (Ramos; et al 2014)

En la realización del presente estudio, no se ha encontrado bibliografía referente al uso de ésta técnica en el sector de la alimentación. No se tienen referencias, por tanto, del uso de la técnica de halos de inhibición en la posible efectividad de compuestos antifúngicos sobre el crecimiento de mohos en la superficie de queso. En cualquier caso, el interés que esta técnica tiene en el campo de los ensayos clínicos se puede trasladar al campo de la industria alimentaria y concretamente de la industria quesera, donde la microbiología tiene también un papel fundamental.

Utilizando la técnica de halos de inhibición, se puede realizar un estudio de la sensibilidad a distintos antifúngicos de los mohos de interés. Los resultados obtenidos, podrían servir al técnico en la mejor elección del tratamiento antifúngico. Con los resultados obtenidos “in vitro” se intenta predecir la eficacia “in vivo”.



➤ **Imagen 4:** Halos de inhibición en placa con agar sembrada.

1.6. OBJETIVO

El objetivo principal del presente estudio es evaluar la efectividad de diferentes compuestos antifúngicos, sobre la superficie de quesos mezcla semicurados. Se comprobará el efecto del uso de componentes naturales alternativos a la natamicina sobre el crecimiento de moho en la superficie de quesos.

Además, se ensayarán nuevas metodologías de estudios acelerados para obtener resultados rápidos en la selección del compuesto idóneo, a nivel de laboratorio mediante la técnica de halos de inhibición y a nivel piloto forzando las condiciones de maduración.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En los siguientes apartados se muestra una relación y descripción de los materiales y métodos utilizados para la realización del presente estudio.

2.1. MATERIAS PRIMAS

2.1.1. Queso

Para la realización de las diferentes pruebas se ha partido de queso de pasta prensada de 3 kg de peso aproximadamente, elaborados a partir de leche mezcla de vaca, oveja y cabra pasteurizadas, cuajo y sal.

2.1.2. Recubrimientos antifúngicos

Los recubrimientos antifúngicos utilizados sobre los quesos, durante el estudio son los siguientes:

- Recubrimiento antifúngico utilizado habitualmente en Entrepinares, al que denominaremos **EN** (contiene natamicina)
- Recubrimiento antifúngico de prueba nº1, al que denominaremos **N** (contiene natamicina)
- Recubrimiento antifúngico de prueba nº2, al que denominaremos **AG-N** (contiene natamicina y ácidos grasos naturales)
- Recubrimiento antifúngico de prueba nº3, al que denominaremos **AG** (contiene ácidos grasos naturales, no contiene natamicina)
- Recubrimiento antifúngico de prueba nº4, al que denominaremos **Gel AG**. (contiene ácidos grasos naturales, está hecho sobre base no plástica, no contiene natamicina)

A continuación se muestra una tabla resumen elaborada a partir de las fichas técnicas de los productos, donde figuran composiciones de cada uno de los recubrimientos:

Tabla nº2: Composición de los distintos antifúngicos utilizados.

ANTIFÚNGICO /COMPUESTO		Acetato de polivinilo	Goma xantana	Ác. grasos naturales	Natamicina (ppm)	Sorbatos	Ác.sórbico
Testigo	EN	si	no	no	si	si	no
Nº1	N	si	no	no	si	si	si
Nº2	AG -N	si	no	si	si	no	no
Nº3	AG	si	no	si	no	no	no
Nº4	Gel AG	no	si	si	no	no	no

2.1.3. Material de laboratorio para siembra de moho en placas

Para la realización de los ensayos de halos de inhibición, se utiliza material de laboratorio para siembra de placas. Torundas estériles, placas con agar de rosa de bengala, solución salina estéril en tubo de ensayo (2-3 ml), mechero de Bunsen, micropipeta, estufa para incubación y agitador vórtex.



➤ **Imagen 5:** Material para siembra de placas.

2.2. DESCRIPCIÓN DE PRUEBAS.

2.2.1. Pruebas de laboratorio (inhibición microbiológica)

Tras los ensayos de establecimiento del método de análisis, que se explican posteriormente, el procedimiento que finalmente se decide seguir para la siembra de moho en placa, es el siguiente:

1. Hacer pequeños círculos con una torunda en la superficie del queso con moho superficial, hasta conseguir que el moho quede adherido a la torunda.
2. Siempre cerca de la llama del mechero, se hace una dilución simple, introduciendo la torunda con moho en un tubo con una solución salina (2-3 ml) y se agita con vórtex hasta que la solución coja el color verdoso característico del moho seleccionado.



➤ **Imagen 6:** Toma de moho superficial con torunda y dilución en tubo de ensayo

3. Para la siembra en placa, tomamos una torunda limpia, la impregnamos en la solución y hacemos la siembra directa en placa. Siempre cerca de la llama, se va girando y moviendo la torunda mientras se frota suavemente con movimiento de zig-zag sobre el medio. Realizar el zig – zag en tres veces, rotar la placa 45° entre ellas.
4. Activamos el crecimiento introduciendo las placas en estufa, 23°C durante una hora.
5. Con pipeta tomar una cantidad de producto antifúngico y depositar 100μL en el medio de la placa.



➤ **Imagen 7:** Deposición del antifúngico en placa sembrada

6. Tras 5 días de incubación, se mide el diámetro del halo generado en las distintas placas.

Para la toma de muestras de moho y posterior siembra en placa, se seleccionaron 4 unidades de quesos de un lote concreto, con apariencia fúngica exterior semejante, blanco-verdoso, de queso mezcla pasteurizado, con un periodo de maduración de 75-105 días, etapa en la que el crecimiento del moho está en su fase exponencial – estacionaria, para así favorecer su crecimiento en el agar.

Para puesta a punto de la prueba de halos de inhibición se diseña el siguiente plan de ensayos:

Tabla nº3: Plan de ensayos para la puesta a punto técnica halos inhibición.

Prueba	Nº analistas	Nº placas	Objeto de ensayos
Establecimiento del método de análisis	3	9	Establecimiento del método de análisis
DÍA 1º	1	20	Repetitividad
DIA 2º	1	20	
DÍA 3º	1	20	

- 1) Establecimiento del método de análisis. Para estandarizar el procedimiento de siembra de placas. Tres analistas distintos realizarán la siembra, 3 placas por analista. Se comprobarán los resultados.
- 2) Ensayos de repetitividad: día 1º, día 2º y día 3º. Tras el establecimiento del método de análisis realizado por 3 analistas, uno de los analistas realizará los ensayos de repetitividad. De este modo se eliminan las variables asociadas “al analista” y será más fácil obtener conclusiones sobre qué tipo de antifúngico es el más efectivo y si el método es repetitivo. Cada uno de los 3 días propuestos, se sembrarán varias placas para cada tipo de antifúngico y se realizará una comparativa entre los resultados obtenidos.

2.2.2. Pruebas aceleradas a escala piloto.

Los recubrimientos antifúngicos se usan como primera capa protectora de los quesos para prevenir la proliferación y el crecimiento de moho. Se aplican por inmersión mediante baño antifúngico antes de que los quesos pasen al proceso de maduración en cámara.

Se han utilizado 432 unidades de quesos de pasta prensada de 3 kg de peso aproximadamente, elaborados a partir de leche mezcla de vaca, oveja y cabra pasteurizadas, cuajo y sal, sin maduración a fecha de la inmersión en el antifúngico.

Las pruebas aceleradas a escala piloto por inmersión de los distintos antifúngicos de estudio, siguen el siguiente proceso:

- Dar un baño manual a las piezas de queso consideradas para la prueba, con el fin de que queden cubiertas de una capa del recubrimiento antifúngico de interés.
- Una vez bañadas las piezas de queso, éstas se colocarán en palés en el orden preestablecido y bien identificadas.

- Se procederá al flejado de 2 de los 3 palés con film transparente. Con el flejado se favorecen las condiciones ambientales para la proliferación de mohos en la superficie de los quesos. Se aumenta la humedad en el ambiente que está en contacto con el queso y además evita la pérdida de humedad propia del queso, lo que facilita y acelera el crecimiento de mohos superficiales, por la disponibilidad de aw que tienen éstos.

Tabla nº4: Formación y distribución de los palés pruebas aceleradas piloto.

DISTRIBUCIÓN POR PALÉS Y TIPO DE INMERSIÓN DE ANTIMOHO PRUEBA PILOTO ACELERADA.				
	TIPO DE INMERSIÓN	Nº CAJAS EN PALÉ	Nº QUESOS EN PALÉ	Observaciones
Palé 1	EN	4	24	*Se deja un queso sin aplicación en cada caja. Se fleja el palé
	N	5	30	
	AG N	5	30	
	AG	5	30	
	Gel AG	5	30	
Palé 2	EN	4	24	*Se deja un queso sin aplicación en cada caja. No se fleja el palé.
	N	5	30	
	AG N	5	30	
	AG	5	30	
	Gel AG	5	30	
Palé 3	EN	12	72	*Se pintan todos los quesos. Se fleja el palé.
	N	3	18	
	AG N	4	24	
	AG	1	6	
	Gel AG	4	24	
TOTAL UDS. POR CADA TIPO DE INMERSIÓN				
EN	120	AG	66	
N	78	Gel AG	84	
AG N	84	TOTAL	432	



➤ **Imagen 8:** Baño manual de antifúngico y flejado de palé.

2.3. DESCRIPCIÓN DE ANÁLISIS REALIZADOS

En este apartado se van a describir todos los análisis y seguimientos realizados en el presente estudio.

2.3.1. Aspecto visual de cortezas

Sobre los 3 palés de quesos en los que han sido aplicados los diferentes antifúngicos, se plantean 2 revisiones visuales de moho a la semana, hasta que exista desarrollo de moho en la superficie del queso, en todos los casos. La revisión visual de los quesos se realiza para obtener datos porcentuales en cuanto a la incidencia de moho con cada tipo de antifúngico estudiado, una vez aplicado en los quesos por inmersión.

2.3.2. Análisis físico-químico

Se realizan análisis de composición (materia grasa, extracto seco y sal) y pH en los quesos de las pruebas piloto, inicialmente en el momento de la aplicación y a los 15 días de maduración. Todos los procedimientos experimentales de las técnicas utilizadas son los empleados por Queserías Entrepinares.

2.3.3. Análisis Microbiológico

En pruebas aceleradas piloto se realiza recuento de mohos en el momento de la aplicación del antifúngico y a los 15 días de la aplicación.

2.3.4. Contenido en Natamicina

Se analiza el contenido en natamicina a los 15 días de la aplicación del antifúngico, para comprobar que se encuentra dentro de los límites legales. Este análisis se realiza en laboratorio externo mediante HPLC y siguiendo el procedimiento que marca la norma internacional ISO-9233-2:2007

2.3.5. Análisis Sensorial

Se plantea un análisis sensorial para descartar posibles interferencias del antifúngico en el perfil sensorial del queso. El análisis sensorial mediante panel de cata, se realizará a los 15 días de maduración de los quesos tras la aplicación de los antifúngicos.

La empresa Entrepinares tiene su propio panel de catadores entrenados y semientrenados que prueban y catan los productos y obtienen las características del queso. El panel puede realizar dos tipos de catas, las catas descriptivas, con el objeto de describir el perfil organoléptico del producto. Y las catas triangulares, discriminativas, para detectar si hay diferencias con respecto a un estándar. Entrepinares cuenta con una sala propia para realizar las catas. La cual dispone del

material y los equipos necesarios para la realización de la cata, cubículos y lámparas individuales, climatización, lámparas individuales, frigorífico....

En el presente estudio se realiza un análisis descriptivo, con 6 catadores conocedores del producto.

2.3.6. **Análisis estadístico de las pruebas de halos de inhibición**

Se realizará un análisis estadístico en los ensayos de halos de inhibición realizados en laboratorio. Dentro de la puesta a punto del método, se evaluará la repetitividad mediante un análisis de varianza ó ANOVA (comparación de múltiples poblaciones), con un p-value <0.05, entre los distintos días de análisis.

El efecto del tipo de recubrimiento antifúngico sobre la inhibición del crecimiento de moho, se evaluó mediante el cálculo de media \pm la desviación estándar.

3. RESULTADOS

En los siguientes apartados se detallan y explican los resultados obtenidos, tanto en las pruebas realizadas como en los análisis efectuados. Así como cualquier incidencia que hubiera surgido durante la realización de las pruebas y análisis.

3.1. PRUEBAS REALIZADAS

3.1.1 Pruebas de laboratorio (inhibición microbiológica)

3.1.1.1 Puesta a punto del método de análisis.

A. **Establecimiento del método de análisis.** A continuación se muestra una tabla que recoge los resultados obtenidos por los 3 analistas en la estandarización y definición del método de siembra. Se muestra el número de placas sembradas por cada analista y el diámetro del halo de inhibición generado por cada tipo de solución antifúngica.

Tabla nº5: Resultados del establecimiento del método de análisis.

ESTABLECIMIENTO DEL MÉTODO DE ANÁLISIS				
Analista	Placa	Antimoho	Diámetro del halo (cm)	Imagen
1	1	EN	2,5	
	2	N	2,4	
		AG-N	2,5	
	3	AG	2	
		Gel AG	2	
2	1	EN	2,7	
	2	N	2,4	
		AG-N	2,5	
	3	AG	2,4	
		Gel AG	0	
3	1	EN	3,5	
	2	N	2,5	
		AG-N	2,5	
	3	AG	2,3	
		Gel AG	1,9	

Como se ve en la tabla, cada analista siembra 3 placas. En una 1ª placa se prueba el antimoho tipo EN, resultando un halo de inhibición en la misma. En una 2ª placa se prueban los antimohos tipos N y AG -N, resultando dos halos de inhibición en la placa. Y en una 3ª placa se prueban los antimohos tipo AG y Gel AG, resultando también dos halos de inhibición en la placa.

B. **Evaluación de la repetitividad.** Para la valoración de la repetitividad, se contemplarán los diámetros de los halos de inhibición pertenecientes a placas de siembra por separado. Es decir, las placas en las que se probaron todos los antifúngicos simultáneamente no se tendrán en cuenta. En ellas se han generado 5 halos de inhibición, uno por cada tipo de antifúngico, lo que ha supuesto que en ocasiones se solapasen los halos dificultando o imposibilitando su medición. Además posibles influencias o sinérgias intra-placa podrían influir en el desarrollo de los halos de inhibición.

El resultado del análisis de varianza con un p-value <0.05, entre los distintos días de análisis se muestra en la siguiente tabla nº6:

Tabla nº6: Resultados del ANOVA, para el factor día.

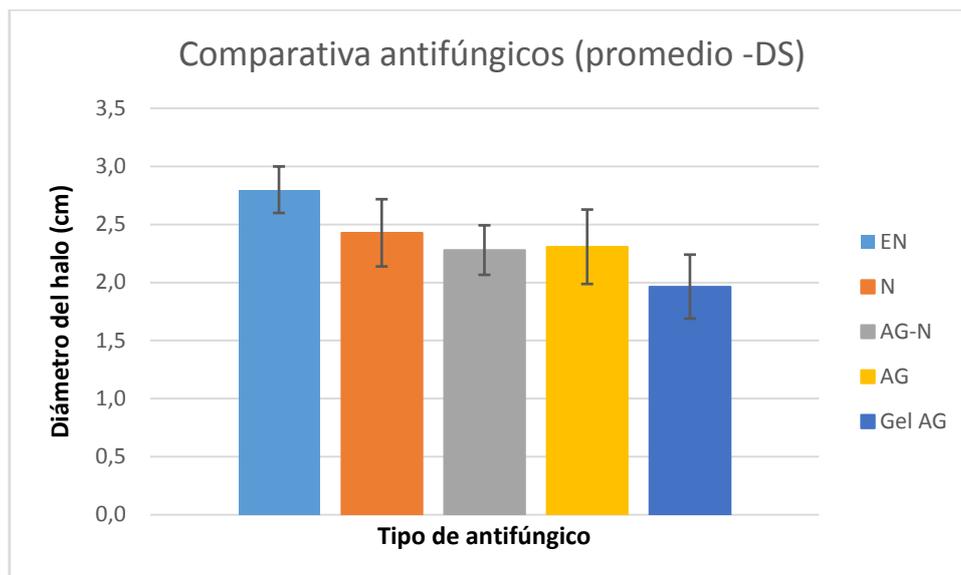
P valor=0,05			
Antifúngico	Probabilidad	Diferencias	Repetitivo
EN	0,066335575	NO	SI
N	0,0034287	SI	NO
AG-N	0,001118906	SI	NO
AG	0,0308106	SI	NO
Gel AG	0,520400336	NO	SI

En los ensayos realizados, se observa como el factor "día" (Variable independiente) ejerce en el 60% de los casos efecto estadísticamente significativo sobre la variable dependiente "Diámetro del halo de inhibición" cuando el nivel de confianza es del 95% (p=0,05).

El 40% de los ensayos muestran repetitividad del método, frente al 60% que no muestran esa repetitividad. Por lo que el método no es repetitivo (**se muestra en anexos el análisis de varianza completo*)

3.1.1.2 Efecto de los distintos recubrimientos

Los resultados del efecto antifúngico generado se muestran en la gráfica nº1. En ella se comparan las medias del diámetro de los halos de inhibición generados por los distintos antifúngicos, en las 3 sesiones de pruebas. Además se muestra también, la desviación estándar. El resultado es el siguiente:



➤ **Gráfica nº1:** Comparativa del efecto de los distintos recubrimientos.

Si atendemos a las líneas de desviación estándar y el solape que existe entre ellas, podemos definir si existen diferencias significativas entre los distintos recubrimientos antifúngicos. En la siguiente tabla se muestran los resultados de la comparativa de todos los recubrimientos entre sí y se indica si hay o no diferencia.

Tabla nº7: Evaluación de diferencias significativas entre los recubrimientos.

	EN	N	AG-N	AG	Gel AG
EN		No	Si	No	Si
N			No	No	No
AG-N				No	No
AG					No
Gel AG					

Si atendemos a los resultados de las 3 sesiones de ensayos por separado, en todas ellas el promedio del diámetro del halo de inhibición generado es mayor en el antifúngico testigo EN, por lo que es el que mayor protección antifúngica presenta. Seguido, también en todas las sesiones, del antifúngico N. El que menor promedio tiene, en todas las sesiones es el antifúngico Gel AG. Los antifúngicos AG-N y AG generan un halo de inhibición similar en cada una de las sesiones. Se observa la misma tendencia en las 3 sesiones realizadas. (*se adjuntan resultados en anexos)

En la tabla nº8 se relacionan los elementos que componen cada recubrimiento, con el diámetro medio del halo de inhibición generado, donde se pueden observar 3 categorías de antifúngicos.. De forma general, los antifúngicos que contienen natamicina y sorbatos presentan “in vitro” la mejor protección antifúngica. (categoría I). Los antifúngicos que contienen ácidos grasos y que carecen de natamicina y/o sorbatos presentan peor protección antifúngica “in vitro” (categoría II y III)

Tabla nº8: Categorías de antifúngicos según halo de inhibición generado.

CATEGORÍA /ANTIFÚNGICO	NATAMICINA	SORBATOS	ACETATO POLIVINILO	ÁCIDOS GRASOS	Diámetro medio de halo
I	EN	SI	SI	NO	2,8
	N	SI	SI	NO	2,4
II	AG-N	SI	NO	SI	2,3
	AG	NO	NO	SI	2,3
III	Gel AG	NO	NO	SI	2

3.1.2. Pruebas aceleradas a escala piloto.

3.1.2.1 Aspecto visual de cortezas (% incidencia de moho)

La aparición de moho en la superficie de los quesos se detecta a partir del día 28. La última revisión visual se realiza 40 días después de la aplicación de los recubrimientos antifúngicos. Hasta esa fecha, 2 revisiones visuales semanales se han realizado. El histórico de resultados no se detalla, ya que no aporta información relevante al estudio. En la Tabla nº9 se recogen los resultados:

Tabla nº9: Incidencia de moho en corteza (%) en quesos a los 40 días.

Muestra	Sin Enfardar (% incidencia moho)	Enfardado 1 (% incidencia moho)	Enfardado 2 (% incidencia moho)
EN	79	100	93
N	0	0	0
AG-N	0	21	0
AG	0	0	17
Gel AG	0	0	0

Se observa que el enfardado de palés acelera el crecimiento de mohos, al comenzarse a ver crecimiento en muestras que sin enfardar no se detectaba. Todos los nuevos recubrimientos son más efectivos que el recubrimiento actual EN.

Con el enfardado de los palés se fuerzan las condiciones para que se origine crecimiento de moho en la superficie de los quesos. Lo que supone una optimización del tiempo en la búsqueda de resultados y permite además una comparativa de resultados en ambas condiciones. En los palés enfardados el moho comienza a aparecer a los 28 días de la aplicación de la inmersión.

Si hacemos una tabla, que relacione los elementos que componen cada recubrimiento, ésta vez con el % de incidencia de moho en quesos de los palés enfardados, las categorías que salen son diferentes con respecto a las de la prueba de halos de inhibición. No hay relación directa entre la protección que presentan y el contenido en natamicina. Al contrario que en el ensayo "in vitro", uno de los antifúngicos que mayor protección presenta en las pruebas aceleradas piloto es el Gel AG. No contiene natamicina, ni sorbatos, su base no es plástica y contiene ácidos grasos. Y el que menor el antifúngico EN. De este hecho se deducen dos cosas:

- existe sinergia de estos componentes con el sustrato "queso" que hacen que la protección aumente significativamente.
- las condiciones de laboratorio en la siembra de las placas con moho, no es un medio representativo del sustrato real o del sustrato "queso".

Tabla nº10: Categorías de antifúngicos según % incidencia de moho

CATEGORÍA /ANTIFÚNGICO	NATAMICINA	SORBATOS	ACETATO POLIVINILO	ÁCIDOS GRASOS	% incidencia		
					Enfardado 1	Enfardado 2	
I	N	SI	SI	SI	NO	0	0
	Gel AG	NO	NO	NO	SI	0	0
II	AG	NO	NO	SI	SI	0	27
	AG-N	SI	NO	SI	SI	21	0
III	EN	SI	SI	SI	NO	100	93

3.1.3. Análisis físico-químico

Los resultados se muestran en la tabla nº11

➤ **Tabla nº11:** Resultados análisis FQ y ph

Codificación	Día 1				Día 14			
	pH	Mat. grasa	Ext. seco	Sal	pH	Mat. grasa	Ext. seco	Sal
EN	5,26	33,27	58,48	1,218	5,36	34,32	58,74	1,272
N	5,32	31,94	58,25	1,394	5,39	33,5	58,32	1,455
AG-N	5,29	32,28	58,1	1,58	5,39	33,86	58,46	1,273
AG	5,27	31,85	58,22	1,44	5,39	33,85	58,95	1,16
Gel AG	5,28	34,28	59,08	1,355	5,34	33,95	57,52	1,37

Como se puede ver en la tabla anterior, la composición de los quesos con los diferentes antifúngicos es similar, según lo esperado. Ya que los quesos pertenecen a la misma fábrica, por lo que no hay diferencias entre las instalaciones de las plantas, pertenecen a las mismas cubas y mismo lote y han tenido una maduración similar en la misma cámara de oreo, por lo que los recubrimientos antifúngicos no afectan a la composición del producto.

3.1.4. Análisis Microbiológico

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Tabla nº 12: Resultados del análisis microbiológico

Codificación	Día 1	Día 14
	Mohos	Mohos
EN	<10	<10
N	<10	<10
AG-N	<10	<10
AG	<10	<10
Gel AG	20	<10

El resultado <10 se considera ausencia y el resultado de valor 20 es insignificante. Por lo que consideramos que el queso está libre de mohos y la carga microbiológica inicial no afecta al estudio.

3.1.5. Contenido en Natamicina

A continuación se muestra tabla que recoge los resultados del contenido en natamicina para cada una de las 5 muestras.

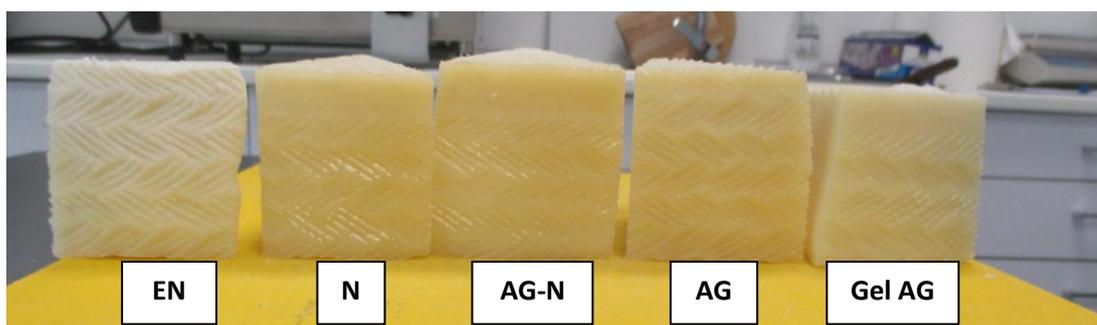
CONTENIDO EN NATAMICINA (mg /kg)				
EN	N	AG-N	AG	Gel AG
≤ 0,5	0 ≤ 0,5	0 ≤ 0,5	0 ≤ 0,5	0 ≤ 0,5

En vista de los resultados se puede considerar que no existe migración de natamicina al interior de la pieza. Por lo que las concentraciones de natamicina a esa profundidad están dentro de los límites legales.

3.1.6. Análisis sensorial

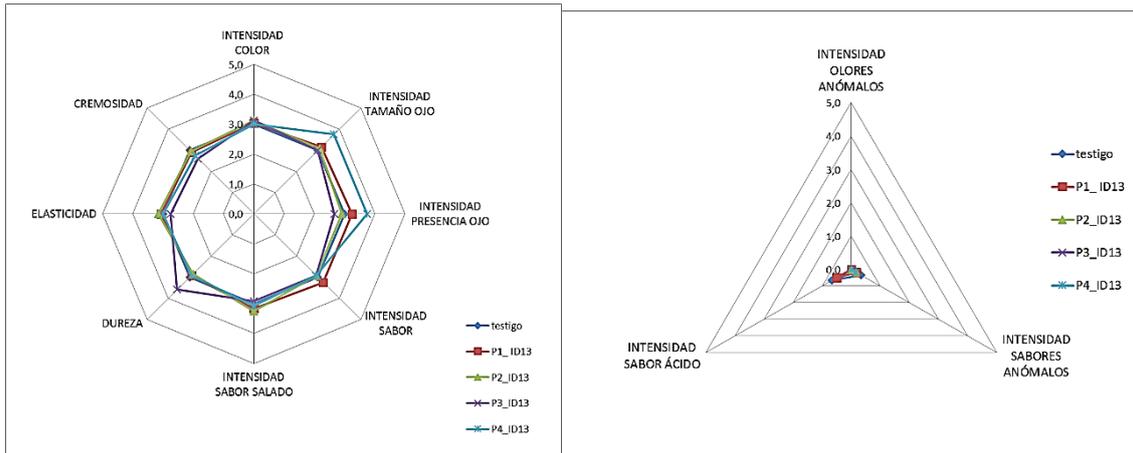
A continuación se muestra una breve descripción de la apariencia y el aroma que presenta el queso con cada uno de los antifúngicos.

- **EN:** Presenta menos homogeneidad de color y una corteza más blanca. En cuanto al aroma, presenta un aroma plástico característico.
- **N:** En cuanto al color, tiene mayor homogeneidad en caras laterales que el EN. Aroma más ácido que recuerda a cola o pintura. En cuanto a intensidad del aroma es igual que la de EN.
- **AG-N:** En color presenta menos homogeneidad. Aroma a pintura menos intenso.
- **AG:** Color más homogéneo y amarillo. Olor intenso a ceras, aroma “asfixiante” intenso.
- **Gel AG:** Es el más blanco y homogéneo. Aroma de poca intensidad, más natural, más lácteo.



➤ **Imagen 9:** Aspecto exterior de quesos con los distintos antifúngicos.

En cuanto a los resultados arrojados por el panel de catas, no se observan diferencias significativas entre las muestras. No obstante, las mayores diferencias se detectan en las muestras AG y Gel AG”, siendo la muestra AG la que presenta una textura más dura, menos elástica y cremosa que el resto.



➤ **Imagen 10:** Gráficos de perfiles sensoriales descriptivos.

Los comentarios de los catadores destacan la textura gomosa presente en todas las muestras, esto se debe a que el queso catado está destinado a una maduración correspondiente al semicurado y se cata como tierno. Al igual que el sabor salado intenso, que podría ser debido a que el panel únicamente probó la zona de la corteza y las muestras, al tener 15 días de maduración, no han sufrido aun una difusión homogénea de la sal.

Todas las muestras obtienen una puntuación global similar, comprendida entre 6,3 y 6,8. Una buena puntuación para un queso tierno.

4. CONCLUSIONES

- Con el ensayo microbiológico de halos de inhibición, se establece un nuevo método de análisis de eficacia antifúngica en recubrimientos, no usado con anterioridad en Queserías Entrepinares, que permitiría acortar los tiempos de resultados en la homologación de nuevos antifúngicos.
- En vista de los resultados obtenidos y tras la evaluación de la repetitividad de los ensayos “*in vitro*”, se cree necesario mejorar y optimizar la técnica.
- En los ensayos de halos de inhibición, los recubrimientos antifúngicos que mayor protección presentan son el EN y N, que contienen natamicina y sorbatos. El que menor protección antifúngica presenta es el Gel AG, sin natamicina ni sorbatos, hecho en base acuosa y con ácidos grasos naturales.
- Con las pruebas aceleradas piloto se establece un método que reduce los tiempos de homologación de los recubrimientos antifúngicos.
- Con el enfardado de palés tras la aplicación de los recubrimientos antifúngicos en pruebas piloto, se consiguen acelerar el tiempo de crecimiento de moho en el queso, debido a la mayor disponibilidad de agua que tiene el moho para crecer en la superficie del queso, como consecuencia de eliminar el gradiente de humedades existente entre la superficie del queso y el ambiente en condiciones habituales.
- A nivel piloto los recubrimientos sin natamicina y con ácidos grasos presentan una buena protección antifúngica. Lo que supone una alternativa eficaz a la natamicina en el control de mohos superficiales.
- Las condiciones “*in vitro*” no reproducen los resultados obtenidos a nivel piloto en cuanto al crecimiento de moho en la superficie del queso. Las condiciones de laboratorio no representan las condiciones reales del sustrato “queso”, es decir el sustrato ejerce una influencia importante en este aspecto.
- El método “*in vitro*” de halos de inhibición se podría implantar para el control de recubrimientos conocidos, como control de materias primas.
- Los distintos recubrimientos estudiados no impactan en la composición ni calidad sensorial de los quesos.

5. BIBLIOGRAFÍA

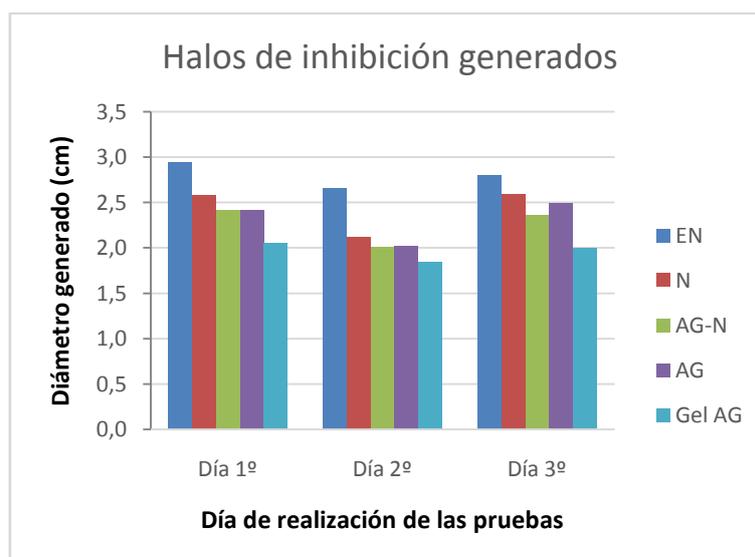
- Burdock, S; George, A., (1997) "Food and Color Additives, Volumen III". CRC Press. Sitio web: <https://books.google.es/books?id=JAVvqWBsBK0C&pg=PA231> (10/07/16)
- Cantón, R; (2010) "Enfermedades infecciosas y microbiología clínica". Vol 34 nº7 <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28> (13/08/16)
- Cercenedo, E; Saavedra-Lozano, J;(2009) "El antibiograma. Interpretación del antibiograma: Conceptos generales" Desde el laboratorio a la clínica.
- *Codex Alimentarius*. (2000) "Ratificación y/o Revisión de las Dosis Máximas para Aditivos Alimentarios en las Normas del Codex" 32ª Reunión, Beijing, República Popular de China, 20-24 de marzo de 2000. CX/FAC 00/5.
- Cristóbal Enríquez, A., "Estudio de la actividad antimicrobiana del aceite esencial y extractos vegetales evaluados en queso". Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Diciembre 2010. Sitio web: <http://itzamna.bnct.ipn.mx> (2/08/16)
- Eck, A; (1990) "El Queso". Ediciones Omega S.A
- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) "Scientific Opinion on the use of natamycin (E-235) as a food additive" European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. Journal 2009;7(12):1412. Sitio web: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/1412%2C0.pdf (09/07/16)
- El Blog de la Antigua, (2011). Sitio web: <http://www.queserialaantigua.com/blog/el-moho-en-los-quesos>, (15/08/2016)
- Frazier, W.C; Westhoff, D.C; (1993) "Microbiología de los alimentos" Editorial Acribia,
- Galiano, A; (2010). Diccionario ilustrado de términos médicos. Sitio web: http://www.esacademic.com/dic.nsf/es_mediclopedia/11114/halo (20/08/2016)
- Hayes, P.R; (1993) "Microbiología e higiene de los alimentos". Editorial Acribia S.A
- Lizcano González M.C (2007) "Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*)". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Pontificia Javeriana.
- Scott, R; (1991) "Fabricación de queso". Editorial Acribia S.A
- Villalta, J; Monferrer, A; (1998) "Conservantes: Ácido sórbico y sus sales" BDN, S.L
- Ramos, M; (2014) <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com.es/2014/10/halos-de-inhibicion.html> (22/07/2016)

- RE (UE) 2015/647 de la Comisión de 24 de abril de 2015, por el que se modifican y corrigen los anexos II y III del Reglamento (CE) nº1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a la utilización de determinados aditivos alimentarios.
- R.D 1113/2006, de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos.
- Robinson, (2010). “Caracterización de queso fresco y curado”
<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/33813/Tesina%20Zaira%20Medina.pdf>
(10/07/16)
- ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCFAC/ccfac32/fa00_05s.pdf (28/06/2016)
- <http://www.natamycin.com/es/regulatory> (28/06/2016)

ANEXOS

- Resultados de las 3 sesiones de ensayos de inhibición microbiológica. Halos de inhibición.

Día	Antifúngico				
	EN	N	AG-N	AG	Gel AG
1	2,91	2,5	2,5	2,4	1,9
1	3,09	2,4	2,3	2,0	1,7
1	2,94	2,5	2,4	2,5	2,2
1	3,08	2,6	2,4	2,5	2,0
1	2,69	2,7	2,5	2,7	2,5
	2,9	2,6	2,4	2,4	2,0
2	2,81	2,3		2,0	2,0
2	2,61	2,4	2,1	2,0	1,9
2	2,52	2,0	1,9	1,9	1,9
2	2,8	1,9	2,1	2,4	1,9
2	2,54	2,0	1,9	1,9	1,5
	2,7	2,1	2,0	2,0	1,8
3	2,8	2,73	2,46	2,05	1,57
3	2,86	2,36	2,18	2,52	1,84
3	2,64	2,91	2,58	2,42	2,05
3	3,11	2,41	2,31	2,95	2,47
3	2,58	2,54	2,26	2,5	2,07
	2,8	2,6	2,4	2,5	2,0



ANÁLISIS DE VARIANZA

	1	2	3
EN	2,91	2,81	2,8
	3,09	2,61	2,86
	2,94	2,52	2,64
	3,08	2,8	3,11
	2,69	2,54	2,58

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
1	5	14,71	2,942	0,02637
2	5	13,28	2,656	0,01963
3	5	13,99	2,798	0,04342

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,20449333	2	0,10224667	3,43032879	0,06633557	3,885293835
Dentro de los	0,35768	12	0,02980667			
Total	0,56217333	14				

	1	2	3
N	2,54	2,32	2,73
	2,44	2,39	2,36
	2,54	2	2,91
	2,61	1,89	2,41
	2,74	1,99	2,54

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
1	5	12,87	2,574	0,01228
2	5	10,59	2,118	0,04927
3	5	12,95	2,59	0,05245

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,71829333	2	0,35914667	9,45122807	0,0034287	3,885293835
Dentro de los	0,456	12	0,038			
Total	1,17429333	14				

	1	2	3
AG-N	2,5		2,46
	2,3	2,1	2,18
	2,4	1,9	2,58
	2,4	2,1	2,31
	2,5	1,9	2,26

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
1	5	12,08	2,416	0,00818
2	4	8,03	2,0075	0,012025
3	5	11,79	2,358	0,02582

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,41989643	2	0,20994821	13,4210685	0,00111891	3,982297957
Dentro de los	0,172075	11	0,01564318			
Total	0,59197143	13				

	1	2	3
AG	2,4	2,0	2,05
	2,0	2,0	2,52
	2,5	1,9	2,42
	2,5	2,4	2,95
	2,7	1,9	2,5

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
1	5	12,07	2,414	0,05868
2	5	10,1	2,02	0,03985
3	5	12,44	2,488	0,10277

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,63289333	2	0,31644667	4,7160457	0,0308106	3,885293835
Dentro de los	0,8052	12	0,0671			

Total 1,43809333 14

	1	2	3
Gel AG	1,9	2,0	1,57
	1,7	1,9	1,84
	2,2	1,9	2,05
	2,0	1,9	2,47
	2,5	1,5	2,07

Análisis de varianza de un factor

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
1	5	10,23	2,046	0,08633
2	5	9,23	1,846	0,04248
3	5	10	2	0,1097

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0,10972	2	0,05486	0,69003396	0,52040034	3,885293835
Dentro de los	0,95404	12	0,07950333			
Total	1,06376	14				

40% de ensayos muestran reproducibilidad del método

60% de ensayos no muestran reproducibilidad del método

Pvalor=0,05		
Antifúngico	Diferencias	Reproducibile
EN	NO	SI
N	SI	NO
AG-N	SI	NO
AG	SI	NO
Gel AG	NO	SI

