

FICHA DEL PROYECTO

Título del proyecto	DESARROLLO DE UN CULTIVO BIOPROTECTOR PARA EL MEJORAMIENTO DE LA INOCUIDAD DE LA PRODUCCIÓN QUESERA ARTESANAL DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO		
Duración del proyecto	60 meses		
Costo total del proyecto	\$ 11.326.959.251,32		
Monto solicitado fondo CTel-SGR	\$ 9.978.776.480,72		
Monto total de contrapartida	\$ 1.348.182.770,60		
Ejecutor	UNIVERSIDAD DE NARIÑO		
Lugar de ejecución del proyecto:	San Juan de Pasto Nariño –Universidad de Nariño		
Entidades participantes	Universidad De Nariño – Facultad de Ingeniería Agroindustrial		
	Agencia de Desarrollo Local de Nariño (ADEL) entidad administradora de los recursos del “Programa de Desarrollo con Identidad Regional entre España y Nariño” (DIRENA)		
	Fundación Para El Desarrollo Agroindustrial y Social de Colombia – Fudascol.		
	Instituto Departamental de Salud de Nariño (IDSN)		
	Gobernación de Nariño		
CONTACTOS			
ENTIDAD	CONTACTO	Celular	e-mail
Universidad de Nariño	Oscar Arango Bedoya	3006560635	oscar.arangob@gmail.com
Universidad de Nariño	Diego Mejía España	3007791316	diegomejiaespana@gmail.com
Universidad de Nariño	Rigoberto Rosero Benavides	3117625944	rigorosero20@gmail.com
ADEL	Gloria Pérez	3182915044	programadirena@adelnarino.org

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	5
1. IDENTIFICACION DEL PROBLEMA	8
1.1. Panorama general de la producción láctea en Colombia	8
1.2. Panorama general de la producción de leche en el departamento de Nariño	8
1.3. Problemas identificados en la cadena láctea	9
1.3.1. Problemáticas asociadas a la inocuidad	9
1.3.1.1. Inocuidad en la leche	9
1.3.1.2. Inocuidad en el queso	10
1.3.2. Inocuidad de los quesos en el contexto nacional	10
1.3.2.1. Inocuidad de los quesos frescos en el Departamento de Nariño	11
1.4. Nivel de innovación en las empresas queseras de Nariño	12
1.5. Magnitud actual del problema e Indicadores de referencia	20
2. POBLACION.....	22
2.1. Población afectada por el problema	22
2.2. Población Objetivo	23
2.3. Localización de la población objetivo.....	24
2.4. Impacto territorial y nivel de replicabilidad del proyecto en Colombia.	26
3. ESTADO DEL ARTE	27
3.1. Calidad higiénica de la leche cruda en el mundo	27
3.2. Calidad higiénica de la leche cruda en Colombia	28
3.3. Población microbiana patógena de la leche cruda.	28
3.4. Estudios sobre aislamiento de BAL en quesos tradicionales	29
3.5. Estudios sobre actividad bioprotectora de BAL aisladas de derivados lácteos.	32
3.6. Estudios de los efectos de la actividad de BAL sobre la calidad de queso	34
4. JUSTIFICACION.....	36
4.1. Entorno económico-social: importancia de inversión en ciencia y tecnología para la cadena láctea en Nariño.....	36

4.2.	Entorno político: el mejoramiento de la inocuidad como política para la competitividad de los productos agroalimentarios.	37
4.3.	Entorno legal: obligatoriedad para garantizar la inocuidad en los productos alimentarios y la salud de los consumidores.....	38
4.4.	Entorno científico tecnológico: importancia de la investigación y el desarrollo tecnológico para la cadena láctea.....	38
4.5	. Contribución del proyecto a la política pública.....	39
5.	MARCO TEORICO.....	40
5.5.	El queso y su importancia nutricional	40
5.6.	Importancia de la inocuidad en alimentos y derivados lácteos.....	41
5.7.	Bacterias ácido lácticas (BAL).....	42
5.8.	Identificación de bacterias acido lácticas.....	43
5.8.2.	Métodos bioquímicos.....	43
5.8.3.	Métodos moleculares.....	43
5.9.	Las BAL como agentes de bioprotección de alimentos.....	45
5.9.2.	Las bacteriocinas como antimicrobianos	46
5.9.3.	Bacterias lácticas como cultivos iniciadores y su uso en el desarrollo de nuevos productos.	48
6.	ANALISIS DE LOS PARTICIPANTES.....	50
6.1.	COOPERANTES.....	50
6.2.	BENEFICIARIOS	55
6.3.	OPOSITORES:	55
7.	OBJETIVOS	56
7.1.	Objetivo General	57
7.2.	Objetivos Específicos.....	57
8.	ANÁLISIS DE ALTERNATIVAS.....	58
8.1.	Identificación de las alternativas del proyecto	58
8.2.	Evaluación de alternativas	60
8.3.	Localización de la alternativa.	62
9.	ESTUDIO DE NECESIDADES.....	63
10.	DESCRIPCION METODOLOGICA.....	71
11.	INDICADORES PRODUCTOS ESPERADOS/ENTREGABLES	102
12.	IMPACTOS CIENTÍFICOS Y TECNOLÓGICOS DEL PROYECTO EN LAS ENTIDADES PARTICIPANTES	105

13.	RUTA CRÍTICA DEL PROYECTO	108
14	PLAN OPERATIVO	112
15	PRESUPUESTO	115
16	ANALISIS DE RIESGOS	116
17	INGRESOS Y BENEFICIOS	119
17.1	Relación de Ingresos Y Beneficios	119
17.2	Sustentación de beneficios beneficios	120
18	EVALUACION ECONOMICA.....	122
19	CRONOGRAMA DEL PROYECTO.....	123
20	ANALISIS DE SOSTENIBILIDAD	126
21	BIBLIOGRAFIA.....	130
22	ANEXOS	141
	ANEXO 1:JUSTIFICACION DE LOS REQUERIMIENTOS DE ADECUACION DE INFRAESTRUCTURA Y DOTACION DE EQUIPOS PARA LA IMPLEMENTACION DE LOS LABORATORIOS DE ANÁLISIS FISICOQUIMICO Y MICRIBIOLOGICO DE ALIMENTOS.	141
	ANEXO 2:JUSTIFICACION DE LOS REQUERIMIENTOS DE FORMACION COMO UN ELEMENTO PARA ALCANZAR LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO	142
	ANEXO 3: TÉRMINOS DE REFERENCIA PARA LA SELECCIÓN DE BENEFICIARIOS DE LOS PROCESOS DE FORMACIÓN Y CAPACITACIÓN A DESARROLLARSE EN EL MARCO DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO DENOMINADO: “DESARROLLO DE UN CULTIVO BIOPROTECTOR PARA EL MEJORAMIENTO DE LA INOCUIDAD DE LA PRODUCCIÓN QUESERA ARTESANAL DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO” ...	143

RESUMEN

La cadena láctea en el departamento de Nariño es uno de los sectores socio-económicos más importantes por los ingresos que genera y la cantidad de empleos directos e indirectos que involucra. De acuerdo con el Plan de Desarrollo Departamental 2016 - 2019 “Nariño corazón del mundo”, la producción de leche aporta aproximadamente el 27% del PIB del sector agropecuario de Nariño, en esta actividad están vinculados alrededor 40.000 productores y beneficia de forma directa a 160.000 personas. Simultáneamente, se registra un total de 296 empresas asociativas e individuales, generando 8.100 empleos directos adicionales, de los cuales más del 50% corresponde a mujeres.

La producción quesera de Nariño se caracteriza por estar orientada principalmente a la elaboración de quesos frescos. Uno de los principales problemas que enfrentan las queserías artesanales en Nariño es la baja calidad higiénica de sus productos, lo que repercute no solo en pérdidas por su corta vida útil, sino que además constituye un riesgo para la salud de los consumidores.

Los quesos frescos por su elevado contenido de humedad y pH presentan alta susceptibilidad a la contaminación por microorganismos patógenos, puesto que este medio favorece el crecimiento de bacterias peligrosas como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* y *Lysteria monocitogenes*. En el caso particular del queso campesino, uno de los más tradicionales en Nariño, la cuajada se somete a un proceso de molienda, existiendo así un mayor contacto con el ambiente, equipos y exceso de manipulación, lo que eleva los riesgos de contaminación.

A nivel nacional, según datos suministrados por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) los quesos frescos son los que presentan mayor prevalencia de microorganismos patógenos peligrosos como *L. monocitogenes*. Las cifras del número de intoxicaciones reportadas por el Instituto Departamental de Salud de Nariño (IDSN) ratifican los bajos niveles de inocuidad de los quesos frescos. Entre los años 2014 - 2016 se reportó la hospitalización de 245 personas por problemas causados por el consumo de queso fresco, asociado a contaminación microbiológica, encontrándose en algunos casos cepas de microorganismos peligrosos como *Staphylococcus aureus* y *Lysteria monocitogenes* como principales agentes causantes.

El problema identificado no solo se presenta en el departamento de Nariño, sino también en otras regiones alrededor del mundo donde se producen variedades similares de queso fresco. Es así como se han adelantado investigaciones y se han diseñado procesos para mejorar la inocuidad, mediante el uso de bioprotección natural, lo que se puede lograr mediante el empleo de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL).

Bajo este contexto el proyecto busca encontrar cepas de BAL nativas en las cuencas lecheras del departamento de Nariño, aisladas desde diferentes condiciones geográficas y climáticas, en búsqueda de la mayor diversidad posible de especies que se puedan encontrar en el trópico alto. Se llevarán a cabo

muestreos de leche y quesos en queserías artesanales ubicadas en 22 municipios del departamento, las muestras se llevarán al laboratorio en la Universidad de Nariño, donde se harán los aislamientos y se establecerá un banco de cepas. También se llevarán muestras al Instituto Departamental de Salud de Nariño, donde se harán aislamiento de bacterias patógenas.

Simultáneamente con la recolección de muestras se realizará una caracterización técnica de los procesos productivos donde se identifique la trazabilidad de producción y comercialización del queso fresco y sus características fisicoquímicas y microbiológicas, y un diagnóstico de los grupos poblacionales vinculados a la producción artesanal de quesos frescos en el departamento de Nariño, como insumo para la planificación de intervenciones posteriores mediante procesos de capacitación.

A partir de los aislamientos se espera identificar la aptitud tecnológica de un grupo de cepas de BAL autóctonas y, especialmente, encontrar cepas que tengan actividad inhibitoria frente al desarrollo de microorganismos patógenos que normalmente se encuentran en quesos frescos. Aquellas cepas que, mediante pruebas in vitro, demuestren tener las mejores propiedades inhibitorias frente a los patógenos más comunes de los quesos frescos, serán sometidas a tipificación e identificación mediante pruebas bioquímicas y moleculares. Las cepas seleccionadas serán sometidas a ensayos de aptitud tecnológica tales como capacidad de acidificación, producción de aromas, actividad proteolítica y lipolítica.

Finalmente se llevará a cabo el diseño del cultivo bioprotector, para lo cual se combinarán diferentes cepas que optimicen el espectro de inhibición frente a diversos agentes patógenos que puedan encontrarse en el queso fresco. El cultivo se incorporará a la leche y se elaborarán los quesos en las condiciones normales de producción, evaluándose el efecto sobre las características fisicoquímicas y sensoriales del producto.

Elaborado el cultivo láctico bioprotector y demostrados los resultados de inhibición de patógenos en queso fresco, se realizará la divulgación de los resultados mediante participación en eventos científicos y preparación de artículos para ser presentados a revistas de alto impacto. Paralelamente se dará a conocer la tecnología a los productores de queso de la región, mediante talleres formativos, manuales y guías de manejo para la aplicación cultivos lácticos bioprotectores.

A partir de los resultados de la caracterización técnica de los procesos productivos y del diagnóstico de los grupos poblacionales, se desarrollarán actividades de capacitación, tanto a nivel grupal como a nivel de planta, en cada uno de los 22 municipios de cobertura del proyecto, en aspectos relacionados con buenas prácticas de manufactura y técnicas de procesamiento, orientadas a mejorar la inocuidad y vida útil de la producción quesera artesanal, contribuyendo así a la seguridad de los consumidores, a la mejora de la calidad del producto y de su vida útil y, en consecuencia, a la rentabilidad de aquellas micro y pequeñas empresas del sector que aportan empleo y generan valor agregado en el eslabón industrial de la cadena láctea de Nariño.

Este proyecto hace parte de las iniciativas identificadas por expertos españoles dentro del programa “Desarrollo con Identidad Regional entre España y Nariño” (DIRENA), que buscan fortalecer la cadena láctea mediante la utilización de fermentos autóctonos para mejorar la calidad de los quesos y, en un futuro cercano, llegar a desarrollar un queso con denominación de origen. El proyecto ha sido priorizado por la gobernación de Nariño como una alternativa estratégica de desarrollo para la cadena Láctea en el departamento bajo la asesoría de expertos científicos de España e importantes institutos de Investigación de Europa como son el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y el Instituto de Productos lácteos de Asturias (IPLA).

1. IDENTIFICACION DEL PROBLEMA

1.1. Panorama general de la producción láctea en Colombia

La lechería colombiana se ha destacado en los últimos 30 años por su dinámica, reflejada en elevadas tasas de crecimiento de la producción. En la década de los 70, la producción lechera creció a razón de 4.7%, en promedio por año. En la siguiente década aceleró su expansión, alcanzando tasas anuales del 6.5%; mientras que en los 90, el crecimiento se redujo, pero se lograron tasas satisfactorias del 3,8% por año, hasta alcanzar en el 2011 una cifra de 6.360 millones de litros de leche fluida y un crecimiento porcentual del 6,2% con respecto al 2010, para el 2018 se tiene un promedio mensual de 291.590.128 litros. (Fedegan 2018)

La leche que se produce en Colombia proviene de los sistemas especializado y dual o de doble propósito. Se estima que el país cuenta con 25 millones de cabezas, de las cuales 11,8 millones están dedicados a la producción de leche; 8,4 millones en el doble propósito y el resto millones en el sistema especializado (FEDEGAN, 2016). El 60,4% de la producción se destina para la industria láctea y el 34% a la comercialización de leche cruda y a la alimentación de terneros (DANE, 2016).

1.2. Panorama general de la producción de leche en el departamento de Nariño

La producción de leche de Nariño aporta aproximadamente el 27% del PIB del sector agropecuario, vinculando a la actividad a 39.862 productores, beneficiando de forma directa a 159.448 personas. Simultáneamente, se registra un total de 160 empresas asociativas e individuales, generando 8.100 empleos directos adicionales, de los cuales más del 50% corresponde a mujeres (Gobernación de Nariño, 2019).

La cuenca lechera del Altiplano Nariñense comprende dos regiones altamente productoras. La primera correspondiente al Municipio de Pasto y la segunda denominada la Ex Provincia de Obando, integrada por los municipios de Guachucal, Cumbal, Túquerres e Ipiales.

De acuerdo al último reporte de cifras para el bimestre mayo y junio publicado por SAGAN (2019), en el departamento existen 44.791 predios ganaderos, de los cuales el 80% están dedicados a lechería especializada y el 15% corresponde a explotaciones de doble propósito. Donde se reportan 96.729 vacas en producción

En los últimos años, la producción de leche presentó incrementos significativos en Nariño, pasando de una producción 445.200 L/d en 1990 a 827.352 L/d en 2014, lo cual representa una tasa de crecimiento del 4,88% anual, para el 2019 un volumen

de producción 931.508 equivalente a un incremento total del 11,18% SAGAN (2019).

El volumen de leche producido permite el autoabastecimiento del departamento; sin embargo, debido a la apertura de nuevos mercados, la cadena láctea en Nariño enfrenta una nueva etapa de globalización, que requiere un apoyo propicio a la innovación y la eficiencia del sector, con la conquista de mercados externos y el aprovechamiento de todas sus fortalezas, entre las que se pueden citar, ser una zona de frontera y poseer animales con alto valor genético adaptados al medio.

El 45% de la producción se destina a la transformación por parte de empresas nacionales, fuera del Departamento. El resto se destina a la venta de leche cruda en las ciudades, a las plantas procesadoras locales formales y aproximadamente 400 productores de quesos artesanales (ADEL - Nariño, 2014).

Con respecto al eslabón industrial, la oferta Departamental se caracteriza por la convivencia de empresas industriales y artesanales. Las primeras, abastecen los supermercados con todos sus productos y a las tiendas de barrio con aquellos de alta rotación como leche pasteurizada, yogurt, kumis y queso campesino. Las segundas, abastecen el mercado a través de la venta directa al consumidor, tiendas de barrio y plazas de mercado; normalmente no poseen marca ni control de etiquetado. Los principales productores industriales en el Departamento de Nariño son La Cooperativa de Productos Lácteos de Nariño (Colácteos), Lácteos Andinos, Lácteos La Victoria, Lácteos Bella Suiza y Los Pinos. También existen empresas artesanales que han alcanzado un mayor desarrollo tecnológico y poseen segmentos de mercado en otras regiones del país, especialmente la ciudad de Cali.

1.3. Problemas identificados en la cadena láctea.

La cadena láctea en Nariño enfrenta grandes retos y problemas que afectan la competitividad, innovación, calidad y costos, involucrando diferentes procesos desde la producción primaria, el transporte y el acopio hasta el eslabón industrial.

1.3.1. Problemáticas asociadas a la inocuidad

1.3.1.1. Inocuidad en la leche

Una de las causas de la baja calidad microbiológica en el eslabón primario es la ausencia de transporte especializado y el mantenimiento de una red de frío en la recolección, las pequeñas y medias industrias no manejan su propio sistema de captación. La falta de equipos en finca también tiene un efecto sobre la calidad de la leche (Minagricultura, 2016).

El Instituto Departamental de Salud de Nariño realizó en 2012 un estudio piloto en 13 municipios que comercializan leche cruda, arrojando como resultado que el 19% de las muestras analizadas presentaban presencia de *L. monocytogenes* y el 15% un recuento positivo de *E. coli* (IDSN, 2012).

1.3.1.2. Inocuidad en el queso

Las principales variedades de queso elaborados por micro y pequeñas empresas queseras informales en el Departamento de Nariño son el queso campesino molido y la cuajada.

Estas variedades se catalogan de acuerdo con la NTC 750 como quesos frescos, por cuanto no se someten a procesos de maduración y pueden ser consumidos después de su elaboración. De acuerdo al contenido de humedad se clasifican como quesos blandos por su alto contenido de agua. Análisis fisicoquímicos reportados muestran que estos quesos se producen con un contenido de humedad que oscila entre el 57 y 60% y un pH de 6,4 - 6,5 (Rosero et al., 2014).

Debido a su alto contenido de humedad y alto pH, el producto es susceptible de contaminación por microorganismos patógenos, puesto que este medio favorece el crecimiento de bacterias peligrosas como *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocitogenes*. En el caso particular del queso campesino, éste se somete después del desuerado a un proceso de molienda, existiendo así un mayor contacto con el ambiente, equipos y manipulación, por tanto los riesgos de contaminación que presenta esta variedad son más altos que otros derivados.

Existen varios estudios donde demuestran que las condiciones en que se elaboran los quesos frescos presentan un ambiente óptimo para el desarrollo de microorganismos patógenos, siendo los de mayor incidencia *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*, y *Staphylococcus coagulasa positivo* (Yousef and Marth, 1988; Abdalla et al., 1993; Larson et al., 1999; Jørgensen et al., 2005).

La contaminación de quesos con *L. monocytogenes* puede abarcar todas las etapas de la cadena agroalimentaria por factores como: la presencia de mastitis subclínica, el deterioro de la infraestructura, la contaminación de pisos y/o equipos, deficientes procedimientos de limpieza y desinfección, presencia de biopelículas, temperaturas de almacenamiento inadecuadas, contaminación cruzada, entre otros (Sistema Nacional de Salud y Ministerio de Protección Social, 2011; Díaz-Pinillos et al., 2012).

1.3.2. Inocuidad de los quesos en el contexto nacional

Según datos suministrados por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) para el período 2008-2015 los quesos frescos que presentaron mayor prevalencia de *L. monocytogenes* son, en orden decreciente el queso campesino, queso doble crema y cuajada.

De acuerdo con la información del Instituto Nacional de Salud (INS), en el año 2016 se notificaron 11.836 casos de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) al Sistema Nacional de Vigilancia. Los alimentos más relacionados en la ocurrencia de los brotes de ETA fueron: alimentos mixtos (430 brotes), seguido de leche,

productos lácteos y sus derivados (173 brotes), mezclas de arroz (103 brotes) y productos de la pesca y sus derivados con 89 brotes. En estos grupos, los alimentos con mayor frecuencia fueron queso, arroz con pollo y camarones respectivamente. El lugar de consumo de mayor incidencia en la ocurrencia de brotes ETA fue el hogar (519 brotes) que representa el 52%, seguido de otros y restaurante comercial con 15% (155 brotes) y establecimiento educativo 10% (INS y Minsalud, 2016).

De las 36 entidades departamentales/distritales vigiladas, el 97,2% notificó brotes de ETA de manera colectiva al Sivigila; las que mayor número de brotes presentaron fueron Bogotá D.C. (147), Antioquia (122), Valle del Cauca (121) y Nariño (44) (Ministerio de Protección Social, 2016).

1.3.2.1. Inocuidad de los quesos frescos en el Departamento de Nariño

El Instituto Departamental de Salud de Nariño (IDSN), reportó que en el año 2014 se presentaron 6 casos de intoxicación asociadas al consumo de quesos frescos, donde estuvieron expuestas 385 personas de las cuales enfermaron 128, que fueron hospitalizadas, presentando diferentes sintomatologías como náuseas, vómito, diarrea, fiebre, dolor abdominal, cefalea, deshidratación, mialgias, artalgias, mareo, escalofrío y parestesia. En todos los casos se tomaron muestras biológicas de los afectados como también muestras del producto consumido. En dos casos el agente encontrado en el alimento y en la muestra biológica de los individuos fue *Staphylococcus aureus*. En un caso el agente microbiano causante fue *Lysteria monocytogenes*. En otro se encontró un número elevado de coliformes totales y en dos casos no se logró identificar el agente patológico.

Durante los años 2015 y 2016 de acuerdo a los informes del IVC reportados por el Instituto Departamental de Salud de Nariño (2017), se analizaron un total de 509 muestras aleatorias de leche y derivados lácteos, de los cuales 481 correspondían a queso fresco. De las muestras de queso analizadas 109 resultaron contaminadas con microorganismos patógenos, lo que equivale a un 23% del total de las muestras analizadas. En el periodo de tiempo mencionado se registró la hospitalización de 137 personas, lo que fue asociado al consumo de quesos con problemas de calidad microbiológica, encontrándose en algunos casos cepas tan peligrosas como *Staphylococcus aureus* y *Lysteria monocytogenes* como principales agentes causantes.

Según la información suministrada por INVIMA, los productos de mayor decomiso en el departamento de Nariño son los quesos, frescos debido a su baja calidad higiénica, presentando altos riesgos para el consumidor. Los principales microorganismos presentes son coliformes totales, *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Entre los años 2012 a 2016 la entidad aplicó 70 medidas sanitarias de seguridad en el departamento (INVIMA, 2017), cifra que indica que la calidad higiénica es un punto crítico que debe ser mejorado para lograr el desarrollo competitivo de las empresas queseras.

1.4. Nivel de innovación en las empresas queseras de Nariño.

Las empresas queseras de Nariño en su gran mayoría, son artesanales. Datos de la Secretaría de la Cadena Láctea indican que existen más de 100 empresas no registradas, lo que muestra una alta informalidad en el sector. De acuerdo con reportes de INVIMA existen solo 172 establecimientos registrados, los cuales han sido visitados y corresponden a microempresas localizadas en municipios productores de leche.

El 100% de las empresas producen derivados lácteos y procesan alguna de las variedades tradicionales de queso fresco, entre ellas queso campesino, cuajada y queso doble crema. Sin embargo ninguna de estas microempresas procesa variedades de queso madurado o semi-madurado y tan solo 63 empresas (36% de las registradas) cuentan con concepto sanitario favorable, es decir tienen la autorización legal para la transformación de alimentos.

Las anteriores cifras indican el bajo desarrollo tecnológico y nivel artesanal de las empresas existentes, por tanto es urgente iniciar procesos de mejora desde modelos piloto y escalonados que puedan replicarse posteriormente a la multitud de empresas existentes.

Ninguna de las empresas, tanto las consideradas como medianas (Lácteos, Andinos, Lácteos la Victoria, Los Pinos), como las microempresas, cuenta en su estructura organizacional y técnica con un departamento de investigación y desarrollo, dedicado a la innovación y creación de nuevos productos. Esto ha hecho que desde sus inicios la producción de queso y demás derivados sean siempre los mismos y elaborados bajo las mismas condiciones, aun existiendo una tendencia mundial de desarrollo de nuevos productos con base en innovación continua.

Con la apertura económica y los tratados de libre comercio la cadena láctea en el departamento de Nariño queda expuesta al ingreso de productos foráneos, por ello los productos regionales deben necesariamente ser más competitivos tanto en calidad como en precio para poder mantenerse en el mercado.

En conclusión, es evidente la necesidad de aportar a la inocuidad e innovación de la cadena láctea, y una forma de lograrlo sería mediante el aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas que permitan no solo desarrollar cultivos lácticos que generen bioprotección natural en quesos frescos, sino también la posibilidad de obtener nuevos productos a través de la utilización de dichas cepas. La utilización de estos cultivos lácticos permitirá a las empresas queseras mejorar la calidad e inocuidad del producto, prolongar su vida útil, diversificar la producción y facilitar el acceso a nuevos mercados.

El posible hallazgo y caracterización tecnológica de cepas nativas podría servir a futuro para el desarrollo de productos innovadores, que permitan buscar una “denominación de origen protegida (DOP)”.

Para lograr este propósito, la Universidad de Nariño trabajará en convenio con el Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), debido a su amplia trayectoria y experiencia evidenciada en los numerosos trabajos realizados sobre distintos quesos (Rodríguez González et al., 2001; Herreros et al., 2005; Rodríguez et al., 2007; Alegría et al., 2010), en los que se ha abordado su caracterización microbiológica y fisicoquímica, lo que ha permitido conocer la microbiota láctica autóctona, adaptada a las características y protocolos de elaboración de cada queso y por lo tanto, excelente fuente de cepas para formar parte de fermentos autóctonos; los problemas de contaminación por microorganismos patógenos y alterantes (Margolles et al., 1997), y aportar soluciones a dichos problemas utilizando, por ejemplo, cepas lácticas productoras de bacteriocinas que inhiben el desarrollo de estos microorganismos (Rilla et al., 2004) y su uso como cultivos bioprotectores.

A continuación se presenta una valoración y se sistematizan los problemas mencionados asociados a la cadena láctea.

1. Deficiente calidad microbiológica de la producción quesera de las microempresas en el departamento de Nariño (Def cal mic): En Nariño hay un alto número de microempresas que procesan quesos frescos con elevados niveles de contaminación microbiológica, lo que representa no solo un riesgo para la salud de los consumidores, sino también una deficiente calidad y corta vida útil de los productos en el mercado.

Área: producción Industrial

2. Bajo nivel de profesionalización de los procesos y técnicas de producción. (baja. Prof): La producción de derivados lácteos en micro y pequeñas empresas es realizada de forma artesanal, por personas que no cuentan con el conocimiento técnico que los procesos requieren.

Área: producción Industrial

3. Baja Calidad en la materia prima (Mat. Prima): La calidad tanto composicional como microbiológica de la leche producida en el departamento es deficiente, según informes reportadas por el Instituto departamental de Salud de Nariño (IDSN, 2017)

Área: Producción primaria

4. Bajos niveles de innovación mediante técnicas de bioprotección con bacterias lácticas nativas en la producción quesera artesanal (inno-biopr): No se han desarrollado procesos investigativos que permitan fortalecer la competitividad de la producción quesera empleando el potencial de la biodiversidad microbiana que existe en el país. De acuerdo al Manual de Solicitud de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados (Ministerio de medio ambiente y desarrollo sostenible, 2016) Colombia cuenta con especies biológicas que aún no han sido objeto de estudio como ocurre con los microorganismos.

Área: Investigación y desarrollo

5. Deficiencia de información de la capacidad técnica y de estudios sobre las causas que generan baja calidad microbiológica en la producción quesera (info): No se cuenta con información que identifique las causas detalladas de la calidad técnico productiva e higiénica de las microempresas queseras. La información disponible únicamente indica las cifras en cuanto a la calidad microbiológica, tales como los informes reportadas por el Instituto departamental de Salud de Nariño (IDSN, 2017).

Área: producción Industrial.

6. Bajo desarrollo de técnicas biotecnológicas para mejoramiento de la calidad e inocuidad en quesos frescos tradicionales: (Biotecnolo):

No se han desarrollado procesos de innovación en área de biotecnología para la cadena láctea en el departamento de Nariño, esto debido al bajo nivel de estudios en biodiversidad microbiana tanto a nivel departamento como a nivel de Colombia, según se menciona en el Manual de Solicitud de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados (Ministerio de medio ambiente y desarrollo sostenible, 2016).

Área: Investigación y desarrollo

7. Deficiencia de estudios de bioprotección a escala piloto (Bioprotecc): No se han desarrollado estudios de bioprotección a escala piloto empleando cepas nativas de BAL en Nariño. La Biodiversidad relacionada a microorganismos es un campo por explorar en Colombia.

Área: Investigación y desarrollo

8. Deficiencia en los procesos de formación técnica de queseros artesanales (formación): Ausencia de procesos de formación técnica para el personal vinculado a las empresas queseras artesanales. Según el Plan Departamental de Extensión Agropecuaria (Gobernación de Nariño, 2019) se requiere fortalecer los espacios de intercambio de saberes técnicos en las áreas de tecnologías de generación de valor agregado.

Área: Transferencia tecnológica.

9. Baja diversificación de productos en el mercado (Div.mercad): Los productos que elaboran las queseras artesanales han sido tradicionales y no se ha realizado procesos de innovación o desarrollo de nuevos productos.

Área: Mercado

10. Altos riesgos de contaminación por agentes patógenos en quesos frescos tradicionales (riesgos.co). Los productos por su baja calidad microbiológica presentan altos riesgos para la salud de los consumidores microbiológica, como ha quedado demostrado en los reportes del Instituto Departamental de Salud de Nariño (IDSN, 2017).

Área: salud

11. Variabilidad microbiológica, fisicoquímica, nutricional y organoléptica de los productos elaborados en las microempresas queseras (variabilidad): Los procesos que realizan las queserías artesanales, en muchos casos no son los más adecuados y no están estandarizados, generando así gran variabilidad en el producto final.

Área: producción industrial

12. Bajos periodos de vida útil de los productos elaborados en las microempresas queseras (vida útil): El queso fresco es uno de los de mayor producción por su aceptabilidad en el mercado y facilidad de elaboración, sin embargo, su vida útil es muy corta, especialmente debido al desarrollo de procesos de fermentación, como consecuencia de una alta carga microbiana inicial.

Área: Mercado.

13. Baja competitividad de las micro y pequeñas empresas transformadoras del departamento de Nariño (competitiv): De acuerdo al Plan Estratégico de Ciencia, Tecnología e Innovación del Departamento de Nariño (Gobernación de Nariño, 2012), la producción quesera bajo las condiciones de proceso actuales presenta bajos niveles de competitividad, su producción no está en la capacidad de afrontar retos inherentes a los tratados de Libre Comercio y es necesario fortalecer los procesos de integración y de fortalecimiento a la cadena. En el mismo plan se menciona la siguiente demanda “desarrollar proyectos de Innovación de productos y subproductos derivados del sector lácteo y cárnico en el departamento de Nariño”.

Área: mercado.

Mediante análisis sistémico, empleando la Matriz de Vester o Matriz de Influencias Directas (MID) se analizó la influencia de causalidad y efectos, para poder identificar el problema principal, el cual tiene mayor influencia sobre variables que son de interés mejorar. La matriz con la calificación de las anteriores variables se indica en la tabla 1.

Tabla 1: Matriz de vester- MID

	1 : Baja Inoc.	2 : baja. Prof	3 : mat. Prima	4 : inno-biopr	5 : info	6 : Biotecnolo	7 : Bioprotecc	8 : formación	9 : Div.mercad	10 : riesgos.co	11 : variabilid	12 : vida.util	13 : competitiv
1 : Baja Inoc.	0	0	0	0	0	1	0	0	3	3	3	3	3
2 : baja. Prof	3	0	0	1	0	1	1	1	2	1	2	1	2
3 : mat. Prima	3	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	1	1
4 : inno-biopr	3	0	0	0	0	0	0	0	2	3	2	3	2
5 : info	1	1	1	3	0	0	1	0	1	1	1	1	1
6 : Biotecnolo	1	0	0	3	0	0	0	0	2	1	1	3	2
7 : Bioprotecc	1	0	0	3	0	0	0	0	1	3	1	3	2
8 : formación	2	2	0	2	0	0	1	0	2	1	2	1	3
9 : Div.mercad	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
10 : riesgos.co	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
11 : variabilid	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
12 : vida.util	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
13 : competitiv	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

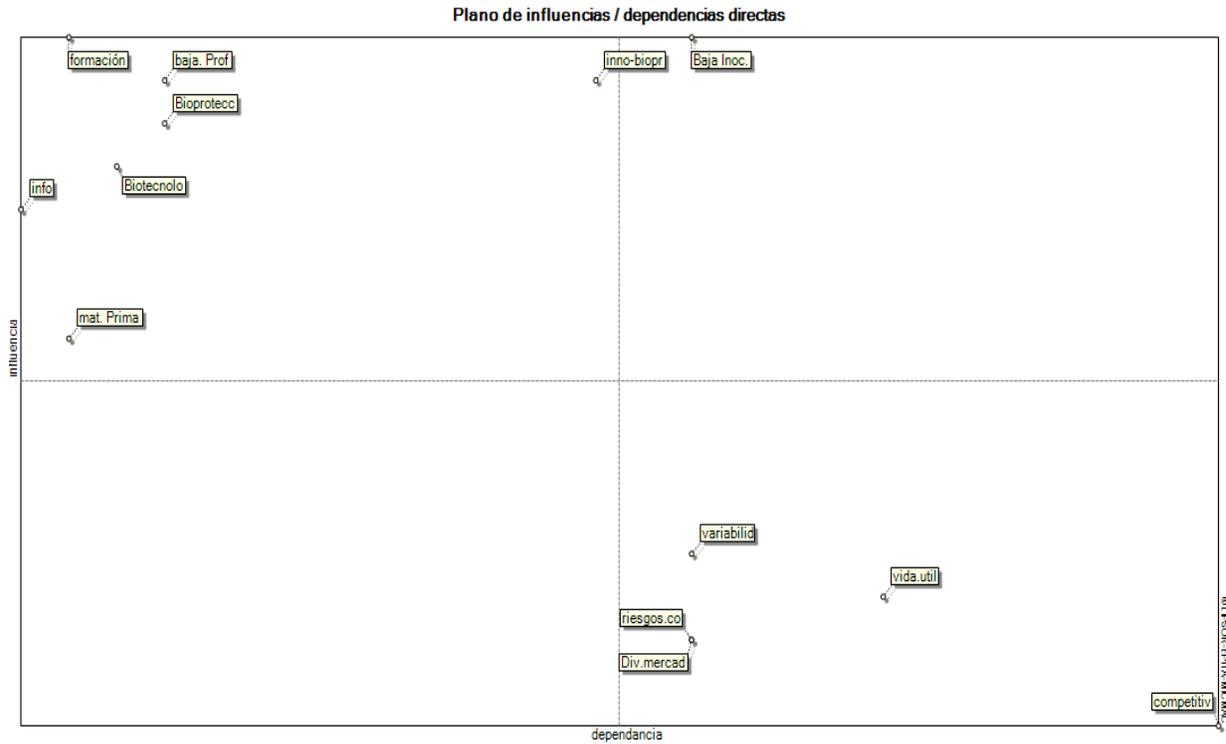
© LIPSOR-EPITA-MICMAC

Las influencias se puntúan de 0 a 3, con la posibilidad de señalar las influencias potenciales:

- 0 : Sin influencia
- 1 : Débil
- 2 : Media
- 3 : Fuerte
- P : Potencial

De la Matriz de Influencias Directas MID se deriva el plano de Influencias y dependencias indicando el nivel de influencia y dependencia que tienen las diferentes variables, como se muestra en la Figura 1.

Figura 1. Plano de Influencia/dependencia.



El cuadrante superior izquierdo relaciona variables muy influyentes en el sistema mientras que el cuadrante inferior derecho son variables dependientes, en su orden estamos hablando de situaciones negativas tipo causa y tipo efecto respectivamente.

El cuadrante inferior izquierdo relaciona aquellas variables poco dependientes y poco influyentes, las cuales no son tomadas como importantes en el árbol de problemas.

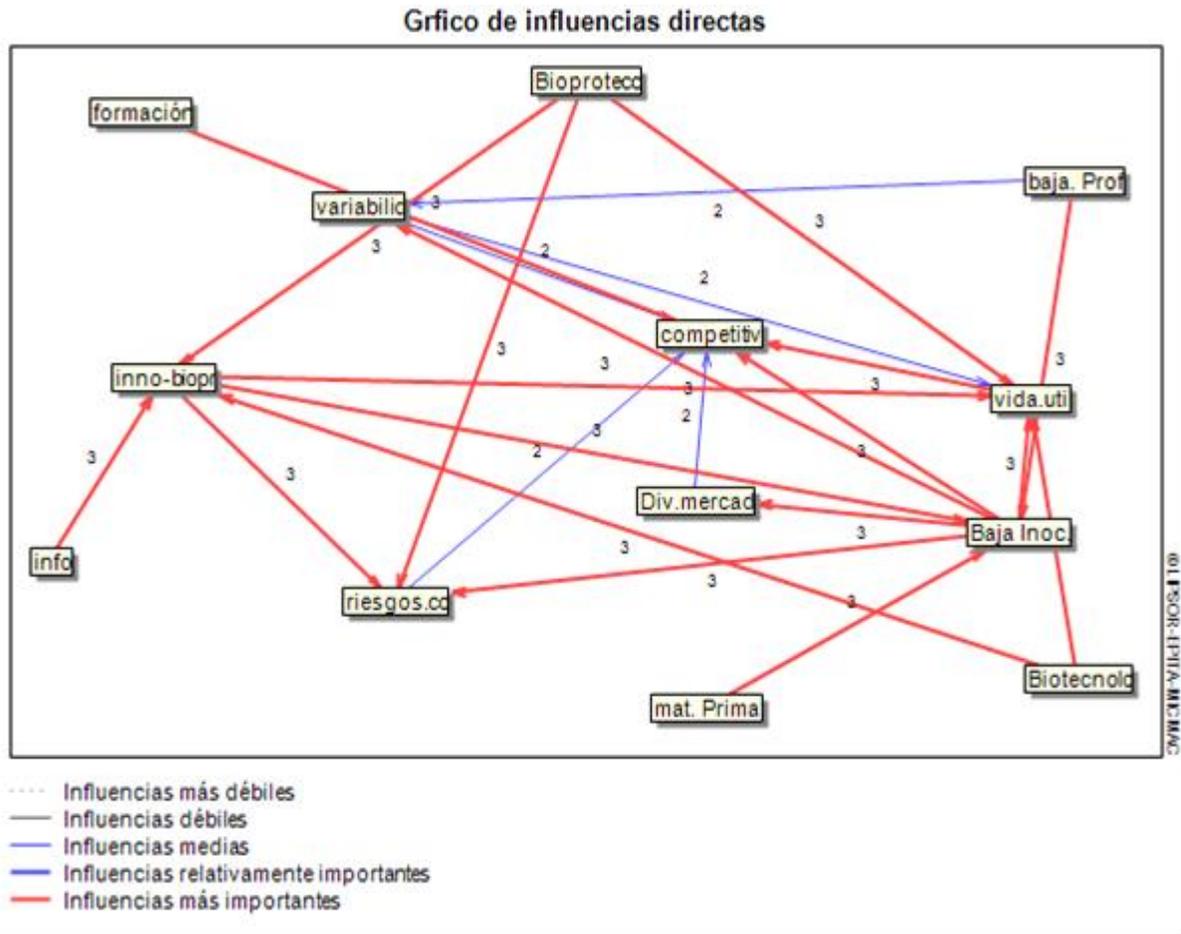
El cuadrante superior derecho indica la(s) variables muy influyentes y a la vez dependientes, lo cual nos conduce inmediatamente al problema central del sector analizado y el cual debe ser objeto de intervención del proyecto.

En este caso el problema central identificado es **“BAJO NIVEL DE INOCUIDAD EN QUESOS FRESCOS ASOCIADO A DEFICIENTE CALIDAD MICROBIOLÓGICA EN LA PRODUCCION QUESERA ARTESANAL EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO** Teniendo identificado el problema central, las variables del cuadrante superior izquierdo son las causas que generan dicho problema y sobre las cuales deberían ser objeto de intervención para llevar el sistema a una situación positiva.

Gráfico de influencias directas

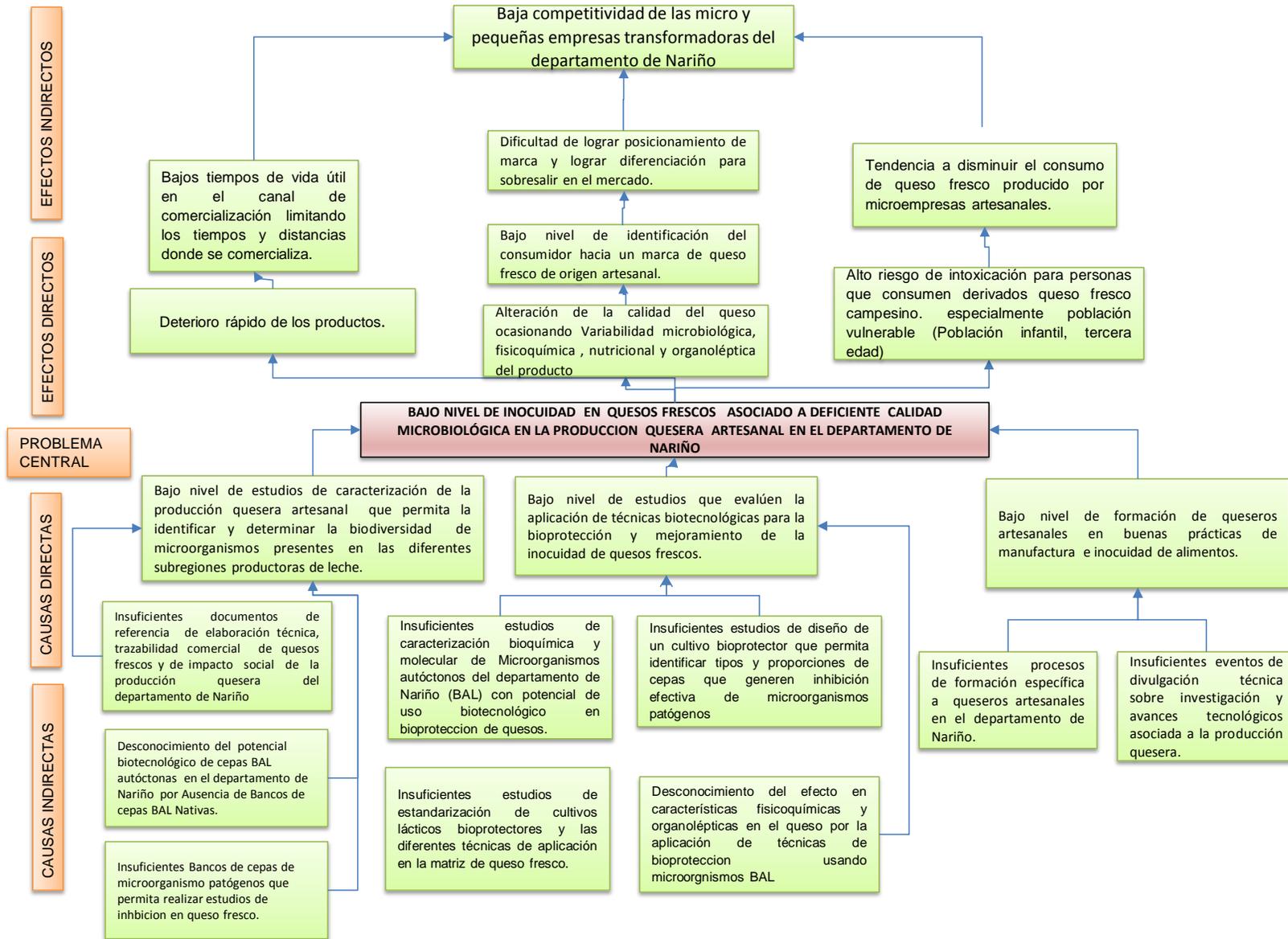
Este gráfico se determina a partir de la matriz de influencias directas MID.

Figura 2. Gráfico de Influencias directas.



En el gráfico de influencias se pueden establecer las diferentes relaciones entre las variables y su nivel de influencia sobre otras, desde influencias débiles hasta influencias más importantes representadas por color y número. Esta relación permite identificar las causas directas e indirectas así como también los efectos directos e indirectos considerando dicho nivel de afectación. Con estos insumos se construye el árbol de problemas el cual se relaciona en la figura 3.

Figura 3. Árbol de problemas
ARBOL DE PROBLEMAS _ CADENA LACTEA



Una vez identificado el problema central como la “bajo nivel de inocuidad asociado a deficiente calidad microbiológica en la producción quesera artesanal en el departamento de Nariño”, la pregunta de investigación que se plantea es la siguiente:

¿Las bacterias acidolácticas (BAL) aisladas de quesos artesanales y leche cruda producidos en las cuencas lecheras de Nariño, tienen características de interés tecnológico que puedan ser aprovechadas para desarrollar un cultivo láctico con función de bioprotección y que permita mejorar la inocuidad del queso fresco producido en el departamento de Nariño?

1.5. Magnitud actual del problema e Indicadores de referencia

Pese a los riesgos para la salud de la población asociados al consumo de quesos frescos con deficiente calidad microbiológica, actualmente en el departamento de Nariño no se han desarrollado estrategias enfocadas a atacar esta problemática. A nivel de pequeñas unidades de acopio y/o procesamiento de leche se requiere identificar y evaluar puntos críticos para poder mejorar la calidad de los procesos en forma integral.

Por otro lado, se conoce que la calidad microbiológica de los quesos se puede mejorar mediante la aplicación de microorganismos con características tecnológicas específicas como las que tienen las bacterias ácido lácticas, pero en Nariño no se ha iniciado ningún proceso de recolección, evaluación ni identificación de cepas BAL autóctonas que pudiesen mejorar las características del queso fresco.

Al no contar con un banco de cepas BAL en el departamento de Nariño, se desconoce si parte de éstas cepas pudiesen tener potencial de inhibición frente a microorganismos patógenos o alterantes y, en consecuencia, no se han desarrollado cultivos lácticos con características de bioprotección para el mejoramiento de la calidad microbiológica de queso fresco producido en el departamento de Nariño.

En el marco de ejecución de otros proyectos de apoyo a los productores, por parte de entidades gubernamentales, ha habido procesos de capacitación orientados al mejoramiento de la calidad higiénico sanitaria de la leche, pero han sido llevados a cabo a nivel de fincas ganaderas. A la fecha no se han realizado procesos de formación a los queseros artesanales específicamente orientados a la mejora de la calidad microbiológica del queso considerando las buenas prácticas de manufactura (BPM) en los procesos y la aplicación de cultivos lácticos bioprotectores.

Los criterios para definir el cumplimiento de los requisitos de calidad microbiológica de una muestra de queso están establecidos en la Norma Técnica Colombiana (NTC) N° 750, donde se indican los límites de referencia permisibles para que se considere que una muestra de queso cumple con parámetros tanto fisicoquímicos como microbiológicos. Los criterios microbiológicos en mención se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Requisitos microbiológicos para el queso fresco

Requisitos	n	m	M	c
Exámenes de rutina:				
Coliformes, UFC/g (30°C)	3	1 000	5 000	1
Coliformes, UFC/g (45 °C)	3	50	100	1
Recuento de mohos y levaduras, UFC/g	3	500	5 000	1
Exámenes especiales:				
Recuento de Estafilococos coagulasa positiva, UFC/g	3	100	1 000	1
Detección de <i>Salmonella</i> /25 g	3	0	-	1
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	3	0	-	1

Fuente: Norma Técnica Colombiana No 750 Productos lácteos Queso. Tercera actualización

Donde:

n : número de muestras por examinar

m : índice máximo permisible para identificar nivel de buena calidad

M : índice máximo permisible para identificar nivel de calidad aceptable

c : número máximo de muestras permisibles con resultados entre m y M

Durante los años 2015 - 2016 de acuerdo a los informes de Inspección, Vigilancia y Control reportados por el Instituto Departamental de Salud de Nariño, se analizaron un total de 509 muestras del grupo de alimentos “leche y derivados lácteos”, de las cuales 481 correspondieron a quesos frescos procedentes de todo el departamento. Los análisis de calidad microbiológica mostraron que 109 muestras resultaron inaceptables o rechazadas por incumplimiento de los requisitos microbiológicos, lo que equivale a un **23%** del total de las muestras analizadas.

Considerando las anteriores cifras derivadas de los informes emitidos por el Instituto Departamental de Salud de Nariño (2017) se tiene el siguiente indicador de referencia que da cuenta de la magnitud del problema.

indicador de referencia	Línea base del indicador	
	Unidad de medida	Magnitud
Nivel de incumplimiento de los requisitos microbiológicos de quesos frescos elaborados en el departamento de Nariño.	Porcentaje (%)	23%

2. POBLACION

2.1. Población afectada por el problema

De acuerdo al plan de desarrollo departamental “Nariño corazón del mundo 2015-2019”, la producción de leche de Nariño vincula a 39.862 productores, distribuidos en las diferentes subregiones y condiciones agroclimáticas del departamento en 45 municipios que reportan actividad lechera.

En Nariño se estima que el volumen total de leche destinado a la fabricación de productos lácteos en microempresas es de 456.500 L/d, lo que representa el 57,81% de la producción total, donde en el 100% de las empresas transformadoras se elaboran quesos frescos como uno de los principales productos.

Considerando dicha cifra de transformación y manteniendo la misma proporción, se puede estimar que en promedio el número de productores de leche que destinan su producción a la transformación de derivados lácteos es de **22.721 productores** distribuidos en 41 municipios con reporte de producción lechera.

Cabe resaltar que la mayoría son empresas de carácter asociativo las cuales además de ser productores de leche son también transformadores siendo así micro y pequeñas queseras artesanales.

Las deficiencias microbiológicas de la calidad del queso fresco que se produce en las queserías artesanales del departamento se traducen en una menor vida útil del producto, dificultando la comercialización y el acceso a nuevos mercados.

Las anteriores deficiencias del producto se ven traducidas en bajos precios de venta del producto y a su vez en bajos precios pagados al productor por la materia prima, no compensando los costos de la actividad ganadera y en consecuencia genera baja competitividad de la cadena productiva.

En la tabla a continuación se relaciona el listado de municipios, donde se localizan los **22.721 productores de leche** en el departamento de Nariño que ven afectada su actividad económica por deficiencias en el eslabón de transformación de la cadena de suministro.

Tabla: Municipios con producción lechera donde se encuentra localizada la población afectada por el problema.

No	MUNICIPIO	No	MUNICIPIO	No	MUNICIPIO
1	GUACHUCAL	15	GUAITARILLA	29	SANDONÁ
2	CUMBAL	16	OSPINA	30	SAMANIEGO
3	PUPIALES	17	PUERRES	31	FUNES
4	PASTO	18	BUESACO	32	EL TABLÓN DE GÓMEZ

5	TÚQUERRES	19	CÓRDOBA		33	NARIÑO
6	IPIALES	20	YACUANQUER		34	SAN PABLO
7	SAPUYES	21	MALLAMA		35	BELÉN
8	TANGUA	22	LA FLORIDA		36	SAN PEDRO DE CARTAGO
9	ALDANA	23	LA CRUZ		37	SAN LORENZO
10	CUASPÚD	24	SANTACRUZ		38	COLÓN
11	POTOSÍ	25	IMUÉS		39	ANCUYÁ
12	ILES	26	PROVIDENCIA		40	POLICARPA
13	GUALMATÁN	27	LA LLANADA		41	LA UNIÓN
14	CONTADERO	28	SAN BERNARDO			

Fuente: Plan Departamental de Desarrollo “Nariño corazón del mundo 2015-2019”,

2.2. Población Objetivo

Para determinar la población objetivo del proyecto se seleccionaron 22 municipios localizados en 5 subregiones de Nariño, teniendo en cuenta su nivel de aporte porcentual al volumen de producción de leche total en el departamento, donde los 22 municipios seleccionados contribuyeron con el 93% del volumen total producido para el bimestre mayo/junio de 2019, de acuerdo a la encuesta de leche realizada por SAGAN para este periodo (SAGAN, 2019). Para la selección de los municipios se consideró también su localización, procurando que cuenten con diferentes condiciones agroclimáticas, esto con el fin de que al momento de hacer recolección de muestras de leche y queso, se pueda obtener una alta diversidad genética en los aislamientos de bacterias ácido lácticas.

En cada municipio se tomará como punto de muestreo un centro de acopio o planta de procesamiento, la cual será objeto de estudio y participará como organización beneficiaria en los diferentes procesos de capacitación y de transferencia de resultados contemplados en el proyecto. Cada planta se estima que procesa alrededor de 3000 L/d, lo que beneficia directamente a pequeños productores de leche, para quienes tales microempresas representan, en algunos casos, el cliente principal para la venta de su producto, o en otros casos, pequeñas asociaciones de productores de leche son quienes transforman directamente su producto en quesos frescos, generando así mayor valor agregado y mejorando sus ingresos. En promedio la cantidad de leche vendida por cada productor es de 20 L/d (Plan de desarrollo Departamental "Nariño corazón del mundo" 2015 -2019).

Por lo tanto la población objetivo está dada por

Población Objetivo = ((3000 Litros/día) / (20 L/día/productor)) x 22 municipios =

3300 productores/transformadores.

La selección de los municipios objeto del proyecto se llevó a cabo considerando la diversidad de climas donde existe producción de leche y existencia de empresas transformadoras y/o centros de acopio.

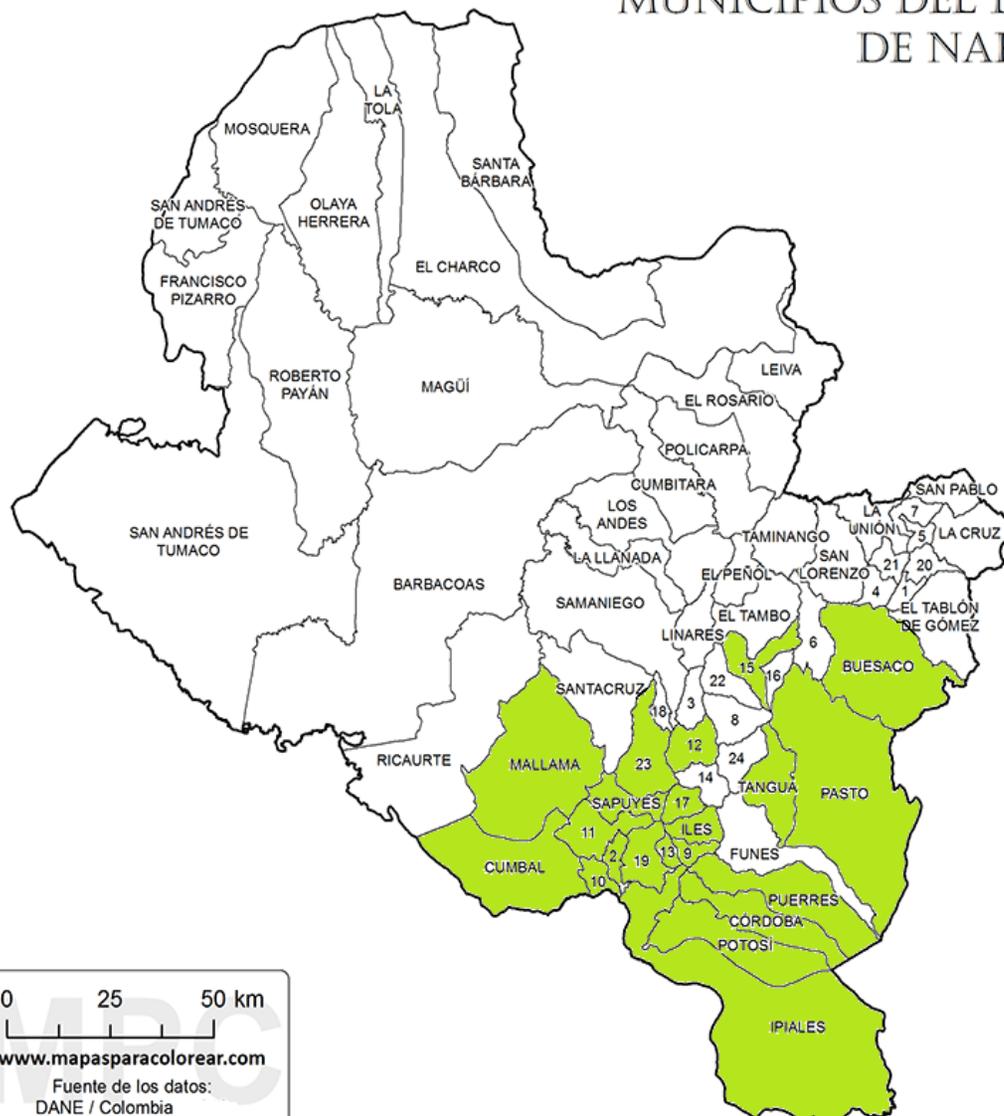
Dicha diversidad de climas es importante por cuanto en estos municipios se realizará muestreos para coleccionar cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) con fines de evaluación biotecnológica, cuanto más diversos son los ambientes, se esperaría encontrar una mayor diversidad genética y de propiedades funcionales en las cepas nativas del departamento para posterior diseño del cultivo bioprotector.

Los municipios seleccionados considerando dicha diversidad se relacionan en la tabla a continuación, en estos municipios se adelantará el proceso de mejoramiento de la inocuidad en los procesos productivos que desarrollan las microempresas lácteas.

2.3. Localización de la población objetivo.

MUNICIPIO	SUBREGIONES INTERVENIDAS	ALTITUD (msnm)	POBLACION OBJETIVO
Guachucal	1. Obando	3180	3300 productores/transformadores
Aldana		3050	
Cuaspud carlosama		3050	
Cumbal		3050	
Contadero		2475	
Córdoba		2867	
Gualmatan		2.870	
Iles		2985	
Ipiales		2900	
Potosí		2750	
Puerres		2817	
Pupiales		3014	
Pasto		2. Centro	
Tangua	2400		
Nariño	2467		
La florida	2077		
Mallama	3. Piedemonte costero	1809	
Buesaco	4. Juanambu	1959	
Guaitarilla	5. Sabana	1800	
Túquerres		3104	
Ospina		2700	
Sapuyes		2900	

MUNICIPIOS DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO



- 1- ALBÁN
- 2- ALDANA
- 3- ANCUYÁ
- 4- ARBOLEDA
- 5- BELÉN
- 6- CHACHAGÜÍ
- 7- COLÓN
- 8- CONSACÁ
- 9- CONTADERO
- 10- CUASPÚD
- 11- GUACHUCAL
- 12- GUAITARILLA
- 13- GUALMATÁN
- 14- IMUÉS
- 15- LA FLORIDA
- 16- NARIÑO
- 17- OSPINA
- 18- PROVIDENCIA
- 19- PUPIALES
- 20- SAN BERNARDO
- 21- SAN PEDRO DE CARTAGO
- 22- SANDONÁ
- 23- TÚQUERRES
- 24- YACUANQUER

Municipios donde se localiza la población objetivo

0 25 50 km

www.mapasparacolorear.com

Fuente de los datos:
DANE / Colombia

2.4. Impacto territorial y nivel de replicabilidad del proyecto en Colombia.

El proyecto tiene incidencia en 22 municipios con mayor producción de leche en el departamento de Nariño, que representan un volumen de 869.050 L/d, o sea un 93% de un total de 931.508 L/d, de acuerdo al último informe de encuesta láctea disponible (SAGAN, 2019). En dichos municipios se concentran la mayor parte de centros de acopio y microempresas procesadoras de derivados lácteos, cuyo número es incierto, ya que existe un alto nivel de informalidad, pero se estima supera las 200 unidades productivas, muchas de las cuales son de subsistencia familiar, otras son de mayor tamaño, contando con varios empleados y también están las asociaciones de productores de leche que han constituido centros de acopio y transformación.

El proyecto pretende en su primera fase realizar un diagnóstico técnico y económico social de dichas unidades productivas, con el fin de partir de una línea base y contar con información que permita diseñar las actividades de capacitación que se plantea desarrollar en una etapa posterior. Como se ha mencionado anteriormente, en cada municipio se buscará contar con una unidad acopiadora/procesadora que será aliada y beneficiaria del proyecto, en la cual se llevarán a cabo actividades de capacitación y transferencia de resultados, la cual a su vez servirá como nodo para replicar los aprendizajes y la tecnología hacia otras microempresas del área de influencia del mismo municipio.

De acuerdo al contexto presentado en el Manual de Solicitud del Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados en Colombia (Ministerio de Medio ambiente y desarrollo sostenible, 2016), Colombia es un país megadiverso por su ubicación y características geográficas, cuenta con una amplia variedad de especies biológicas que aún no han sido objeto de estudio y, en algunos casos, están por descubrir, como sucede con la mayoría de los microorganismos. Conocer qué tenemos en materia de biodiversidad es el punto de partida para gestionar el uso sostenible de los recursos genéticos del país, de tal forma que se garantice la conservación de las especies y, a su vez, se contribuya al desarrollo económico a través de su potencialidad para la generación de productos innovadores.

Todas las metodologías para el aislamiento de bacterias ácido lácticas, conservación, evaluación de actividad antagónica contra patógenos, caracterización bioquímica, identificación molecular, evaluación de características tecnológicas deseables, estudio de propiedades de seguridad alimentaria, desarrollo y evaluación de un fermento láctico, que serán implementadas con el proyecto con el apoyo de expertos del Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), podrán ser replicadas en otros centros de investigación del país, de tal forma que los objetivos, resultados y productos esperados con la ejecución de este proyecto también podrían beneficiar a las demás regiones con alta producción de leche en Colombia.

Considerando lo anterior, el proyecto propuesto se consolida como un piloto que puede ser replicable y modelo a nivel nacional en estudios de bioprospección de microorganismos con potencial biotecnológico en la cadena láctea.

3. ESTADO DEL ARTE

3.1. Calidad higiénica de la leche cruda en el mundo

En los países industrializados, los brotes de enfermedades transmitidas por la leche o derivados lácteos, representan 2 – 6% de los brotes de bacterias transmitidas por los alimentos. Aunque no existen cifras ciertas acerca del consumo de leche cruda, en el contexto de la tendencia actual de “consumo natural” y “compre localmente”, esta práctica se ha hecho popular. Esto nace de la percepción de que los procesos térmicos de higienización destruyen los beneficios nutricionales y saludables de la leche (Claeys et al., 2013).

El impacto de la pasteurización de leche sobre la salud pública ha sido muy positivo. Antes de 1938, se estima que el 25% de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA´s) estuvieron asociados a leche; actualmente se calcula que esa cifra es inferior al 1% (FDA, 2005).

En Europa, el criterio regulatorio actual para leche cruda de vaca son <100.000 UFC/mL para recuento en placa a 30°C y <400.000 UFC/mL para células somáticas. En general, la leche cruda para consumo humano debe estar libre de patógenos. Aunque las mejoras en higiene lograron disminuir los recuentos a niveles inferiores a 20.000 UFC/mL, ello no garantiza que la leche cruda esté libre de patógenos (Reu et al., 2004). Entre 1 – 6% de los incidentes reportados en los países en desarrollo, han identificado a la leche como el vehículo de infección (European Food Safety Authority, 2010).

Una revisión del reporte de enfermedades transmitidas por los alimentos de diferentes países industrializados indica que la leche y los productos lácteos están implicados en 1 – 5% del total de brotes, con 39,1% atribuido a la leche, 53,1% al queso y 7,8% para otros productos lácteos (De Buyser et al., 2001).

Salmonella spp., *Campylobacter* spp., *E. coli* O157:H7, *Y. enterocolitica* y *L. monocytogenes* así como *S. aureus* son los agentes más frecuentemente identificados como causantes de ETA´s debido al consumo de leche cruda o de productos elaborados con ella (Oliver et al., 2009). Considerando solo el consumo de leche cruda como fuente de ETA´s, se han reportado tres microorganismos en orden decreciente de frecuencia reportada: *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *E. coli* patogénico (O157:H7) y no patogénico (Griffiths, 2010).

3.2. Calidad higiénica de la leche cruda en Colombia

De acuerdo con la Unidad de Seguimiento de Precios (USP) del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) el 37,65% de las leches producidas en el primer semestre de 2009, presentaron recuentos de bacterias mesófilas aerobias mayores de 700.000 UFC/mL, límite máximo permitido en la normativa vigente, indicando que esta leche presenta una calidad inferior a la exigida (Ministerio de Salud y Protección Social et al., 2011).

Estos altos recuentos pueden deberse a deficientes condiciones higiénicas de los establos, a la falta de implementación de Buenas Prácticas de Ordeño (Rodríguez R. et al., 2014), condiciones inadecuadas de temperatura, tipo de transporte, mezcla de leches en la ruta y largos periodos de tiempo de transporte (superiores a 4 horas), entre otros factores.

Desde el punto de vista tecnológico, los altos recuentos de células somáticas y de mesófilos durante el proceso de transformación de la leche, reducen la vida útil de los productos y disminuyen los rendimientos queseros (Rodríguez R. et al., 2014), promoviendo el deterioro o proteólisis de las caseínas (Signorini et al., 2008)

3.3. Población microbiana patógena de la leche cruda.

Los estudios realizados en Colombia sobre la calidad de la leche cruda, muestran la prevalencia en todo el país de cinco especies de bacterias patógenas: *Brucella abortus*, *Brucella* spp., *L. monocytogenes*, *Mycobacterium bovis*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*. Los hallazgos de las distintas investigaciones revelan que las causas de contaminación son diversas, desde alimentación con ensilajes de mala calidad hasta deficientes condiciones de ordeño, transporte y almacenamiento (Neira Bermúdez y de Silvestri Saade, 2016); algunos datos varían de acuerdo con la época del año en que se tomaron las muestras (Moreno Vásquez et al., 2012).

Se destaca el estudio realizado sobre la calidad de leche utilizada en la fabricación de queso Paipa, donde el recuento de mesófilos aerobios viables de la leche variaron entre $4,6 \times 10^3$ y $2,8 \times 10^5$ UFC/mL; el recuento de mohos y levaduras estuvo entre $1,0 \times 10^1$ y $1,0 \times 10^3$ UFC/mL. Los recuentos de microorganismos patógenos de *S. aureus* variaron entre $1,3 \times 10^2$ y $1,9 \times 10^5$ UFC/mL, valores que se encuentran por encima de 500 UFC/mL, valor máximo permitido en quesos madurados. En cuanto a coliformes, los valores estuvieron en el orden de $1,8 \times 10^2$ y $1,5 \times 10^4$ y para los fecales fueron de entre $1,2 \times 10^1$ y $1,5 \times 10^3$ UFC/mL. También se detectó presencia de *Salmonella* sp en la leche de 7 de los 10 proveedores estudiados y *L. monocytogenes* se detectó en 5 de los 10 proveedores estudiados. Los resultados presentados no tuvieron variación significativa después de la capacitación impartida a los usuarios (Neira Bermúdez y de Silvestri Saade, 2006).

En el oriente antioqueño, se determinó que los mesófilos fluctuaron entre $4,5 \times 10^3$ y 2×10^6 , con un promedio de 1×10^5 UFC/mL (Ruiz et al., 2012).

Los estudios realizados por los Laboratorios de las Direcciones Territoriales de Salud (DTS) de Cundinamarca, Distrito Capital, Santander, Nariño, Quindío y Risaralda a 2.400 muestras de leche cruda, indican que sólo al 0,25% se les realizó análisis para la detección de *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp, reportando ausencia de estos microorganismos. Con respecto a *S. aureus*, solo el 0,29% de las muestras fueron analizadas para este patógeno, encontrándose 4 con recuentos menores a 10^2 UFC/mL (1 de comercialización, 3 de vivienda) y las 3 restantes (ventas ambulantes) presentaron recuentos de $4,8 \times 10^3$, $8,7 \times 10^3$ y $8,9 \times 10^3$ UFC/mL respectivamente (Ministerio de Salud y Protección Social, 2011).

De este análisis se concluye que la carga microbiológica patógena de la leche cruda es muy importante como posible fuente de contaminación en quesos, dado que los recuentos son muy altos y superan los valores máximos aceptados en Colombia y otros países.

3.4. Estudios sobre aislamiento de BAL en quesos tradicionales

La tipificación microbiana del queso puede servir al propósito de evaluar sus condiciones higiénicas y ayudar en el diseño de un cultivo iniciador específico. Además, el interés en la microbiota de quesos de leche cruda y productos lácteos tradicionales se mantienen por la reconocida necesidad de nuevas cepas de BAL para reemplazar las cepas industriales actualmente en uso (Alegria et al., 2009).

En la última década, ha habido una explosión en investigación básica y aplicada sobre las bacteriocinas producidas por BAL, debido a su potencial como bioconservantes e inhibición del crecimiento de bacterias deteriorantes (Favaro et al., 2015).

Las bacterias ácido lácticas se consideran como organismos de grado alimenticio que son seguros para consumir (GRAS), con una larga historia de uso en los alimentos. Debido a su capacidad de producir varias sustancias antimicrobianas, incluyendo las bacteriocinas, tienen el potencial para ser utilizadas en bio-preservación (Rivas et al., 2012).

Los quesos tradicionales han sido una buena fuente de aislamiento de BAL, con fines de estudio o búsqueda de propiedades tecnológicas nuevas. En Europa se ha trabajado con aquellos que cuentan con Denominación de Origen Protegida (DOP).

La falta de uniformidad en la mayoría de los quesos de leche cruda artesanal, fabricados sin un procedimiento tecnológico estandarizado, limita su aceptación y su distribución en los mercados internos y extranjeros (Herrerros et al., 2007).

Los defensores de los quesos tradicionales recomiendan que se mantenga alta diversidad taxonómica en las comunidades microbianas indígenas del queso y las diversas prácticas de fabricación. Sus argumentos se basan en el hecho de que una gran diversidad de actividades microbianas, combinadas con los métodos tradicionales de fabricación, es la clave para que los quesos tradicionales desarrollen sus características particulares, incluyendo bajo riesgo de patógenos y diversificación de las características gustativas. La microbiota de la leche cruda es una parte importante de la microbiota de muchos quesos tradicionales (Montel et al., 2014).

En esta búsqueda, algunos investigadores han encontrado gran diversidad de cepas y su uso o utilidad. En queso "Torta del Casar", Ordiales et al., (2013) encontraron que los géneros de BAL predominantes fueron *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, y las enterobacterias *Serratia proteamaculans* y *Enterococcus devriesei*. El desarrollo de patógenos fue similar en los cuatro grupos de quesos estudiados. Las pequeñas diferencias encontradas para algunos patógenos (*Salmonella* spp y *Listeria* spp.) pueden atribuirse a la interferencia con la microbiota autóctona diferente. De hecho, esta parece influir en la textura de los quesos y el desarrollo de patógenos en ellos.

Alegría et al., (2010) aislaron bacterias a partir de quesos mexicanos producidos sin cultivos iniciadores y en distintas etapas de fermentación. De las 60 cepas encontradas, se probó que 17 producían compuestos parecidos a bacteriocinas en sólido y líquido. A nivel genotípico, 16 de las cepas fueron identificados por métodos moleculares como pertenecientes a *L. lactis* subsp *lactis* y uno a *L. lactis* subsp. *cremoris*. Entre las cepas *L. lactis* subsp *lactis*, datos fenotípicos y genéticos determinaron que once produjeron nisina A (nueve cepas) o nisina Z (dos cepas) y que cinco produjeron lactococcin 972. Niveles variables de las dos bacteriocinas fueron producidos por diferentes cepas. Además, la producción de nisina, se hizo en medios baratos basados en productos lácteos y carne, que permitirán la aplicación práctica de sus cepas productoras en procesos industriales.

Otro estudio evaluó la actividad antibacterial de tres cepas productoras de bacteriocinas de *Enterococcus faecium* (TW15, TW20 y TW22) aisladas de la leche de las ovejas y queso muestreados en la región patagónica de Argentina. Las cepas fueron probadas contra microorganismos patógenos y descomponedores, mostrando actividad antimicrobiana hacia 4 cepas de *Listeria monocytogenes*, una cepa de *Listeria innocua* y 2 cepas de *Staphylococcus aureus* (Rivas et al., 2012).

Dos técnicas, PCR-electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (PCR-DGGE) y cultivo convencional, se utilizaron para estudiar la diversidad de BAL en dos quesos de leche cruda tipo Gouda flamencos artesanales. Los aislamientos fueron identificados usando (GTG) 5-PCR y la secuencia de análisis de genes 16S rRNA e ICP. El análisis discriminante reveló algunas diferencias en la diversidad de laboratorio entre los dos lotes y entre los dos quesos. Dentro de cada lote, la diversidad de quesos a las 8 y 12 semanas de edad era relativamente similar. El aislamiento convencional reveló la presencia de *Lactobacillus paracasei*,

Lactobacillus plantarum, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Pediococcus pentosaceus*. PCR-DGGE reveló la presencia de tres especies de las cuales no fueron recuperados aislados, es decir, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus parabuchneri* y *Lactobacillus gallinarum*. Por el contrario, no todas las bacterias aisladas fueron detectadas por PCR-DGGE. Los autores recomiendan el uso de métodos independientes y dependientes del cultivo para abarcar el máximo espectro taxonómico de BAL que se producen en este y otros quesos (Van Hoorde et al., 2008).

La diversidad de la población de BAL dominante en quesos Parmigiano Reggiano maduros (12 meses) fue investigada por un enfoque polifásico incluyendo los métodos dependiente e independiente del cultivo. Los métodos tradicionales de placa, aislamiento e identificación por análisis del rDNA 16S demostraron que cepas pertenecientes al grupo de *Lactobacillus casei* fueron los más frecuentemente aislados. Especies de *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus parabuchneri* y *Lactobacillus buchneri* fueron detectadas con menor frecuencia. Por medio de la utilización de PCR - DGGE aplicada al ADN extraído directamente de muestras de queso del gel y la secuencia del amplicones de rDNA confirmó el complejo patrón microbiológico de laboratorio en quesos de Parmigiano Reggiano maduros, con la significativa excepción de la especie *Lactobacillus fermentum*, que dominó en varias muestras, pero no fue detectada por el cultivo. Esta combinación de los diferentes enfoques puede describir eficazmente la población de BAL de queso Parmigiano Reggiano en etapas avanzadas de la maduración, dando información útil para dilucidar el papel las BAL sobre la calidad final del queso (Gala et al., 2008).

La biodiversidad y dinámica del crecimiento de BAL en quesos artesanales Ossau-Iraty fueron investigadas a 180 días de maduración en seis lotes independientes de leche cruda de oveja con cinco métodos de fabricación. Un iniciador comercial S1 fue utilizado para tres lotes, la combinación del S1 con S2 para un lote y ningún iniciador para dos lotes. Diez especies de BAL de cinco géneros y dos cepas por especie fueron identificadas por leche; once especies de cinco géneros y tres cepas por especies fueron identificadas por queso. *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* y *Leuconostoc mesenteroides* fueron detectados en todos los quesos. Los Lactococos alcanzaron los recuentos más altos independientemente de la leche y el cultivo iniciador utilizado. Lactococos y enterococos aumentaron durante la fabricación y los lactobacilos mesófilos se incrementaron durante la maduración. El número de especies y cepas, el porcentaje de aislamientos procedentes de la leche cruda, el recuento máximo de cada género/especie y tiempo para alcanzarlos, todos variaban según se haya o no utilizado un cultivo iniciador y su composición. Los genotipos de cepas dentro de las especies varían según la leche cruda utilizada. Esto ha generado distintas microbiotas BAL a lo largo de fabricación y maduración que ciertamente tendrá un impacto sobre las características de los quesos madurados (Feutry et al., 2012).

Veinte quesos pertenecientes a las cuatro designaciones de origen protegida fabricados en Galicia (6 Arzúa-Ulloa, 4 Tetilla, 6 Cebreiro y 4 San Simón da Costa) fueron seleccionados de un total de 60 quesos sobre la base de sus perfiles sensoriales (típicos). Un total de 218 cepas de BAL se obtuvieron de la microflora predominante de los quesos seleccionados y fueron identificados como Lactococos (98 aislamientos), Leuconostoc (56), lactobacilos mesófilos (54), Pediococos (8) y enterococos (2). Ochenta y cuatro de los aislamientos produjeron principalmente sabores malteado, picante o sulfuro en leche entera pasteurizada y no se caracterizaron más. Algunos buenos productores de diacetil-acetoína en leche (4.100 mg/L) se encontraron entre un total de 129 BAL seleccionadas, aunque los aislados eran generalmente menos acidificantes y menos proteolíticos que muchos de los obtenidos hace 10 – 15 años. Los resultados sugieren que la microflora en los ambientes queseros ha sufrido cambios, siendo la diferencia más evidente la ausencia de cepas de enterococos entre los aislados (Garabal et al., 2008).

La presencia de BAL en queso Bukuljac, producido a partir de leche de cabra tratada térmicamente sin la adición de cultivo iniciador bacteriano ha sido analizada utilizando un enfoque polifásico incluyendo métodos microbiológicos y moleculares como rep-PCR con un primer (GTG)5. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* se identificó como la cepa dominante en la microflora de queso analizado. De 55 aislamientos Gram-positivos y catalasa negativo, 48 pertenecieron a la especie *L. paracasei* subsp. *paracasei*. Además de los lactobacilos, se encontraron cinco *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y dos *Enterococcus faecalis*. Los resultados de PCR-DGGE del ADN extraído directamente del queso fresco revelaron la presencia de *Leuconostoc mesenteroides*. Sólo los lactobacilos demostraron una alta actividad proteolítica e hidrolizado α 1- y β -caseínas. También son productores de diacetilo. Además, 34 de 55 aislados, todos determinados como lactobacilos, mostraron capacidad de auto agregación. Entre 55 aislados, 50 exhibieron actividad antimicrobiana (Nikolic et al., 2008).

3.5. Estudios sobre actividad bioprotectora de BAL aisladas de derivados lácteos.

Los derivados lácteos han sido utilizados como fuente para buscar cepas de BAL con alguna actividad antimicrobiana; de particular interés para esta investigación son aquellos trabajos en los que se ha buscado cepas con actividad contra *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. aureus*, bacterias identificadas en los quesos artesanales producidos en Nariño.

Los estudios muestran que son diversas las fuentes de aislamiento utilizadas para buscar BAL con alguna actividad contra las mencionadas bacterias. Se han utilizado preferiblemente quesos artesanales (Valdés-Stauber and Scherer, 1994; Herbin et al., 1997; Miteva et al., 1998).

Muchos grupos microbianos producen bacteriocinas, péptidos y proteínas con actividad bactericida. Las bacteriocinas de algunas bacterias inhiben el crecimiento de microbios estrechamente relacionados, mientras que otras inhiben una gama mucho más amplia de microorganismos, incluyendo los patógenos transmitidos por los alimentos y los microorganismos deteriorantes tales como *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium tyrobutyricum* (Alegría et al., 2010).

En la actualidad, las cepas de BAL son analizadas también por sus propiedades probióticas y capacidad para formar compuestos bioactivos. Los aspectos de particular interés para la industria láctea incluyen: resistencia a bacteriófagos, producción de sustancias antimicrobianas y potencial de formación de sabor único.

Las cepas con propiedades nuevas o mejoradas pueden ser útiles para satisfacer las necesidades de las fermentaciones tradicionales o utilizarse para la formulación de nuevos productos lácteos funcionales (Alegría et al., 2009).

Investigadores que han estudiado la aplicación de bacteriocinas y/o cepas productoras de bacteriocinas en productos lácteos han demostrado su efectividad contra diversas bacterias patógenas tales como *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Salmonella spp.* y *L. monocytogenes*.

Los estudios prueban la efectividad de las BAL como agentes de biocontrol, como lo reportan Aslim et al., (2005). Estas actividades inhibitorias han sido identificadas en cepas de *L. plantarum* (10), *Lactobacillus fermentum* (25) y *L. acidophilus* (1 cepa) originarias de productos lácteos de Turquía, donde sustancias similares a bacteriocinas, mejoraron la actividad anti microbiana de los ácidos orgánicos y el peróxido de hidrógeno contra *E. coli*, *Yersinia enterocolitica* y *S. aureus*. Adicionalmente, estas sustancias son termoestables y pueden usarse como bioconservantes.

Asimismo son diversas las especies de BAL aisladas con actividad antimicrobiana; las más comúnmente encontradas son *L. plantarum* y *L. paracasei* (Cheong et al., 2014), *Ent. faecalis* (Jokovic et al., 2008), *Lactobacillus delbrueckii* sp. (Miteva et al., 1998), entre otros. Todos ellos han mostrado actividad contra *L. monocytogenes* y algunos un amplio rango de actividad contra otros microorganismos, incluyendo mohos y levaduras (Ortigosa et al., 2001).

Fenelon et al., (1999) usaron una cepa productora de lacticina 3147 como iniciador en queso Cottage al cual se le inoculó 10^4 UFC/g de *L. monocytogenes*; la actividad de la lacticina 3147 fue detectada a lo largo de los 6 días de almacenamiento y fue asociada con una reducción de 10^3 en la población de *Listeria* en queso almacenado a 4°C y la velocidad de muerte fue mayor en quesos almacenados a temperaturas mayores. Esos resultados demostraron la efectividad de la lacticina 3147 como un inhibidor de *L. monocytogenes* en un sistema alimenticio donde la contaminación post manufactura por este microorganismo puede ocurrir. También comprobaron la efectividad de una cepa productora de lacticina 3147 en inhibir *L. monocytogenes* en quesos madurados por mohos. Esta cepa se inoculó sobre la superficie de los

quesos, los cuales pueden constituir un riesgo de contaminación con listeria y permitir el crecimiento, ya que el pH de la superficie de los quesos madurados puede exceder a 7.

Yang et al., (2012), aislaron BAL a partir de 7 quesos comerciales y probaron su efectividad contra *L. innocua*. Los resultados muestran que las ocho cepas de BAL seleccionadas, inhibieron el crecimiento de todas las bacterias y hongos de prueba, excepto *E. coli*. Los autores también inocularon las BAL seleccionadas en cebollas y encontraron que estos aislamientos inhibían significativamente el crecimiento de *Pseudomonas* sp. y Lac⁺ *Enterobacteriaceae* durante el almacenamiento a 5°C.

Otros estudios similares han probado que las bacteriocinas aisladas de BAL tienen un amplio campo de aplicación en alimentos vegetales y en productos cárnicos, donde se utiliza ampliamente la nisina (bacteriocina) para disminuir el uso de nitratos e inhibir el crecimiento de *Clostridium* (Cleveland et al., 2001).

3.6. Estudios de los efectos de la actividad de BAL sobre la calidad de queso

El efecto de la adición de BAL sobre la calidad fisicoquímica y sensorial de diversos quesos ha sido un tema de investigación recurrente en la última década, debido a que el uso generalizado de cultivos comerciales en quesos fabricados a partir de leche pasteurizada, generalmente resultan en la pérdida de las características típicas de los quesos artesanales fabricados con leche cruda, porque el reemplazo de la flora microbiana compleja presente en la leche cruda por las cepas de cultivo iniciador estándar, tiende a cambiar sus características (Mendia et al., 2000).

En el estudio de la influencia de la pasteurización y la inoculación con un cultivo iniciador nativo, sobre las características fisicoquímicas y sensoriales de queso de leche de oveja, Mendia et al., (2000) concluyeron que la proteólisis en el queso pasteurizado inoculado mostró un comportamiento diferente a los quesos sin pasteurizar. La degradación de las α -caseínas fue 15-20% más alta y la degradación de la β -caseína 5% mayor. El contenido de nitrógeno soluble fue 25% más alto, y el contenido del aminoácido asparagina fue 50% mayor, al igual que el contenido de tirosina y taurina. En el análisis sensorial, este queso mostró una calificación inferior en el atributo sabor característico.

Resultado distinto reportan otros autores quienes concluyen que el queso ahumado pasteurizado e inoculado con cultivo iniciador nativo no mostró diferencias en su perfil sensorial con el queso tradicional elaborado con leche cruda (Alvarado et al., 2007).

Al estudiar la influencia de un cultivo láctico productor de bacteriocinas sobre el queso Hispánico, se encontró que el queso producido con leche inoculada mejora la formación de hexanal, 2-metil-1-propanol, 3-metil-1-butanol, acetona, 2-pentanona, 2-hexanona y 2-heptanona, pero disminuyó la formación de acetaldehído, etanol, 3-methyl-3-buten-1-ol, 3-methyl-2-buten-1-ol, acetato de etilo, etil butanoato, hexanoato de etilo, 2-butanona, 2,3-butanediona, 2,3-pentanediona y 3-hidroxi-2-butanona. El queso experimental recibió puntuaciones más altas que

el control para el descriptor de olor "queso limpio" y el descriptor de aroma "a oveja", pero la calidad e intensidad de olor y aroma no fueron influenciados por la inoculación de la leche con los cultivos productores de bacteriocina (Garde et al., 2005).

En queso Serra da Estrela, inoculado con cepas nativas de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* ESB110019 y *Lactobacillus plantarum* ESB5004 independientemente o combinados, se demostró que los quesos elaborados con estos cultivos mostraron niveles significativamente inferiores de *Enterobacteriaceae* que aquellos elaborados sin iniciador; los recuentos de enterococos y estafilococos se incrementaron significativamente después de la adición de *L. lactis* o *Lb. plantarum*, respectivamente. La proteólisis no se vio afectada por las BAL en comparación con el control sin iniciador, pero *L. lactis* logró un incremento de 2% del contenido de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético al 2% (TCASN); ambas cepas lograron un incremento significativo del TCASN al 12%. Los puntajes de aroma y textura de los quesos control fueron ligeramente superiores a aquellos de los quesos experimentales fabricados con el iniciador (Macedo et al., 2004).

Awad et al., (2007) aislaron 18 cultivos iniciadores de derivados lácteos egipcios y evaluaron su efecto sobre el desarrollo de sabor en queso Ras. Ninguno de los cultivos utilizados tuvo efecto sobre la composición química del queso; siete de los cultivos probados produjeron un sabor y textura aceptables. La puntuación total más alta de intensidad de sabor, olor y textura se obtuvieron en quesos elaborados con cultivo iniciador comercial adicionado con las cepas nativas de *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* y *Enterococcus faecium*. Los autores afirman que estos cultivos pueden utilizarse para la fabricación del queso Ras elaborado con leche pasteurizada.

Se concluye de la información presentada, que los cultivos de BAL nativas poco o nada influyen en la calidad final de los quesos artesanales que se fabrican usualmente con leche cruda y que, además, tales cultivos pueden contribuir a mejorar la inocuidad del producto, ya sea introduciendo el proceso de pasteurización o por la producción de sustancias como las bacteriocinas con efecto bioprotector.

4. JUSTIFICACION

Mediante un análisis sistémico se pudo identificar como problema central de la cadena láctea en Nariño “ **BAJO NIVEL DE INOCUIDAD EN QUESOS FRESCOS ASOCIADO A DEFICIENTE CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA PRODUCCION QUESERA ARTESANAL EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO**”, ya que éste afecta la calidad y vida útil del producto, y, por tanto, las utilidades y competitividad de las microempresas vinculadas a dicha actividad. Adicionalmente se pone en riesgo la la salud de los consumidores. A continuación se justifica desde diferentes entornos la importancia de realizar investigaciones orientadas a proponer soluciones al problema identificado.

4.1. Entorno económico-social: importancia de inversión en ciencia y tecnología para la cadena láctea en Nariño.

La cadena láctea representa una de las más importantes cadenas productivas en el departamento, con más de 40 mil familias nariñenses que viven de la producción y comercialización de derivados de la leche. La producción de leche de Nariño, aporta aproximadamente el 27% del PIB del sector agropecuario y un 64% del PIB pecuario, vinculando a 159.448 personas de forma directa en la producción de leche. Simultáneamente, se registra un total de 115 empresas asociativas e individuales, generando 8.100 empleos directos adicionales, en donde más del 50% es ocupado por mujeres (Delgado-Guerrero, 2012).

Con la apertura de los Tratados de Libre Comercio con Estados Unidos y Europa, este sector de la economía deberá enfrentar grandes retos desde el punto de vista de su modernización productiva y competitiva. Por ello, es necesario estudiar y resolver los problemas de competitividad, innovación, calidad y costos, como los factores que definirán el futuro de la cadena láctea de Nariño y por ende el de millares de personas que dependen exclusivamente de esta actividad en sus diversos procesos, desde la producción primaria, el transporte y el acopio hasta el eslabón industrial.

La transformación de la leche en el departamento está orientada principalmente a la producción de quesos frescos, siendo el queso fresco tipo campesino una de las variedades con mayor consumo. Teniendo en cuenta las operaciones para su obtención y sus características fisicoquímicas este es un queso muy susceptible de ser contaminado fácilmente, disminuyendo su periodo de vida útil, afectando su inocuidad y por tanto presentando riesgos para los consumidores.

Dadas estas condiciones y características productivas de la transformación de la leche en las cuencas lecheras del departamento, se considera prioritario contribuir en el mejoramiento de la calidad del queso fresco campesino, considerando su alto nivel de consumo, no solamente en el departamento sino también en departamentos como Cauca y Valle.

4.2. Entorno político: el mejoramiento de la inocuidad como política para la competitividad de los productos agroalimentarios.

El gobierno nacional a través del documento CONPES 3676 (2010) “Consolidación de la Política Sanitaria y de Inocuidad para las Cadenas Láctea y Cárnica” justifica la importancia de mejorar las condiciones de calidad higiénico sanitaria de la leche y sus derivados, pues ello contribuye a una mayor admisibilidad de la producción nacional en los mercados de interés, el mejoramiento de la salud pública y la competitividad de las cadenas (DNP, 2010).

Esta política tiene por finalidad solucionar problemas como los siguientes:

- a) El estatus sanitario de la producción primaria.
- b) Los programas preventivos para la inocuidad.
- c) Las condiciones sanitarias de los establecimientos de procesamiento de leche y sus derivados
- d) Los planes subsectoriales (PSS) de vigilancia y control de residuos de medicamentos veterinarios y contaminantes químicos y de patógenos.
- e) La capacidad de gestión del riesgo de las autoridades nacionales y territoriales.
- f) El acceso sanitario a mercados priorizados.

La importancia de garantizar la sanidad e inocuidad en los derivados lácteos producidos en el departamento de Nariño radica en la necesidad de disminuir el riesgo de la presencia de enfermedades y de salvaguardar el bienestar de las personas, garantizando que los productos se comercialicen con la máxima certidumbre sobre su procedencia y calidad sanitaria. Esto se traduce en un razonable grado de confianza de los consumidores hacia los productos que adquieren y esto logra mayor posibilidad de acceder exitosamente a los mercados logrando así mejorar la competitividad de las microempresas transformadoras.

La investigación sobre medidas para mejorar la inocuidad de los productos agroalimentarios, tiene implicaciones en los costos referidos a la salud pública, en los sistemas productivos y en las transacciones comerciales. Por esta razón, es necesario fortalecer su adopción, para garantizar así un nivel adecuado de protección y brindar la seguridad requerida para el comercio, evitando que la baja calidad higiénico-sanitaria se convierta en trabas injustificadas para poder acceder a los mercados de manera eficiente.

Existe una estrecha relación entre el mejoramiento de la competitividad de los productos agropecuarios colombianos y el fortalecimiento del sistema de medidas sanitarias, la política nacional en esta materia ha planteado diferentes acciones para fortalecer la capacidad científica y técnica del Sistema Nacional de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias, entre estas actividades se encuentra promover la adopción de sistemas preventivos como son las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Buenas Prácticas Ganaderas (BPG), Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP).

A partir del 2008, con la organización de los procesos de Inspección, Vigilancia y Control en el sector productivo nacional, el fortalecimiento como Autoridad Sanitaria Nacional (ASN) a través de la optimización de la capacidad instalada y el mejoramiento de las condiciones sanitarias de procesamiento en los establecimientos objeto de vigilancia en materia de alimentos, se inicia la labor de gestión en admisibilidad sanitaria para tener un mejor acceso a mercados.

Realizar procesos de investigación relacionados con el mejoramiento de la inocuidad y de la calidad de los productos lácteos en Nariño permitirá una mayor admisibilidad de la producción regional en los mercados de interés, el mejoramiento de la salud pública y la competitividad de los actores de la cadena láctea, especialmente aquellos microempresas queseras que son el sustento económico de cientos de familias en Nariño.

4.3. Entorno legal: obligatoriedad para garantizar la inocuidad en los productos alimentarios y la salud de los consumidores

La Resolución 2674 de 2013 establece que obligatoriamente todas las fábricas de alimentos deben contar con un sistema de control y aseguramiento de la calidad, el cual debe ser esencialmente preventivo y cubrir todas las etapas de procesamiento del alimento, desde la obtención de materias primas e insumos, hasta la distribución de productos terminados. Todo establecimiento destinado a la fabricación, procesamiento, envase y almacenamiento de alimentos debe implantar y desarrollar un Plan de Saneamiento con objetivos claramente definidos y con los procedimientos requeridos para disminuir los riesgos de contaminación de los alimentos. Estos aspectos serán abordados en el proyecto desde la fase de caracterización de los sistemas productivos de las queserías artesanales y la posterior realización de procesos de capacitación orientados al mejoramiento de las condiciones sanitarias de procesamiento y de la calidad de los productos.

El uso de cultivos microbianos como elemento de bioprotección en la fabricación de quesos está permitido por la resolución 2310 de 1986, que establece que se pueden adicionar mohos y/o cultivos lácticos con actividades específicas. En este caso aquella función específica sería la de contrarrestar la proliferación de microorganismos patógenos.

4.4. Entorno científico tecnológico: importancia de la investigación y el desarrollo tecnológico para la cadena láctea.

El Plan de Ciencia y Tecnología de Nariño prioriza al sector lácteo por su importancia para la economía regional y sus aportes al producto interno bruto, estableciendo como una de las líneas prioritarias de Investigación la innovación de productos y subproductos de transformación agroindustrial.

4.5. Contribución del proyecto a la política pública

De acuerdo al Plan Nacional de Desarrollo 2018-2022 Pacto por Colombia, el proyecto se enmarca dentro del plan estratégico No 5 “Pacto por la Ciencia, La tecnología y la Innovación: Un sistema para construir el conocimiento de la Colombia del futuro, Programa de de Tecnología e investigación para el desarrollo productivo y social.

Dentro del “Plan Estratégico de Ciencia, Tecnología e Innovación del Sector Agropecuario Colombiano” (PECTIA, 2017), el proyecto se enmarca dentro del objetivo estratégico 1 “incrementar la productividad y competitividad de los sistemas productivos agropecuarios para el cambio técnico y la generación de valor mediante actividades de I+D+i y soluciones enfocadas en las demandas. Dentro de dicho objetivo estratégico uno de sus objetivos específicos es “lograr la generación, acumulación, socialización y aplicación del conocimiento para el cambio técnico de alto efecto en la competitividad, productividad y sostenibilidad de la industria agraria colombiana”.

Por otro lado, en el Eje IV: Desarrollo Integral, del Plan de Desarrollo Departamental de Nariño 2016 - 2019, se contemplan (entre otros) el subprograma "Desarrollo Productivo Agroindustrial", que busca fomentar empresas transformadoras y comercializadoras derivadas del aprovechamiento de los productos agrícolas, pecuarios y pesqueros; también el subprograma "Ciencia, Tecnología, Investigación e Innovación Social en el Sector Agropecuario y agroindustrial", cuyo propósito es promover una articulación institucional del orden regional, nacional, internacional y con la academia para la implementación de proyectos de CT&I adaptados a las necesidades de las cadenas productivas, sistemas productivos y especies promisorias.

Adicionalmente, el Plan Regional de Competitividad de Nariño 2010- 2032 plantea como visión ser reconocido como un departamento emprendedor y competitivo por aprovechar eficientemente las potencialidades de las subregiones que lo conforman y haberse consolidado como productor y comercializador agroindustrial para Colombia y el mundo, estableciendo como una de las estrategias para el logro de dicha visión “desarrollar procesos de innovación tecnológica para posicionamiento nacional e internacional de productos y servicios de alto valor agregado”.

Los anteriores aspectos demuestran que el proyecto propuesto está alineado y es pertinente con las políticas y planes nacionales y departamentales de desarrollo, lo que justifica en primera instancia su ejecución.

Los resultados del proyecto permitirán la generación de nuevo conocimiento, la formación de personal científico en el área, el desarrollo del know-how del proceso y del producto, con unos impactos que se podrían evidenciar a corto, mediano y largo plazo, como son la mejora en las capacidades competitivas de las microempresas queseras de la región, la reducción de riesgos para la salud pública,

y el posible desarrollo de productos innovadores o con denominación de origen protegido mediante la aplicación de cepas de bacterias ácido lácticas autóctonas, entre otros impactos que se describen más adelante.

4.5.2. Planes de Desarrollo municipales (2016-2019)

El proyecto se enmarca en los siguientes planes de desarrollo de los municipios objeto de estudio.

- Guachucal: Plan de desarrollo municipal “Guachucal municipio modelo, en paz con la vida y el ambiente”
- Aldana: Plan de desarrollo Municipal paz y convivencia social Aldana nos une" 2016 - 2019
- Cuaspud carlosama: Plan de desarrollo Municipal, “usted y yo Unidos por el Cambio”
- Cumbal: Plan de desarrollo municipal “Vamos Cumbal unidos podemos más”
- Túquerres: Plan de desarrollo municipal “Contigo somos más”
- Contadero: Plan de desarrollo municipal “Trabajemos juntos por el rescate y progreso de El Contadero”
- Córdoba: Plan de desarrollo municipal “Construyendo unidos el futuro de cordoba”
- Gualmatan Plan de desarrollo municipal “Gestion y compromiso”
- Iles: Plan de desarrollo municipal Con entidad y compromiso social vivir dignamente es posible
- Ipiales: Plan de desarrollo municipal “Ipiales capital del sur”
- Ospina: Plan de desarrollo municipal “Gobierno de Gestión con justicia social”
- Potosí: Plan de desarrollo municipal “Adelante potosí trabajemos en comunidad”
- Puerres Plan de desarrollo municipal “Hicimos historia”
- Pupiales: Plan de desarrollo municipal “Es tiempo de avanzar”
- Sapuyes: Plan de desarrollo municipal “Sapuyes la fuerza de un pueblo”
- Pasto: Pasto educado constructor de paz
- Tangua: Plan de desarrollo municipal, con razón y corazón únete por la dignidad de Tangua
- Nariño: Plan de desarrollo municipal “ Unión, emprendimiento y oportunidad”
- La florida: Plan de desarrollo municipal “Compromiso, trabajo y prosperidad
- Mallama: Plan de desarrollo municipal “Una vez mas, vamos en minga por el desarrollo integral”
- Buesaco: Plan de desarrollo municipal “Buesaco un compromiso de todos”
- Guaitarilla: Plan desarrollo municipal “Guaitarilla un campo de oportunidades”

5. MARCO TEORICO

5.5. El queso y su importancia nutricional

El queso se define como el producto obtenido después de la coagulación y separación del suero de leche, crema o en parte la leche desnatada, suero de mantequilla o una mezcla de estos productos; es esencialmente el producto de concentración selectiva de leche cuyo contenido es fundamentalmente caseína y grasa. Según la proporción de ésta última los quesos pueden ser grasos,

semigrasos o magros; y según su consistencia se dividen en quesos de pasta blanda y dura. La riqueza en grasa de los quesos depende del tipo de leche que se utiliza para su elaboración (Agrocadenas, 2005).

Todos los tipos de queso aportan en la dieta un gran valor nutritivo, contiene la proporción adecuada de ácidos grasos y es un alimento fácilmente digerible. Los alimentos lácteos son una fuente de calcio que aportan mucho más a la nutrición y salud humana. Los productos lácteos contribuyen aproximadamente con el 9% de las calorías disponibles; en cambio proveen el 73% del calcio, el 31% de la riboflavina, el 33% del fósforo, el 19% de las proteínas, el 16% del magnesio, el 21% de la vitamina B12, el 17 % de la vitamina A, el 10% de la vitamina B6, 6% tiamina, apreciables cantidades de vitamina D y niacina equivalentes. De hecho los productos lácteos se reconocen como “ricos” o “fuentes de muchos nutrientes” en sí mismos sin tener que ser modificados (Mahaut et al., 2003).

5.6. Importancia de la inocuidad en alimentos y derivados lácteos

La inocuidad, como factor imprescindible de la calidad de los alimentos y por ende de la seguridad alimentaria, comprende el conocimiento y manejo de las causas de su deterioro. Una de las causas principales se da por el ataque microbiano (bacterias, levaduras y mohos), lo cual tiene implicaciones económicas evidentes, tanto para los fabricantes (deterioro de materias primas y productos elaborados antes de su comercialización, pérdida de la imagen de marca, entre otros) como para distribuidores y consumidores (deterioro de productos después de su adquisición y antes de su consumo); lo cual deriva en consecuencias desfavorables para la imagen de la empresa y la confianza de los consumidores.

Los alimentos son uno de los medios por los cuales los seres humanos pueden infectarse con microorganismos que causan Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's) o moléculas tóxicas presentes en el momento de la ingestión, las cuales pueden ser producidas, en la mayoría de los casos, por microorganismos presentes en los alimentos y pueden provocar una enfermedad sin que las personas sufran necesariamente una infección. Aunque la contaminación con sustancias tóxicas es posible por errores o malas prácticas durante la fabricación o almacenamiento, con el paso del tiempo las toxinas aparecen en los alimentos y los microorganismos comienzan su crecimiento y causan descomposición y liberación de metabolitos secundarios tóxicos (Acuña et al., 2010).

Se ha establecido que los riesgos microbiológicos en quesos están más vinculados con quesos frescos de humedad superior al 46%. En cambio los quesos duros madurados o semimadurados con humedad menor al 36% dificultan el desarrollo de patógenos que pudieran haber contaminado inicialmente, aunque de no haberse respetado las Buenas Prácticas de Manufactura, tales quesos podrían presentar enterotoxina estafilocócica.

La demanda creciente del consumo de quesos y su consecuente elaboración ha incrementado el interés en obtener más información acerca de estabilidad y calidad microbiológica asociada a diferentes microorganismos tales como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes*, que son microorganismos relacionados desde 1970 con brotes asociados a quesos (Roberts et al., 2002). Muchos de estos microorganismos están distribuidos en el ambiente y pueden ocasionar contaminaciones naturales durante la producción, maduración y almacenamiento así como contaminaciones cruzadas en restaurantes y hogares debido a un inapropiado uso (Scott et al., 2002).

5.7. Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las bacterias lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos representados por varios géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaeróbicos, microaerófilicos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y benzidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Carr et al., 2002; Madziva et al., 2006; Vázquez et al., 2009). Además, las BAL son ácido tolerantes pudiendo crecer algunas a valores de pH tan bajos como 3,2; otras a valores tan altos como 9,6, y la mayoría crece a pH entre 4 y 4,5 permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no aguantarían la aumentada actividad producida por los ácidos orgánicos (Carr et al., 2002).

La leche es el medio típico y satisfactorio para la proliferación de las BAL (Vázquez et al., 2009). Estos microorganismos son generalmente utilizados como cultivos iniciadores en la elaboración y conservación de productos lácteos, tales como leche acidificada, yogurt, mantequilla, crema, kefir, y quesos; así como también en el procesamiento de carnes, bebidas alcohólicas y vegetales (Carr et al., 2002). En la industria alimentaria algunas BAL heterolácticas son más importantes que las homolácticas, por ejemplo en la producción de compuestos que intensifican el sabor y aroma tales como acetaldehído y diacetilo (García et al., 1998)

Las BAL son microorganismos importantes, industrialmente reconocidas por su capacidad de conservación así como por sus beneficios de salud y nutrición, han sido utilizadas hace más de 4 mil años en la elaboración de una gran variedad de alimentos fermentados y elaborados de forma artesanal. Inicialmente se utilizaron para retardar el deterioro y preservar los alimentos a través de fermentaciones naturales, posteriormente se fueron encontrando aplicaciones comerciales como cultivos iniciadores para la industria lechera, cárnica, de elaborados vegetales y de bebidas alcohólicas (Awad et al., 2007)

5.8. Identificación de bacterias ácido lácticas

5.8.2. Métodos bioquímicos

Catalasa. Se basa en la capacidad que tienen los microorganismos catalasa positivos de desdoblar el agua oxigenada, en agua y oxígeno (Fung, 1997).

Oxidasa. Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromooxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún microaerófilo (*Vibrio fetus*), pero los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa.

Tinción de Gram. Esta coloración permite la clasificación de las bacterias en gram positivas y gram negativas según la composición de su pared celular. Por esto el complejo de color formado con la pared de las bacterias gram positivas no puede ser removido con el agente decolorante que es el alcohol acetona. La célula permanece de color azul violeta, en cambio las bacterias gram negativas, al decolorarse con el alcohol acetona, se dejan colorear con la fucsina ó safranina, quedando de color rosado (Bou et al., 2011).

5.8.3. Métodos moleculares

La ausencia de concordancia entre las características observables, morfológicas y/o fenotípicas del aislamiento en estudio y las correspondientes a la(s) cepa(s) de la especie tipo, hacen que los métodos fenotípicos realicen la identificación más probable y no definitiva. Para solventar los problemas inherentes presentados por los sistemas de identificación fenotípica, tales como el hecho de que no todas las cepas de una misma especie muestran una característica específica, una misma cepa puede generar diferentes resultados en ensayos repetidos y las limitaciones en las bases de datos de bacterias, entre otros, se han impuesto los métodos genotípicos de identificación bacteriana como procedimientos complementarios o alternativos. Es así como se han sido utilizados dianas moleculares en los estudios taxonómicos o de filogenia en las distintos géneros y distintas especies bacterianas, constituyendo el análisis del ARNr 16S el marcador inicial y en numerosas situaciones el marcador suficiente para realizar una identificación más precisa. Sin embargo, en otras circunstancias, la alta homología genética presente en determinados géneros bacterianos o un reciente cambio en su asignación taxonómica, no permite realizar con el ARNr 16S una identificación a nivel de especie o de géneros. En estos casos, se puede recurrir a otros genes dianas para

realizar asignación de especie. Los genes descritos con mayor frecuencia con utilidad en taxonomía bacteriana y/o filogenia son los que se desarrollan a continuación del ARNr 16S (Bou et al., 2011)

Identificación molecular

En la práctica de la microbiología se producen una serie de circunstancias en la identificación bacteriana como son: dificultades en el aislamiento, crecimiento lento o en medios de cultivo *in vitro* complejos, baja actividad en las pruebas bioquímicas, ausencia o baja efectividad de técnicas serológicas, entre otras. La obtención de resultados reproducibles e intercambiables entre laboratorios, confieren a las técnicas moleculares, y en especial al ARNr 16S y al *rpoB*, un protagonismo que a continuación se describe:

Identificación de cepas con escasa descripción, con baja frecuencia de aislamiento, o fenotípicamente atípicas

Identificación de cepas de difícil identificación fenotípica o crecimiento fastidioso. Como sucede con la dificultad para diferenciar fenotípicamente las especies de *Nocardia* y de *Mycobacterium*. Sin embargo, esta identificación no es completa para algunas especies de mico bacterias.

Descripción de nuevos patógenos

Ningún otro gen como el ARNr 16S ha mostrado su amplia aplicabilidad en todos los grupos taxonómicos. Si el objetivo a alcanzar es la identificación de una bacteria desconocida sin existir conocimiento previo, el ARNr 16S es la mejor elección, con un uso más extensivo.

Para la descripción de una nueva especie, se recomienda la presencia de diferencias fenotípicas claras y en la secuencia diferencias de > 1 pb/100 bases. Si estas diferencias son > 5%, se podría considerar la existencia de un nuevo género. Se estima que entre un 10-20% de los aislamientos no coinciden con los microorganismos descritos y que puede tratarse de un género o especie nueva, pero en cepas obtenidas en la práctica clínica esta frecuencia es muy inferior.

La creciente relevancia del análisis del *rpoB* se manifiesta en dos situaciones. La primera, es que el contenido bacteriano GC puede estimarse matemáticamente por el contenido GC del gen *rpoB*. La segunda situación es que la similitud presentada en las secuencias *rpoB* de dos especies bacterianas se correlaciona de forma muy significativa con sus correspondientes valores de hibridación ADN-ADN (DDH) y con su identidad media en nucleótidos (ANI).

Identificación de bacterias de difícil cultivo

Como ejemplo, se ha aplicado exitosamente y se ha podido constatar, la presencia de *Bartonella quintana* y *Coxiella burnetii* como principales agentes etiológicos en endocarditis con cultivo negativo (Suárez, 2007). Pero en el caso de que la muestra posea un origen no estéril o del medio ambiente, y se presente flora mixta, esta estrategia no es eficiente.

5.9. Las BAL como agentes de bioprotección de alimentos

La bioprotección o bioconservación es la extensión de la vida útil y una mejora de la seguridad de un alimento mediante el uso de microbiota natural o controlada y/o sustancias antimicrobianas. La biopreservación se ha vuelto muy popular actualmente por diversas razones: los métodos de preservación natural de alimentos que no afectan la salud, se consideran favorables para los consumidores y tienen un menor impacto sobre las propiedades nutricionales y sensoriales; a diferencia de los tratamientos químicos o fisicoquímicos, puede reducir costos de producción y al mismo tiempo extender la vida útil del producto; no requiere de habilidades o equipos tecnológicos avanzados y, por lo tanto, pueden utilizarse en países en vías de desarrollo; y finalmente ofrecen nuevas posibilidades para resolver las amenazas a la cadena alimentaria para el control de patógenos emergentes (Gálvez et al., 2007).

La acción conservadora de las BAL es debido a la inhibición de un gran número de microorganismos patógenos y dañinos por varios productos finales de la fermentación. Estas sustancias son ácidos (láctico y acético), peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas y productos secundarios generados por la acción de lactoperoxidasa sobre el peróxido de hidrógeno y tiocianato (Shirai et al., 1996).

Por otra parte, la acumulación de ácido láctico y otros ácidos orgánicos producidos por BAL, reduce el pH del ambiente con un efecto inhibitorio de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. La forma no disociada del ácido láctico puede penetrar con mayor facilidad la pared celular microbiana donde el pH más alto del contenido celular promueve la disociación, dando lugar a la liberación de iones hidrógeno y el anión correspondiente, de modo que ambos iones interfieren en el metabolismo e inhiben el crecimiento celular (Vázquez et al., 2009).

Cuando el oxígeno está presente, las BAL pueden producir peróxido de hidrógeno, el cual genera radicales hidroxilo que causan peroxidación a los lípidos de la membrana y susceptibilidad de la célula microbiana de muchos microorganismos (Ouweland, 1998).

La transformación de la leche usando cultivos lácticos representa varias ventajas. La más evidente de éstas es la conservación, ya que estos productos tienen una vida de anaquel más larga que la de la leche natural; además presentan menor riesgo de contagio de toxiinfecciones que el producto fresco, debido a los distintos compuestos antimicrobianos producidos por las BAL que intervienen en la

fermentación, las cuales inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos y productores de toxinas (Jay, 2000).

La aparición de microorganismos patógenos emergentes, como por ejemplo la *Listeria monocytogenes*, que se desarrolla a temperaturas habituales de refrigeración de los alimentos y es causante de listeriosis en los seres humanos, ahonda el interés y la preocupación por mantener el control durante el proceso y manejo de los alimentos con el fin de garantizar su inocuidad (Barboza et al., 2004).

Las especies más usadas para retardar el deterioro y preservar los alimentos en forma natural son las de los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Carnobacterium*. Estos microorganismos producen diferentes sustancias con características antimicrobianas. La capacidad de producir grandes cantidades de ácido acético y ácido láctico por fermentación de los carbohidratos presentes y la consecuente caída del pH son los factores primarios en los que se basa la actividad antimicrobiana de las BAL (Alegoría et al., 2010).

5.9.2. Las bacteriocinas como antimicrobianos

Las bacteriocinas son moléculas que tienen estructura tipo péptido o proteína biológicamente activas, las cual presentan acción bactericida sobre receptores específicos de las células; además, la composición química de estas sustancias es muy variada y su modo de acción específico (Vázquez et al., 2009). Las bacteriocinas que producen las BAL han sido intensamente estudiadas por su actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas tales como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* y *Salmonella*, entre otras (Holo et al., 2001).

Las bacteriocinas comprenden un grupo grande y diverso de proteínas o péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente, algunos de los cuales se someten a modificaciones post-traduccionales, que tienen un efecto bacteriocida o bacteriostático en otras bacterias ya sea de la misma especie (espectro estrecho) o de otros géneros (espectro amplio). La célula productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina. La producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida (Vázquez et al., 2009).

Las bacteriocinas son producidas por varias especies bacterianas, pero de particular interés son aquéllas producidas por bacterias ácido lácticas. Actualmente, la bioconservación en la industria alimentaria se basa en las bacteriocinas producidas especialmente por el género *Lactobacillus*. El potencial de estos péptidos se basa en la adición al alimento del microorganismo productor de bacteriocina o una preparación de ésta, como una barrera adicional cuando se pretende la preservación por métodos combinados (Yang et al., 2012).

En los últimos años se han identificado y caracterizado diversos péptidos antimicrobianos, este interés marcado sobre las bacteriocinas se debe a un conjunto

de hechos, como la aprobación de la nisina para su aplicación comercial en 1969, en 1988 como sustancia generalmente reconocida como segura (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Administración de Alimentos y Drogas de EE. UU. (FDA, por sus siglas en inglés) en ciertos alimentos y el hecho de que la mayoría de enfermedades asociadas al consumo de alimentos pueden ser atribuidas directamente a infecciones o intoxicaciones microbianas (Castro et al., 2009).

Las primeras referencias bibliográficas sobre la producción de bacteriocinas por el género *Lactobacillus* datan de los años 60, cuando De Klerk y Coetzee en 1961 analizaron 189 cepas de lactobacilos homo y heterofermentativos y observaron que, aproximadamente, el 6% producían sustancias bactericidas frente a otros miembros de la familia *Lactobacillaceae*. Desde entonces se han identificado más de 40 bacteriocinas, producidas por especies homofermentativas obligadas (*L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. amylovorus*, *L. helveticus*), heterofermentativas facultativas (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus* y *L. sake*) y heterofermentativas obligadas (*L. fermentum*), muchas de ellas aisladas de productos cárnicos, encurtidos y bebidas. Por ejemplo, *Lactobacillus plantarum* es la cepa más frecuentemente productora de bacteriocinas, lo cual explica su habilidad para controlar otros microorganismos, incluyendo patógenos (Reis et al., 2012).

En la actualidad las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son las que encierran un mayor interés ya que tienen el estatus de QPS (*qualified presumption of safety*), es decir, son consideradas como microorganismos seguros para la salud, ya que tanto ellas como sus metabolitos han sido consumidos en alimentos fermentados por innumerables generaciones sin que hubiera efectos adversos en la población (Joerger, 2003).

Las bacteriocinas actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática del microorganismos sensible a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños, pérdida de iones K, ATP o la alteración de la fuerza motriz de protones (fuente de energía celular) necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácidos nucleicos. La pérdida de estas sustancias origina a su vez una pérdida potencial de membrana, consumo de las reservas energéticas celulares, descenso en la síntesis de ADN, ARN y proteínas originando finalmente la inhibición o muerte celular (Vázquez et al., 2009).

Las bacteriocinas se inactivan, al menos, por un enzima proteolítica de origen pancreático (tripsina y alfa-quimiotripsina) y gástrico (pepsina) característica que hace de estos metabolitos bacterianos sustancias seguras para ser incluidas como biopreservantes de los alimentos, puesto que serían inactivadas durante su paso por el tracto gastrointestinal sin ser absorbidos como compuestos activos y sin causar, por tanto, los riesgos relacionados con el uso de antibióticos. Estudios de bacteriocinas producidas por *lactobacillus curvatus* LTH1174 en la supervivencia de *E.coli* y *Listeria* en un modelo dinámico del estómago y el intestino, reportan que las bacteriocinas son inactivadas por las enzimas digestivas y además, es evidenciado el efecto antagónico sobre *Listeria innocua*. Adicionalmente se han encontrado otras

bacteriocinas sensibles a enzimas no proteolíticas, como la leuconocina S que se inactiva por una amilasa (Marcos et al., 2013).

Actualmente hay una demanda creciente por los alimentos mínimamente procesados, el uso de aditivos naturales en los alimentos y por reducir el uso de conservadores químicos, esto ha llevado a la industria alimentaria a reconsiderar el potencial antimicrobiano de las bacteriocinas producidas por BAL ya que pueden ser consideradas como conservadores naturales o bioconservadores. De todas las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas, las bacteriocinas aparecen como las más adecuadas desde un punto de vista tecnológico para ser utilizadas como conservantes de grado alimentario (Alquicira, 2006).

La aceptación del empleo de bacteriocinas como una alternativa natural para la preservación de alimentos ha despertado interés en productores cuyos mercados les presentan exigencias estrictas de calidad microbiana. No sólo interesa una reducida carga microbiana, sino la ausencia de patógenos de importancia sanitaria que constituyen un riesgo para los consumidores ya que su naturaleza peptídica permite la degradación por las enzimas digestivas, resultando así presuntivamente inocuas para el consumidor y su microbiota intestinal de ocupación. En algunos casos, su espectro de acción incluye a los potenciales patógenos y alterantes asociados a los alimentos (*B. cereus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Clostridium*, etc.) Por último, sus propiedades fisicoquímicas las hacen resistentes a los tratamientos térmicos y cambios de pH que sufren los alimentos durante su fabricación y almacenamiento y, además, su pequeño tamaño permite la difusión en sistemas semisólidos, propios de la mayoría de los productos alimentarios (Díez, 2011).

5.9.3. Bacterias lácticas como cultivos iniciadores y su uso en el desarrollo de nuevos productos.

Un cultivo iniciador es un cultivo preparado con una o varias cepas pertenecientes a una o varias especies de bacterias, levaduras o mohos, que se añade o inocula en la leche cruda o pasteurizada destinada a la fabricación de queso. Los fermentos lácticos desarrollan un papel principal en el inicio de la fermentación, promoviendo la maduración y dando las características particulares a diferentes variedades de dependiendo del tipo de cultivo iniciador empleado (Deegan et al., 2006).

Los cultivos pueden estar constituidos por diferentes tipos de microorganismos, el grupo más importante está constituido casi exclusivamente por las BAL, cuya principal, aunque no única función, es la producción de ácido láctico, en un proceso fermentativo a partir de la lactosa. Debido a ello a menudo se les denomina fermentos lácticos o cultivos lácticos iniciadores. Los microorganismos implicados son bacterias de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*.

Las bacterias lácticas y otros microorganismos están presentes como “contaminantes” en la leche cruda y posteriormente acceden también al queso a partir del ambiente. Si se emplea leche cruda es posible elaborar queso sin la adición de cultivos iniciadores adicionales (quesos semimadurados/madurados) pero esta práctica puede llevar en muchas ocasiones a la obtención de un producto final de características no uniformes o con defectos y alteraciones. Actualmente la práctica normal en la fabricación de quesos madurados o semi madurados, tanto a partir de leche cruda como pasteurizada, es añadir cultivos que permiten restaurar o potenciar el desarrollo de la microbiota beneficiosa y proporcionando productos higiénicamente aceptables y de calidad uniforme (Yang et al., 2012).

La falta de uniformidad en la mayoría de la leche cruda destinada para quesos artesanales hace que el procedimiento no sea estandarizado y conlleva a una limitada aceptación y difícil distribución en los mercados nacionales y extranjeros. La pasteurización de la leche y la adición de cultivo de inicio nativo permite la fabricación a escala industrial de un producto uniforme y seguro de calidad constante y además preservar las características de calidad de los productos originales (Olivera, 2011).

Los quesos artesanales pueden constituir una fuente de cepas con propiedades fisiológicas o bioquímicas de interés tecnológico. La capacidad acidificante, proteolítica o lipolítica puede contribuir al desarrollo del aroma y textura de los quesos. Los cultivos iniciadores constituidos por cepas de BAL provenientes de tales quesos y seleccionadas en base a su perfil de actividad enzimática podrían tener aplicación a escala industrial en la elaboración tradicional de quesos, contribuyendo a garantizar su calidad higiénica y tecnológica (Alvarado et al., 2007).

Hoy en día, los consumidores demandan cada vez más productos con sabor y aroma diferenciales, al mismo tiempo que buscan nuevas propiedades relacionadas con potenciales efectos beneficiosos para la salud. Por todo ello, la industria agroalimentaria precisa desarrollar nuevos fermentos que respondan a dicha demanda. En este sentido, la búsqueda de nuevas cepas en ambientes naturales ha demostrado ser una buena estrategia para seleccionar microorganismos con propiedades relevantes, como la producción de perfiles aromáticos novedosos, producción de bacteriocinas, síntesis de exopolisacáridos o una mayor actividad proteolítica (Awad et al., 2007).

6. ANALISIS DE LOS PARTICIPANTES

6.1. COOPERANTES

6.1.1 Universidad de Nariño

La Universidad de Nariño participara como ejecutor del proyecto, a través de la participación directa de los siguientes grupos de Investigación.

6.1.1.1 Grupo de Investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria (TEA)

El grupo Tecnologías Emergentes en Agroindustria-TEA, fue creado en febrero de 2005 con el fin de investigar el desarrollo de nuevos procesos y productos utilizando tecnologías emergentes aplicables a la problemática agroindustrial del Departamento de Nariño y Colombia, generando valor agregado a los recursos y materias primas de la región. Está asociado a la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de Nariño.

Actualmente el grupo TEA está clasificado en Categoría A de Colciencias

A continuación se describen los principales proyecto de investigación ejecutados por el grupo en los últimos años.

PERIODO EJECUCIÓN	TITULO	MONTO	ENTE FINANCIADOR
2013-2016	APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES DE FRUTAS PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITES CON POTENCIALIDAD EN LA INDUSTRIA COSMÉTICA UTILIZANDO LA TECNOLOGÍA DE EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	\$967.481.000	SGR
2015-2019	MEJORAMIENTO TECNOLÓGICO Y PRODUCTIVO DEL SISTEMA PAPA EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO (en asocio con Corpoica y otros grupos de la Universidad de Nariño)	\$8.149.670.846	SGR
2015-2019	INVESTIGACIÓN PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENETICO DE UCHUVA (<i>Physalis peruviana</i>) EN LA ZONA ALTO ANDINA DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO (en asocio con otros grupos de la Universidad de Nariño)	\$3.600.109.600	SGR
2013-2016	EVALUACIÓN DE LA APTITUD DE NUEVAS LINEAS DE ARVEJA (<i>Pisum sativum L.</i>) PARA PROCESAMIENTO AGROINDUSTRIAL (en asocio con otros grupos de la Universidad de Nariño)	\$1.176.765.000	SGR

2008-2011	OBTENCIÓN Y EVALUACIÓN DE UN BIOINSUMO A PARTIR DEL JUGO DE FIQUE (<i>Furcraea spp.</i>) PARA EL CONTROL AGROECOLÓGICO DE GOTA (PHYTOPHTHORA INFESTANS) EN LA PAPA EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO	\$313.995.000	MADR
2008-2011	OBTENCIÓN DE ABONOS ORGÁNICOS A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DEL PROCESAMIENTO DEL FIQUE.	\$290.041.700	MADR
2008-2011	EXTRACCIÓN CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE ORÉGANO DEL ALTO PATÍA	\$121.066.000	MADR

El grupo TEA tendrá bajo su responsabilidad la coordinación general del proyecto y la supervisión de la ejecución de la mayor parte de las actividades del mismo, con la colaboración de personal científico con formación y competencias específicas que será contratado de acuerdo con los requerimientos del proyecto.

6.1.1.2 Grupo de Apoyo a la Investigación y Desarrollo Agroalimentario (GAIDA)

Grupo de investigación creado en el año 2013 con el apoyo de investigadores de reconocida experiencia con título de maestría y doctorado y de estudiantes de pregrado y postgrado de diversos programas. En Colciencias el grupo GAIDA ostenta la categoría A.

Actualmente las Líneas de investigación en las que trabaja el grupo son:

- Desarrollo de productos agroalimentarios
- Empaques, conservación, vida útil
- Propiedades físicas y sensoriales de los alimentos
- Sistemas de control y modelamiento de procesos agroalimentarios
- Transferencia de tecnología al sector agroalimentario
- Diseño de equipos y procesos agroalimentarios
- Aprovechamiento de subproductos agroindustriales

Se anexa carta de participación de la Universidad de Nariño.

6.1.2. ADEL - Agencia de Desarrollo Económico Local de Nariño

ADEL es la entidad administradora de recursos del programa DIRENA “Programa de Desarrollo con Identidad Regional entre España y Nariño” es una alianza institucional público privada, conformada por la Agencia Española de Cooperación Internacional AECID, la Gobernación de Nariño, las Alcaldías de Pasto y Tumaco, la Red de Universidades UREL, la Universidad de Nariño, el Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, la Cámara de Comercio de Pasto y la Agencia de Desarrollo Local de Nariño, cuyo objetivo principal es contribuir al desarrollo sostenible de la región, mediante una plataforma de coordinación interinstitucional orientada al fortalecimiento de tres ejes estratégicos: Gobernanza y Desarrollo Local; Emprendimiento y Desarrollo Empresarial, e Investigación y Gestión del conocimiento, bajo un modelo de intercambio de conocimiento que puedan transferir buenas prácticas desde España a Nariño.

De acuerdo con lo anterior, el programa DIRENA apoyará el proyecto sirviendo de enlace con el “Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA)”, el cual es un organismo de investigación que pertenece al Concejo Superior de Investigaciones Científicas de España (CSIC). En el marco del programa DIRENA, dos expertos del IPLA visitaron Nariño en el año 2014 para identificar proyectos que permitieran mejorar la cadena láctea de la región y de allí de donde surgió el presente proyecto.

El IPLA cuenta con una amplia experiencia en el área del proyecto, ha desarrollado dos fermentos autóctonos para quesos que se han transferido al sector productivo en España, contribuyendo a la mejora de la calidad higiénico-sanitaria y organoléptica de los mismos. Ambos quesos poseen el sello de calidad Denominación de Origen Protegida (DOP). Los fermentos diseñados actualmente están siendo elaborados por una empresa de base biotecnológica creada para tal fin (BiogesStarters, S.A).

Se anexa carta de participación de la Universidad de Nariño. ADEL - Agencia de Desarrollo Económico Local de Nariño

6.1.3 Instituto Departamental de Salud de Nariño IDSN

El Instituto Departamental de Salud de Nariño es la autoridad sanitaria que direcciona el mejoramiento de la calidad, seguridad y acceso en la atención en salud, desarrollando acciones de inspección, vigilancia y control, asistencia técnica y articulación intersectorial, basados en la promoción de la salud, la gestión del riesgo y de la salud pública con participación y concertación social, que impacten favorablemente en las condiciones de vida, sanitarias y ambientales de los habitantes de Nariño. Ha realizado importantes estudios diagnósticos sobre la inocuidad de alimentos en el Departamento.

Funcionarios del IDSN han acompañado el proyecto brindando asesoría técnica para su formulación y será la entidad encargada de realizar el aislamiento de bacterias patógenas a partir de los muestreos de leche y queso que se realizarán en los diferentes municipios de las cuencas lecheras del departamento.

Esta Secretaría de la Gobernación de Nariño apoyará el proyecto a través de asesorías de sus profesionales para la realización del diagnóstico de la población vinculada a la elaboración artesanal de quesos en el departamento, con el ánimo de planificar futuras actividades de apoyo a esta población. Igualmente y debido a que uno de los objetivos de la mencionada secretaría se relaciona con la seguridad alimentaria, ésta apoyará el proyecto en las actividades de capacitación que tienen por finalidad el mejoramiento de la calidad sanitaria de la producción de quesos frescos.

Se anexa carta de participación del Instituto Departamental de Salud de Nariño IDSN

6.1.4 Fundación Para el Desarrollo Agroindustrial y Social de Colombia – FUDASCOL.

La Fundación para el Desarrollo Agroindustrial y Social de Colombia (FUDASCOL) es una organización sin ánimo de lucro que cuenta con experiencia en procesos de apoyo técnico, organizacionales y comerciales en el sector agropecuario y ambiental del departamento de Nariño. Los miembros de FUDASCOL conocen la problemática y las potencialidades del sector agropecuario en el departamento de Nariño, especialmente de la cadena láctea y desarrollan estrategias de intervención integral bajo principios de sostenibilidad.

Entre los procesos de apoyo y proyectos que ha desarrollado la entidad en el departamento de Nariño asociados al sector agropecuario y cadena láctea se encuentran los siguientes:

No	PROCESO DE APOYO	ORGANIZACIÓN	No de beneficiarios
1	Apoyo técnico para el diseño de una planta para la producción de queso fresco y de bebidas fermentadas.	Cooperativa Láctea de Gualmatan – Municipio de Gualmatan	39
2	Apoyo técnico y comercial para la producción y venta de 3 variedades de queso fresco.	Asociación de Productos Lácteos la Chambita, Municipio de Cumbal	110
3	Apoyo técnico para la modernización y	Federación de Productores de Leche –	100

	ampliación de la planta de producción de dos variedades de queso fresco.	Fedeagrolacteos, municipio de Potosi	
4	Apoyo en la implementación de estrategias de generación de valor agregado y prácticas comerciales para la venta de papa variedades parda suprema y Diacol Capiro	Autoridades Indígenas de Colombia – Aico social por la Pachamama	2000
5	Fomento de la producción sostenible y Sistemas productivos alternativos en Páramos de Panam y Chiles en el municipio de Cumbal	Fundación Para el Desarrollo Agroambiental y Social del Suroccidente Colombiano.	75
6	Apoyo para el fortalecimiento productivo y empresarial de mujeres indígenas del resguardo de Pastas Aldana.	Fundacion Mindala	600

Dada su experiencia, FUDASCOL participará en las actividades que involucran el trabajo con las comunidades beneficiarias en los procesos de diagnóstico y transferencia tecnológica e intervención directa en la cadena productiva con las organizaciones, para lo cual la fundación cuenta con profesionales con la idoneidad técnica para la realización de dichos procesos, además la fundación cuenta con la capacidad técnica y logística para la realización de trabajo de campo en el territorio.

Las actividades que desarrollara la fundación para el desarrollo Agroindustrial y Social de Colombia son las siguientes..

- Actividad No 1. Recopilar información en empresas artesanales productoras de quesos frescos:
- Actividad No 2: realización del diagnóstico social y técnico de la producción de quesos artesanales en Nariño.
- Actividad No 20. Evaluar el efecto de aplicar técnicas de bioprotección y BPM a escala piloto en la cadena de producción de leche y queso fresco.
- Actividad No 22. Realizar talleres de capacitación a productores artesanales de quesos frescos

Se anexa carta de participación de la Fundación para el Desarrollo Agroindustrial y Social de Colombia - Fudascol

6.1.5 Gobernación de Nariño.

La gobernación de Nariño como entidad territorial apoya el proyecto y el gremio lechero como cooperante y aportante de recursos asignados al departamento con cargo al fondo de Ciencia, Tecnología e Innovación.

Se anexa carta de presentación del proyecto por parte de la Gobernación de Nariño como entidad territorial.

6.2. BENEFICIARIOS

6.2.1 Pequeños acopiadores y transformadores de leche en el departamento de Nariño

Los pequeños productores de leche y/o transformadores son los beneficiarios directos del proyecto por cuanto las actividades de investigación e Innovación están enfocadas al mejoramiento de la producción de las queseras artesanales.

6.3. OPOSITORES:

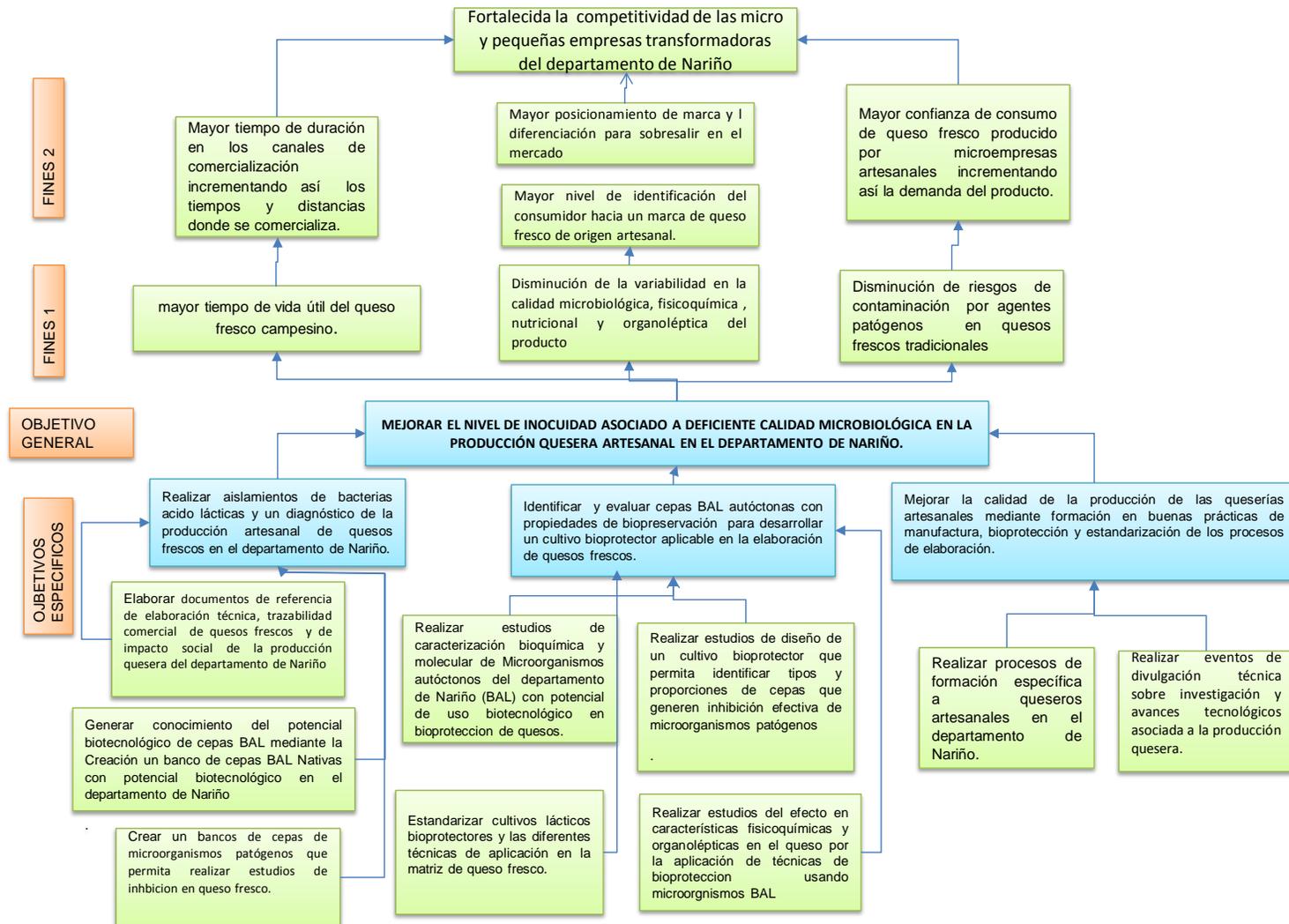
6.3.1 Empresas exportadoras de derivados lácteos hacia Colombia

Las empresas del sector lácteo que exportan productos hacia el mercado de Colombia tienen como principal interés posicionar sus productos en los consumidores, en detrimento de la economía y la industria láctea nacional, por ello dichas empresas pueden verse perjudicadas, puesto que con el desarrollo de este proyecto se fortalece la producción quesera del departamento de Nariño haciendo que las pequeñas empresas sean más competitivas.

7. OBJETIVOS

Los objetivos del presente proyecto se derivan de la transformación de la problemática identificada anteriormente en el árbol de problemas a condiciones positivas realizables, obteniendo así el árbol de objetivos, pasando el problema central a objetivo general del proyecto y las causas directas en objetivos específicos.

ARBOL DE OBJETIVOS _ CADENA LACTEA



7.1. Objetivo General

Mejorar el nivel de inocuidad asociado a deficiente calidad microbiológica en la producción quesera artesanal en el departamento de Nariño.

Indicador objetivo	Descripción	Fuente de Verificación
Nivel de cumplimiento de requisitos de calidad microbiológica de queso fresco elaborado en queserías artesanales intervenidas por el proyecto.	Medido a través de: Porcentaje Meta: 90% Tipo de fuente: Informe	Reporte de pruebas de laboratorio que demuestren el nivel de cumplimiento de requisitos de calidad microbiológica con la reducción o ausencia de microorganismos patógenos.

7.2. Objetivos Específicos

1. Realizar aislamientos de bacterias ácido lácticas y un diagnóstico de la producción artesanal de quesos frescos en el departamento de Nariño.
2. Identificar y evaluar cepas BAL autóctonas con propiedades de bioproservación para desarrollar un cultivo bioprotector aplicable en la elaboración de quesos frescos.
3. Mejorar la calidad de la producción de las queserías artesanales mediante formación en buenas prácticas de manufactura, bioprotección y estandarización de los procesos de elaboración.

8. ANÁLISIS DE ALTERNATIVAS

Partiendo del árbol de problemas, del árbol de objetivos y los involucrados, se realiza un análisis de alternativas para explorar todas las posibilidades que se tengan a disposición para el logro del objetivo general y cumplir así con el resultado esperado por la intervención.

8.1. Identificación de las alternativas del proyecto

Teniendo en cuenta las acciones posibles que puedan dar cumplimiento al objetivo del proyecto se han identificado las siguientes posibles alternativas de solución.

Alternativa 1: Aplicar agentes conservantes para inhibición de microorganismos patógenos.

Considerando el problema central del proyecto el cual es bajos niveles de inocuidad relacionados con la deficiente calidad microbiológica de la producción quesera artesanal en el departamento de Nariño, un posible mecanismo de solución sería el uso de conservantes químicos que retarden o inhiban el crecimiento de microorganismos patógenos y de aquellos que causan deterioro rápido del producto. Sin embargo, esta alternativa podría tener efectos negativos en la aceptabilidad del producto por parte de los consumidores y además generar peligros de tipo químico.

Los conservantes son, en su gran mayoría, agentes que pueden llegar a generar a largo plazo efectos adversos sobre la salud de los consumidores, a pesar de ser utilizados en las dosis recomendadas. Algunos conservantes usados en la elaboración de quesos son los sorbatos, benzoatos y los nitratos. Se sabe por ejemplo que el consumo excesivo de nitratos genera riesgos de producir nitrosaminas, sustancias que son agentes cancerígenos (Royo, 2017).

Una tendencia de los consumidores en los últimos años es la de preferir alimentos naturales, lo cual ha sido muy bien identificado y aprovechado por las empresas que buscan desarrollar productos donde en sus etiquetas puedan hacer visibles afirmaciones sobre las características naturales del producto como por ejemplo: sin aditivos químicos, sin conservantes, productos orgánicos, no transgénicos, etc. (Zegler, 2018).

Debido al bajo nivel de educación y capacitación de la mayoría de personas a cargo de las microempresas artesanales que producen quesos frescos en Nariño, el uso de aditivos químicos en sus productos podría representar un peligro por mal uso y sobredosificación, que no solo ocasionaría cambios en las características organolépticas y, por consiguiente, en la aceptabilidad del producto, sino además constituiría un riesgo para la salud de los consumidores.

Alternativa 2. Realizar procesos de capacitación en buenas prácticas de manufactura (BPM) a las microempresas productoras de quesos frescos.

Esta alternativa consiste en asignar recursos para desarrollar programas de capacitación en higiene de los alimentos y buenas prácticas de manufactura, dirigidos a todo personal de las microempresas donde se elaboran quesos frescos en el departamento de Nariño. Si los procesos de capacitación se llevan a cabo de con metodologías adecuadas y acordes al nivel de educación e idiosincrasia de los productores, probablemente se logre mejorar en cierto nivel la calidad higiénica de los productos y reducir los peligros para los consumidores asociados a la contaminación con microorganismos patógenos. Sin embargo esta alternativa solo constituiría una solución parcial al problema, debido a que en muchas de las microempresas productoras de quesos frescos existen condiciones asociadas factores como las instalaciones, los equipos y las prácticas que constituyen riesgos de contaminación difíciles de evitar sin la realización de inversiones que permitan modificar dichos factores.

Alternativa 3: Aplicar de un cultivo láctico bioprotector para la inhibición de microorganismos patógenos y realizar procesos de formación en buenas prácticas de manufactura.

Se conoce que las BAL tienen una acción conservadora en alimentos por los productos finales de la fermentación que generan, los cuales son variables de unas cepas a otras en proporciones y rutas metabólicas los ácidos láctico y acético, el peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas y productos secundarios generados por la acción de lactoperoxidasa sobre el peróxido de hidrógeno y tiocianato (Shirai et al., 1996). La acumulación de ácido láctico y otros ácidos orgánicos, reduce el pH del ambiente con un efecto inhibitorio sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. La forma no disociada del ácido láctico puede penetrar con mayor facilidad la pared celular microbiana donde el pH más alto del contenido celular promueve la disociación, dando lugar a la liberación de iones hidrógeno y el anión correspondiente, de modo que ambos iones interfieren en el metabolismo e inhiben el crecimiento celular de microorganismos patógenos (Vázquez et al., 2009).

En esta alternativa se propone el desarrollo de un cultivo bioprotector constituido por una combinación de cepas BAL, el cual pueda añadirse a la leche con la cual se elaborará el queso fresco y que actúe inhibiendo o reduciendo el desarrollo de microorganismos patógenos y causantes de alteración en el producto.

Para lograr esto se recolectarán muestras de leche y quesos en queserías artesanales ubicadas en 22 municipios del departamento. En los laboratorios de la Universidad de Nariño se llevará a cabo el aislamiento de cepas BAL y su identificación. Se evaluará la actividad inhibitoria de las cepas BAL aisladas frente al desarrollo de microorganismos patógenos que normalmente se encuentran en quesos frescos y se realizará una caracterización tecnológica para determinar su potencial de aplicación en la fabricación de quesos.

Habiendo identificado las cepas con actividad inhibitoria frente a patógenos y analizado su aptitud tecnológica, se realizará el diseño del cultivo bioprotector, para lo cual se combinarán diferentes cepas que optimicen el espectro de inhibición frente a diversos agentes patógenos que puedan encontrarse en el queso fresco y considerando que las cepas tengan características tecnológicas apropiadas para su utilización en la elaboración de quesos frescos. Los ensayos de desarrollo del cultivo bioprotector se harán inicialmente a nivel in vitro, luego a nivel de planta piloto y posteriormente se validará su eficacia a escala de una microempresa quesera de la región.

Esta alternativa de desarrollar un cultivo bioprotector con cepa nativas es una forma natural además de conferir propiedades específicas al queso fresco aprovechando los recursos biológicos disponibles en la región. Contribuyendo como un sistema de bioprospección y banco de cepas con potencial biotecnológico no solo para la cadena láctea sino también para la industria de alimentos en general por sus múltiples aplicaciones.

El desarrollo de sistemas de bioprotección junto con procesos de formación en buenas prácticas de manufactura a responsables de los procesos de fabricación en las empresas queseras, contribuirá significativamente al fortalecimiento de la inocuidad de la producción quesera artesanal en el departamento de Nariño.

8.2. Evaluación de alternativas

Considerando factores económicos, políticos y legales se hace la evaluación de viabilidad de cada una de las alternativas.

Criterio de evaluación de alternativas	Coef	Aplicar agentes conservantes para inhibición de microorganismos patógenos.		Realizar procesos de capacitación en buenas prácticas de manufactura (BPM) a las microempresas productoras de quesos frescos.		Aplicar un cultivo láctico bioprotector para la inhibición de microorganismos patógenos y realizar procesos de formación en buenas prácticas de manufactura.	
		Ponderado	Calificación	Ponderado	Calificación	Ponderado	Calificación
Costo de la Inversión	3	3	9	2	6	3	9
Beneficio para la población objetivo	4	5	20	4	16	5	20
Riesgo social y económico	4	3	12	4	16	5	20
Apoyo Institucional	4	3	12	4	16	5	20

Impacto ambiental	5	4	20	5	25	4	20
Impacto de genero	2	3	6	3	6	5	10
Contribución al objetivo general	4	3	12	5	10	5	20
Viabilidad	5	3	15	4	20	5	25
Implica ejecución de ACTI	5	2	10	3	15	5	25
TOTAL	36		116		130		169

Teniendo en cuenta el máximo puntaje por los diferentes aspectos analizados se considera la alternativa 3. “Aplicar un cultivo láctico bioprotector para para inhibición de microorganismos patógenos y realizar procesos de formación en buenas prácticas de manufactura” como la mejor opción, considerando los diferentes aspectos y criterios técnicos evaluados. Por tanto, se determinó que dicha alternativa es la mejor para efectuar la intervención.

Diversas investigaciones han probado que los cultivos lácticos bioprotectores empleando bacterias ácido lácticas aportan propiedades y características diferenciales en la producción de queso. Aislar cepas BAL nativas en cuencas lecheras del departamento de Nariño y evaluar sus características buscando aptitudes biotecnológicas hará posible encontrar cepas que puedan contribuir a mejorar la producción quesera en diferentes aspectos técnicos, especialmente aquellos relacionados a los procesos de bioconservación, considerando el fin que está asociado a identificar cepas que tengan la capacidad de producir metabolitos inhibidores de flora patógena.

Adicionalmente la creación de un banco de cepas en el cual se han identificado las características tecnológicas de éstas permitiría a futuro su posible utilización para el desarrollo de productos innovadores, tales como un queso con Denominación de Origen Protegida en Nariño. La búsqueda de cepas nativas con propiedades biotecnológicas y con características específicas propias de los cultivos iniciadores, hace posible adelantar procesos de diversificación y generación de nuevos productos en el mediano y largo plazo. Teniendo en cuenta que son los cultivos lácticos aquellos que permiten generar diversidad de quesos con características organolépticas y fisicoquímicas particulares en textura, sabor y aroma, cualidades apreciadas en los mercados consumidores.

El proyecto contribuirá a la innovación de un producto existente, mejorando el estatus sanitario de uno de los principales derivados lácteos de Nariño, como lo es el queso fresco, con el fin de proteger la salud de los consumidores y al mismo tiempo mejorar la competitividad de la producción regional.

8.3. Localización de la alternativa.

La alternativa de solución se localiza en los 22 municipios con mayor vocación productiva de leche los cuales producen el 93% de la producción total de leche en departamento, donde se incluye también el municipio de Pasto donde se realizará la instalación de laboratorios y se hará el procesamiento de aislamiento de cepas BAL y posterior desarrollo del cultivo bioprotector.

No	MUNICIPIO	SUBREGIONES INTERVENIDAS
1	Guachucal	1. Obando
2	Aldana	
3	Cuaspud carlosama	
4	Cumbal	
5	Contadero	
6	Córdoba	
7	Gualmatan	
8	Iles	
9	Ipiales	
10	Potosí	
11	Puerres	
12	Pupiales	
13	Pasto	2. Centro
14	Tangua	
15	Nariño	
16	La florida	
17	Mallama	3. Piedemonte costero
18	Buesaco	4. Juanambu
19	Guaitarilla	5. Sabana
20	Túquerres	
21	Ospina	
22	Sapuyes	

En consideración que en las instalaciones de la Universidad de Nariño sede Torobajo se realizará la adecuación de infraestructura de dos laboratorios para el desarrollo del proyecto, se anexa el certificado de libertad y tradición con matrícula Inmobiliaria No 240-35928, como soporte documental de la titularidad del inmueble donde se llevarán a cabo las adecuaciones mencionadas.

9. ESTUDIO DE NECESIDADES

9.1 Bien o servicio: Queso fresco con niveles aceptables de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación que deterioran la calidad e inocuidad del producto.

Medido a través de: Porcentaje

Descripción

Queso fresco con recuentos de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación en rangos o niveles permitidos según las normas vigentes, que permitan definirlo como un producto que no presenta riesgo para el consumidor.

AÑO	OFERTA	DEMANDA	DEFICIT
2013	75	100	-25
2014	78	100	-22
2015	81	100	-19
2016	79	100	-21
2017	79	100	- 21
2018	79	100	- 21
2019	79	100	- 21
2020	79	100	- 21
2021	79	100	- 21
2022	79	100	- 21
2023	79	100	- 21
2024	79	100	- 21
2025	79	100	- 21
2026	79	100	- 21

Justificación: en el departamento de Nariño el principal tipo de queso producido y comercializado es el queso fresco, el cual es elaborado en gran cantidad en microempresas artesanales, muchas de ellas informales. Este tipo de queso por sus características fisicoquímicas es muy susceptible a contaminación microbiológica.

La oferta hace referencia al porcentaje de la producción de queso fresco que cumple con los criterios de calidad microbiológica establecidos en la normatividad vigente. La demanda relaciona la necesidad de los consumidores expresando que se requiere que toda la producción sea 100% inocua. El déficit indica el porcentaje de muestras cuyos niveles de contaminación microbiológica hacen que sean rechazados por no cumplir la norma, según las estadísticas del Instituto Departamental de Salud de Nariño (IDSN).

6.2. Bien o Servicio: Diagnóstico técnico y social de la producción artesanal de quesos frescos en el departamento de Nariño.

Medido a través de: Número

Descripción

Documento que contiene los resultados del diagnóstico técnico y social sobre las condiciones de producción en las queserías artesanales, relacionado con la capacidad técnica, infraestructura, calidad composicional y microbiológica del producto, como también los resultados de la caracterización de la población vinculada a la producción artesanal de quesos en el departamento de Nariño.

AÑO	OFERTA	DEMANDA	DEFICIT
2013	0	1	-1
2014	0	1	-1
2015	0	1	-1
2016	0	1	-1
2017	0	1	-1
2018	0	1	-1
2019	0	1	-1
2020	0	1	-1
2021	0	1	-1
2022	0	1	-1
2023	0	1	-1
2024	0	1	-1
2025	0	1	-1
2026	0	1	-1

Justificación:

La consolidación de esta información de diagnóstico en las plantas de procesamiento y/o centros de acopio permite identificar puntos críticos de control que al ser intervenidos pueden contribuir en el mejoramiento de la calidad microbiológica de la producción quesera artesanal del departamento de Nariño.

6.3. Bien o servicio: Banco de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL)

Medido a través de: Número

Descripción: Cepario de bacterias ácido lácticas (BAL) nativas aisladas de muestras de queso y leche de municipios de las cuencas lecheras del departamento de Nariño establecido, identificado y caracterizado.

AÑO	OFERTA	DEMANDA	DEFICIT
2013	0	1	-1

2014	0	1	-1
2015	0	1	-1
2016	0	1	-1
2017	0	1	-1
2018	0	1	-1
2019	0	1	-1
2020	0	1	-1
2021	0	1	-1
2022	0	1	-1
2023	0	1	-1
2024	0	1	-1
2025	0	1	-1
2026	0	1	-1

Justificación: se conoce con base en estudios previos que las bacterias ácido lácticas (BAL) nativas aisladas de una región específica pueden poseer propiedades biotecnológicas únicas que permiten su aplicación para el mejoramiento o la innovación de productos no solo en el sector lácteo, sino también en otros sectores de la industria de alimentos. A la fecha en el departamento de Nariño no existe un banco de cepas BAL nativas.

6.4 Bien o servicio: Banco de cepas de microorganismos patógenos.

Medido a través de: Número

Descripción: Ceparío de microorganismos patógenos aislados de muestras de queso y leche de municipios productores instalado en los laboratorios de la Universidad de Nariño.

AÑO	OFERTA	DEMANDA	DEFICIT
2013	0	1	-1
2014	0	1	-1
2015	0	1	-1
2016	0	1	-1
2017	0	1	-1
2018	0	1	-1
2019	0	1	-1
2020	0	1	-1
2021	0	1	-1
2022	0	1	-1
2023	0	1	-1
2024	0	1	-1
2025	0	1	-1
2026	0	1	-1

Justificación: Un banco de cepas de microorganismos patógenos permite adelantar estudios para eliminar y/o reducir su crecimiento mediante diferentes mecanismos de inhibición y de esta forma garantizar la seguridad de los productos alimenticios, en el marco del presente proyecto productos de bajo nivel de vida útil y alto riesgo de contaminación como es el queso fresco campesino.

A la fecha en el departamento de Nariño no cuenta con un banco de cepas de microorganismos patógenos que permita adelantar estudios con fines investigativos para la bioproservación en la industria de alimentos.

6.5 Bien o servicio: Cepas BAL con potencial de bioprotección en quesos frescos identificadas y caracterizadas.

Medido a través de: Número

Descripción: Cepas BAL con potencial de bioprotección en quesos frescos identificadas y caracterizadas tecnológicamente. Documento de investigación con los resultados de la identificación mediante métodos bioquímicos y moleculares de cepas de BAL nativas y de su caracterización de aplicación tecnológica.

AÑO	OFERTA	DEMANDA	DEFICIT
2013	0	1	-1
2014	0	1	-1
2015	0	1	-1
2016	0	1	-1
2017	0	1	-1
2018	0	1	-1
2019	0	1	-1
2020	0	1	-1
2021	0	1	-1
2022	0	1	-1
2023	0	1	-1
2024	0	1	-1
2025	0	1	-1
2026	0	1	-1

Justificación: Dentro de la colección de cepas BAL obtenidas de las diferentes cuencas lecheras del departamento de Nariño se espera encontrar cepas autóctonas no solo con propiedades de inhibición frente a microorganismos patógenos, sino también con características tecnológicas que permitan su uso en diversas industrias de alimentos. Estas cepas serán identificadas y caracterizadas. Este proceso no se ha llevado a cabo antes en el departamento pese a la importancia tecnológica que representa.

6.6. Bien o servicio: Cultivo bioprotector desarrollado

Medido a través de: Número

Descripción: tipo y proporción de cepas específicas con características tecnológicas y de bioprotección que garanticen mejoramiento de la calidad del queso fresco, relacionado mediante un documento que describa la mezcla de cepas apropiada para optimizar la inhibición de microorganismos patógenos.

AÑO	OFERTA	DEMANDA	DEFICIT
2013	0	1	-1
2014	0	1	-1
2015	0	1	-1
2016	0	1	-1
2017	0	1	-1
2018	0	1	-1
2019	0	1	-1
2020	0	1	-1
2021	0	1	-1
2022	0	1	-1
2023	0	1	-1
2024	0	1	-1
2025	0	1	-1
2026	0	1	-1

Justificación: de todos los aislamientos de BAL obtenidos se espera encontrar algunas cepas con buenas propiedades de inhibición frente a microorganismos patógenos y que posean características tecnológicas apropiadas para su utilización en quesos frescos. Una vez identificadas las cepas que tengan dichas características se realizarán combinaciones entre ellas y se evaluará su aplicación en queso fresco mediante diseño experimental que defina las proporciones y tipos de cepas que pueden formar parte del cultivo bioprotector, teniendo en cuenta aquellas que optimicen la mejora de la calidad del queso fresco.

6.7 Bien o servicio: Cultivo bioprotector estandarizado a escala piloto

Medido a través de: Número

Descripción: Una vez evaluadas las mejores combinaciones de cepas BAL a nivel in vitro, se estudiará y estandarizará el proceso de aplicación en queso fresco a nivel piloto.

AÑO	OFERTA	DEMANDA	DEFICIT
-----	--------	---------	---------

2013	0	1	-1
2014	0	1	-1
2015	0	1	-1
2016	0	1	-1
2017	0	1	-1
2018	0	1	-1
2019	0	1	-1
2020	0	1	-1
2021	0	1	-1
2022	0	1	-1
2023	0	1	-1
2024	0	1	-1
2025	0	1	-1
2026	0	1	-1

Justificación: Al no existir investigaciones previas asociadas al desarrollo de cultivos lácticos bioprotectores con cepas nativas del departamento de Nariño, no existe antecedentes bibliográficos que se especifique las metodologías o condiciones de aplicación del cultivo láctico sobre la matriz del queso y sus efectos sobre el producto terminado en almacenamiento y en la ruta comercial.

6.8 Bien o servicio: queso fresco con cultivo bioprotector caracterizado

Medido a través de: Número

Descripción: documento de investigación de los resultados de la evaluación de la adición del cultivo bioprotector sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales del queso.

AÑO	OFERTA	DEMANDA	DEFICIT
2013	0	1	-1
2014	0	1	-1
2015	0	1	-1
2016	0	1	-1
2017	0	1	-1
2018	0	1	-1
2019	0	1	-1
2020	0	1	-1
2021	0	1	-1
2022	0	1	-1
2023	0	1	-1
2024	0	1	-1
2025	0	1	-1
2026	0	1	-1

Justificación: teniendo en cuenta que el queso fresco en el departamento de Nariño se ha elaborado siempre bajo las mismas condiciones tradicionales, se desconoce a la fecha el efecto de la aplicación de un cultivo láctico bioprotector sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales del queso.

6.9 Bien o servicio: Artículos científicos

Medido a través de: Número

Descripción: Artículos científicos elaborados y enviados para publicación en revistas indexadas sobre los resultados encontrados en el marco de ejecución del proyecto.

AÑO	OFERTA	DEMANDA	DEFICIT
2013	0	6	-8
2014	0	6	-8
2015	0	6	-8
2016	0	6	-8
2017	0	6	-8
2018	0	6	-8
2019	0	6	-8
2020	0	6	-8
2021	0	6	-8
2022	0	6	-8
2023	0	6	-8
2024	0	6	-8
2025	0	6	-8
2026	0	6	-8

Justificación: Los artículos científicos asociadas a los resultados obtenidos en la ejecución del proyecto son un medio de divulgación científica y social del conocimiento generado.

6.10. Bien o servicio: Queseros artesanales formados en elaboración técnica de queso bajo especificaciones de inocuidad y bioprotección

Medido a través de: Número

Descripción: 60 queseros artesanales capacitados en buenas prácticas de manufactura, procesos estandarizados y uso de cultivos lácticos bioprotectores, lo cual permita generar producción de quesos frescos con una mayor calidad e inocuidad para los consumidores.

AÑO	OFERTA	DEMANDA	DEFICIT
2013	0	60	-60

2014	0	60	-60
2015	0	60	-60
2016	0	60	-60
2017	0	60	-60
2018	0	60	-60
2019	0	60	-60
2020	0	60	-60
2021	0	60	-60
2022	0	60	-60
2023	0	60	-60
2024	0	60	-60
2025	0	60	-60
2026	0	60	-60

Justificación: A la fecha no habido proyectos de apoyo a organizaciones a nivel de mejoramiento en plantas procesadoras asociadas al mejoramiento y optimización de su calidad. Los queseros artesanales producen el queso bajo condiciones tradicionales aun siendo un mercado cambiante y cada vez más competitivo, es por ello que los procesos de formación a queseros artesanales en mejoramiento de la calidad del queso fresco y estrategias de optimización con sistemas de bioprotección garantiza mejoras en el desarrollo de su actividad económica.

10. DESCRIPCION METODOLOGICA

Las actividades a desarrollar en el marco de la ejecución del proyecto son secuenciales y generan productos y entregables tal como se indica en la tabla siguiente titulada “Estructura de la cadena de valor del proyecto”.

Posteriormente se hace una descripción detallada de cada una de las actividades como soporte y justificación al presupuesto del proyecto.

ESTRUCTURA DE LA CADENA DE VALOR DEL PROYECTO

OBJETIVOS ESPECIFICOS	PRODUCTO	ENTREGABLE	ACTIVIDAD	
1. Realizar aislamientos de bacterias ácido láctico y un diagnóstico de la producción artesanal de quesos frescos en el departamento de Nariño.	Infraestructura para la investigación dotada	Diagnóstico técnico y social de la producción artesanal de quesos frescos	1.1.1 Realizar trámites de solicitud de contrato de acceso a recursos genéticos y sus derivados	
			1.1.2 Recopilar información en empresas artesanales productoras de quesos frescos	
			1.1.3. Realizar un diagnóstico técnico y social de la producción quesera artesanal en Nariño.	
			1.1.4 Realizar adecuaciones de infraestructura y proporcionar los equipos y medios requeridos para el desarrollo del cultivo bioprotector	
		Banco de cepas de Bacterias Acido Lácticas (BAL)	1.1.5. Recolección de muestras de leche y queso	
			1.1.6. Realización de análisis fisicoquímicos de leche y queso.	
			1.1.7. Obtener aislamientos de bacterias ácido lácticas (BAL)	
			1.1.8. Realizar caracterización fenotípica preliminar de BAL y seleccionar productoras de isómeros del ácido láctico L(+) o DL	
			1.1.9. Realizar mantenimiento y caracterización molecular de BAL	
			Banco de cepas de microorganismos patógenos	1.1.10. Realizar aislamiento, identificación y cuantificación de cepas patógenas en leche y quesos artesanales en la zona de muestreo
				1.1.11. Realizar mantenimiento de cepas patógenas
2. identificar y evaluar cepas bal autóctonas con propiedades de bioproservación para desarrollar un cultivo bioprotector aplicable en	Artículos de investigación	Cepas de BAL con potencial de bioprotección en quesos frescos identificadas y caracterizadas	2.1.1 Realizar pruebas de actividad inhibitoria frente a patógenos	
			2.1.2 Identificar cepas BAL nativas mediante secuenciación parcial del gen 16S rRNA	
			2.1.3 Realizar caracterización tecnológica de cepas BAL.	
		Cultivo bioprotector diseñado	2.1.4 Evaluar diferentes mezclas de cepas y su espectro de inhibición In vitro	

la elaboración de quesos frescos.	Artículos científicos	Cultivo bioprotector estandarizado a escala Piloto	2.1.5 Evaluar el diseño y modelo de aplicación del cultivo bioprotector sobre la matriz de queso fresco
			2.1.6 Evaluar el punto óptimo de corte de la cuajada
			2.1.7 Evaluar el efecto de aplicación del cultivo bioprotector sobre las características sensoriales del queso fresco
		Queso con cultivo bioprotector caracterizado	2.1.8 Evaluar el efecto de aplicación del cultivo bioprotector sobre las características fisicoquímicas del queso fresco.
		2.1.9. Evaluar el efecto de aplicar técnicas de bioprotección y BPM a escala piloto en la cadena de producción de leche y queso fresco.	
3. Mejorar la calidad de la producción de las queserías artesanales mediante formación en buenas prácticas de manufactura, bioprotección y estandarización de los procesos de elaboración.	Documentos de investigación	Queseros artesanales formados en elaboración industrial de queso bajo especificaciones de inocuidad y bioprotección	3.1.1 Elaborar guías y manuales sobre aplicación de BPM y procesos estandarizados para elaboración de quesos frescos con inocuidad y bioprotección
			3.1.2 Realizar talleres de capacitación a productores artesanales de quesos frescos
		Resultados del proyecto socializados entre la comunidad científica	3.1.3 Realizar procesos de divulgación de resultados del proyecto.

OBJETIVO 1: REALIZAR AISLAMIENTOS DE BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS Y UN DIAGNÓSTICO DE LA PRODUCCIÓN ARTESANAL DE QUESOS FRESCOS EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO

PRODUCTO 1: Infraestructura para la investigación dotada.

Entregable: Diagnóstico técnico y social de la producción artesanal de quesos frescos elaborado.

1.1.1 Realizar trámites de solicitud de contrato de acceso a recursos genéticos y sus derivados:

En el proyecto de investigación propuesto se realizarán actividades como las siguientes:

- Separación de las unidades funcionales y no funcionales del ADN y el ARN, en todas las formas que se encuentran en la naturaleza.
- el aislamiento de una o varias moléculas, entendidas estas como micro y macromoléculas, producidas por el metabolismo de un organismo.
- Posibilidades de solicitud de patentes sobre una función o propiedad identificada de una molécula, que se ha aislado y purificado.

Razón por la cual según lo establecido por el artículo 2 de la Resolución 1348 de 2014 y en el Manual de acceso a recursos genéticos (Ministerio del medio ambiente, 2017), se requiere tramitar el contrato de acceso a recursos genéticos y sus derivados. Dicho trámite lo deberá realizar la entidad ejecutora, en este caso la Universidad de Nariño, acorde a lo establecido en el Manual de acceso a recursos genéticos (Ministerio del medio ambiente, 2017) ante el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, según los Decretos 730 de 1997 y 3570 de 2011. El tiempo requerido para este trámite podría ser de hasta 6 meses y hasta no firmarse el contrato de acceso a recursos genético el proyecto no podrá iniciar su ejecución.

1.1.2 Recopilar información en empresas artesanales productoras de quesos frescos. Para esta actividad se seleccionarán empresas localizadas en los 22 municipios descritos en los apartados de población objetivo y localización de la alternativa. Tales municipios están ubicados en las principales cuencas lecheras del departamento y es donde se concentra la mayor producción de queso fresco artesanal.

Teniendo en cuenta que en un municipio pueden existir varias microempresas dedicadas al acopio y/o elaboración de quesos frescos, en primer lugar se realizará

una recopilación de información básica que permita seleccionar la organización que será beneficiaria del proyecto en cada uno de los municipios. En el anexo 3 se especifican los términos de referencia para la selección de beneficiarios de los procesos de formación y capacitación a desarrollarse en el marco de ejecución del proyecto, para lo cual la información a recolectar se centrará principalmente en los siguientes aspectos:

- Volumen de acopio/procesamiento por línea de producto.
- Número de personas en planta de proceso.
- Número de proveedores de leche y/o asociados de la empresa.
- Análisis de infraestructura y equipos existente.
- Análisis de cumplimiento de normas de BPM
- Coordenadas geográficas.

La recopilación de dicha información estará a cargo de un grupo de profesionales de carreras como Ingeniería Agroindustrial, Ingeniería de Alimentos, administradores de empresas o áreas afines, quienes serán capacitados previamente en la función a realizar. Se solicitará autorización para que los encuestadores puedan visitar las microempresas y presenciar el proceso de elaboración de los productos, con el fin de obtener la información sobre la infraestructura y medios de producción y el nivel de cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura.

Una vez recopilada la información necesaria se llevará a cabo la selección de las empresas beneficiarias según lo establecido en el anexo 3 de este proyecto.

Presupuestalmente para el desarrollo de esta actividad se requiere de “gastos de viaje” descritos en el presupuesto detallado, en el ítem: 07. Gastos de viaje. Como también los gastos de talento humano descritos en el ítem 0.1 Talento Humano de los profesionales vinculados al desarrollo de esta actividad.

1.1.3: Realizar un diagnóstico técnico y social de la producción quesera artesanal en Nariño. Una vez seleccionadas las 22 organizaciones beneficiarias del proyecto, se procederá a recopilar la información para elaborar el diagnóstico técnico y social de la producción artesanal de quesos frescos, en todos los eslabones de la cadena de suministro. Para efectos de análisis las 22 unidades productivas seleccionadas se considerarán como una muestra representativa de toda la cadena productiva en el Departamento.

La información para el diagnóstico tendrá los siguientes componentes:

Componente Técnico

- Identificación y características de los proveedores de leche

- Rutas y características de logística de acopio de leche.
- Capacidad instalada (infraestructura y equipos)
- Volumen de procesamiento por tipo de producto
- Identificación de las prácticas habituales de procesamiento
- Rendimientos de proceso.
- Condiciones higiénico sanitaria de proceso
- Estimación de costos de producción

Componente comercial

- Identificación de canales de comercialización, nichos de mercado, volúmenes de ventas, precios, condiciones de negociación.
- Identificación de los principales clientes y de sus requisitos respecto al producto.
- Estimación del tiempo de vida útil promedio de quesos frescos (determinado mediante encuesta como el tiempo en días promedio de durabilidad a transformadores, distribuidores y minoristas).
- Rutas y características de la logística de comercialización.
- Condiciones técnicas de comercialización (tipo, características y condiciones de transporte del producto).

Componente social

- Perfil económico – social de los socios, propietarios y de las personas que dependen directamente de las labores de la planta/centro de acopio (nivel educativo, edad, sexo, nivel de ingresos).

Este diagnóstico y proceso evaluativo servirá como línea base para desarrollar y medir las acciones de mejoramiento propuestas en el marco de ejecución del proyecto.

Entregable: Banco de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) implementado.

1.1.4 Realizar adecuaciones de infraestructura y proporcionar los equipos y medios requeridos para el desarrollo del cultivo bioprotector: Para el desarrollo de las actividades investigativas se requiere disponer de espacios de trabajo especializados que cuenten con las condiciones de seguridad y cumplan las normativas actuales para la realización de ensayos con microorganismos y con alimentos. Por esta razón, en esta fase del proyecto se requiere realizar la adecuación de un laboratorio de análisis microbiológico de alimentos y un laboratorio de análisis fisicoquímico de alimentos, con características técnicas que garanticen la mayor seguridad y calidad en los resultados de los análisis.

Además de las adecuaciones de los laboratorios, se requiere adquirir los equipos, utensilios, materiales, reactivos, etc., para el cumplimiento de los objetivos del proyecto.

La Universidad de Nariño cuenta con los espacios físicos ya asignados en un edificio para ubicar los laboratorios, pero se requiere hacer las adecuaciones locativas, acorde con los documentos soporte anexos al proyecto, que se presentan en la carpeta: Cotizaciones – subcarpeta Infraestructura.

Una vez el proyecto sea aprobado y se cuente con los recursos requeridos, se procederá a realizar una convocatoria pública para contratar la realización de las obras de adecuación de los laboratorios. Una vez surtido este proceso y legalizado el contrato, se iniciará a la ejecución de las obras. La adecuación de los dos laboratorios deberá ser ejecutada simultáneamente para agilizar su desarrollo en el menor plazo posible.

En el caso del laboratorio de análisis microbiológico de alimentos se iniciará con las actividades levantamiento de muros perimetrales, pisos y sistema estructural interior, posteriormente se seguirá con el desarrollo de los demás capítulos en su orden constructivo, que incluyen la instalación de redes hidro sanitarias, eléctricas, de gas, acabados, puertas, ventanas y dotación de muebles.

En el caso del laboratorio de análisis fisicoquímico de alimentos se requiere hacer adecuaciones estructurales al interior de una obra existente para continuar con la instalación de redes, acabados y dotación de muebles.

La justificación para la adecuación de infraestructura y dotación de equipos de laboratorio se encuentra en el Anexo 1: Justificación de los requerimientos de adecuación de infraestructura y dotación de equipos para la implementación de laboratorios para análisis fisicoquímico de alimentos y laboratorio de microbiología de alimentos.

Los detalles de gastos de las adecuaciones se describen en el ítem 08 del presupuesto correspondiente a Infraestructura, los equipos de laboratorio en el ítem 02 Equipos y software y los gastos de materiales consumibles en el ítem 05 Materiales e Insumos.

1.1.5 Recolección de muestras de leche y queso. Las muestras de leche y queso serán recolectadas en plantas localizadas en distintas zonas geográficas del departamento de Nariño. Para seleccionar los sitios de muestreo se tuvo en cuenta tanto la vocación productora de leche y queso, como una alta variabilidad de condiciones ambientales (temperatura, altitud, humedad) con el fin de garantizar la mayor diversidad microbiana.

Las muestras serán tomadas en plantas procesadoras y/o centros de acopio seleccionados según lo descrito en la actividad 1.1.2: recopilar información en

empresas artesanales productoras de quesos frescos. Los municipios y sus condiciones de temperatura ambiente y altitud se presentan en la siguiente tabla.

Características geográficas de municipios donde se colectarán las muestras.

No	MUNICIPIO	TEMPERATURA (°C)	ALTITUD (msnm)
1	Guachucal	8	3180
2	Aldana	10	3050
3	Cuaspud carlosama	10	3050
4	Cumbal	10	3050
5	Túquerres	11	3104
6	Contadero	12	2475
7	Córdoba	12	2867
8	Gualmatan	12	2.870
9	Iles	12	2985
10	Ipiales	12	2900
11	Ospina	12	2700
12	Potosí	12	2750
13	Puerres	12	2817
14	Pupiales	12	3014
15	Sapuyes	12	2900
16	Pasto	13	2527
17	Tangua	14	2400
18	Nariño	15	2467
19	La florida	17	2077
20	Mallama	17	1809
21	Buesaco	18	1959
22	Guaitarilla	20	1800

Los municipios donde se tomarán las diferentes muestras se relacionan en la siguiente figura marcados en verde.

Distribución de zonas de muestreo:



Las muestras serán rotuladas y transportadas bajo condiciones de refrigeración en neveras portátiles con geles congelados, para garantizar su estabilidad hasta llegar a los laboratorios de la Universidad de Nariño y ser procesadas.

Una vez las muestras en los laboratorios se procederá a realizar las pruebas descritas en la actividad 1.1.5: realizar análisis fisicoquímicos de leche y queso

Presupuestalmente para el desarrollo de esta actividad se requiere de “gastos de viaje” descritos en el presupuesto detallado, también los gastos de talento humano descritos en el ítem 0.1 de los profesionales vinculados al desarrollo de esta actividad. Se requiere además de materiales apropiados para la recolección y transporte de muestras descritos en el ítem. 05. Materiales e insumos.

1.1.6 Realizar análisis fisicoquímicos de leche y queso. A partir de cada muestra de queso se tomarán porciones del núcleo empleando una tabla de corte lavable, cuchillo estéril y una envoltura de plástico (Brooks et al., 2012). Se realizarán los análisis fisicoquímicos establecidos según la Norma Técnica Colombiana NTC894 para queso fresco (ICONTEC, 2011-12-14).

Materia grasa: Metodología de Gerber de acuerdo a NTC 4722.

Humedad: Gravimetría de acuerdo a NTC 5476, empleando para ello un determinador de humedad halógeno.

Proteína: Se cuantificará utilizando el método Kjeldahl.

pH: Se medirá por potenciometría.

La composición de las muestras de leche se analizará además mediante un equipo automatizado tipo MilkoScan, que permite evaluar de forma rápida parámetros como: proteína, materia grasa, sólidos totales, punto crioscópico y lactosa.

Los equipos requeridos y sus accesorios para el desarrollo de las diferentes pruebas fisicoquímicas serán adquiridos en el marco de ejecución del proyecto. Los equipos de análisis fisicoquímico se describen en el ítem 0.2 Equipos y software del presupuesto.

1.1.7 Obtener aislamientos de bacterias ácido lácticas (BAL). El aislamiento de BAL se realizará a partir de las muestras colectadas según la actividad: 1.1.4. Se empleará el procedimiento de dilución seriada y siembra en placa descrito por diferentes autores (Alegría et al., 2009; Morales et al., 2010; Muñoz et al., 2011; Ordiales et al., 2013; Hwanhlem et al., 2014). Se tomarán asépticamente 25 g de queso o 25 mL de leche que serán suspendidos en 225 mL de solución salina 0,85% para obtener la dilución 1:10. Las suspensiones serán homogenizadas empleando un equipo Stomacher (Alegría et al., 2009).

Después de homogenizar la suspensión por 1 minuto, se prepararán diluciones seriadas en solución salina 0,85% o en diluyente de máxima recuperación, a partir de cada dilución se inocularán 100 uL sobre cajas de Petri conteniendo diferentes medios de cultivo selectivos/diferenciales para BAL tales como: agar MRS preacidificado a pH 5.4 (*Lactobacilos*), agar MRS suplementado con púrpura de bromocresol 0,02% y cicloheximida 0,7% (BAL); agar M17 suplementado con lactosa (*Lactococos*) y MSEA suplementado con vancomicina (*Leuconostocs*).

Todos los medios de cultivo serán inoculados por triplicado e incubados a 35°C por 24-48 horas bajo condiciones de anaerobiosis (GasPak anaerobic system) excepto el medio M17 y MSEA a 30°C por 48 horas. Se realizarán recuentos de UFC/mL y las colonias de BAL seleccionadas serán aisladas por repetidos procedimientos de siembra por estría en el medio correspondiente hasta purificar los aislamientos.

Una vez purificados los aislamientos se procederá a realizar caracterización fenotípica preliminar de BAL, según como se describe a continuación en la actividad 1.1.8.

Para el desarrollo de esta actividad presupuestalmente se requiere de los gastos de personal asociado al área de microbiología, gastos de consumibles descritos en el ítem 05. Materiales e Insumos, las cotizaciones respectivas se presentan en la carpeta de cotizaciones / subcarpeta de “Materiales e insumos”.

1.1.8 Realizar caracterización fenotípica preliminar de BAL y seleccionar productoras de isómeros del ácido láctico L(+) o DL. Los aislamientos de BAL purificados serán caracterizados inicialmente de acuerdo a los rasgos básicos del grupo BAL, no formadores de endosporas, Gram positivos y catalasa y oxidasa negativos, siguiendo protocolos descritos por Domingos-Lopes et al. (2017). De estos aislamientos bacterianos caracterizados y de algunas cepas de referencia serán determinados los isómeros del ácido láctico siguiendo la metodología recomendada por Jehanno et al., (1992). El método consiste en una reacción de óxido-reducción enzimática esteroespecífica catalizada por la enzima lactato-deshidrogenasa, que oxida el lactato en piruvato reduciendo simultáneamente el isómero L(+) a D(-) a una forma NAD (NADH), produciendo una reacción de acople reduciendo la sal de tetrazolium en presencia de diaforasa, formando un compuesto insoluble rojizo si es productora de isómero L(+). Con este método es posible diferenciar las cepas productoras de los diferentes isómeros, por la coloración que presentan frente a la reacción enzimática. Las bacterias lácticas son caracterizadas por la producción de diferentes isómeros del ácido láctico mediante la fermentación de la glucosa. Durante la fermentación pueden producir ácido láctico L(+) levorrotatorio o D(-) dextrorrotatorio o la mezcla de ambos DL (Carr et al., 2002). La evaluación de la FAO/WHO sobre los isómeros del ácido láctico para uso o consumo humano rechaza el uso del ácido láctico D (-) en infantes por sus efectos secundarios, como la acidosis, en niños con síndrome del intestino corto, al consumir mezclas de probióticos con algunas cepas productoras de ácido láctico D (-) (Betancourt Botero et al., 2013). Por ello se seleccionarán solo aquellas BAL productoras de ácido láctico L(+) o DL, Para garantizar la inocuidad de los aislamientos bacterianos y del cultivo láctico que se desarrolle.

Paralelamente se realizarán pruebas preliminares de antagonismo y producción de exopolisacáridos (EPS), siguiendo los protocolos descritos por Abushelaibi et al. (2017) y Domingos-Lopes et al. (2017).

Una vez realizada la caracterización fenotípica preliminar se realizará el mantenimiento y caracterización molecular según se describe a continuación.

1.1.9 Realizar mantenimiento y caracterización molecular de BAL. Los aislamientos de BAL caracterizados preliminarmente serán debidamente codificados como se explica más adelante y crioconservados en el medio correspondiente con glicerol al 20% a -80°C obteniendo 5 crioviales por cada aislamiento BAL (Moraes et al., 2010). Para evaluar la biodiversidad de las bacterias seleccionadas y detectar posibles duplicados (Alegría et al., 2010), los aislamientos bacterianos serán caracterizados genéticamente por la metodología de RAPD PCR. Las metodologías estandarizadas para realizar esta caracterización molecular serán proporcionadas por el Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC, España) entidad que cuenta con amplia experiencia y protocolos estandarizados para este propósito y es una de las entidades colaboradoras en el proyecto a través del Programa DIRENA de la Agencia de Desarrollo Local (ADEL). A continuación se describe en términos generales ya metodología de RAPD-PCR.

Metodología de RAPD-PCR: Las principales etapas del método de obtención de los perfiles de polimorfismo de ADN mediante RAPD y su tratamiento posterior son las siguientes:

1. Preparación de los extractos crudos de ADN: la técnica RAPD puede ser aplicada a ADN purificado o bien a ADN obtenido directamente de un cultivo (líquido o sólido), lo que resulta mucho más rápido y sencillo. Para la extracción del ADN en el presente estudio se utilizará el método de extracción rápida de Veyrat et al. (1999), con las modificaciones propuestas por Sánchez et al. (2004). Se partirá de una colonia bien desarrollada que se resuspenderá, con la ayuda de una punta de pipeta estéril, en 50 μ L de tampón 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) que contenga 5 U de mutanolisina y se incubará a 37°C durante 2 horas. Tras este pretratamiento enzimático que debilita las paredes celulares, la suspensión celular se centrifugará (13600 g/15 min/4°C) y el sedimento celular obtenido se lavará con tampón 10 mM Tris-HCl (pH 9,0). Finalmente se resuspenderá en 50 μ L de tampón de lisis (10 mM Tris-HCl, pH 9,0; 1% Tritón X-100) y se introducirá en un baño con agua a ebullición durante 5 minutos, para la lisis celular.
2. Amplificación del ADN:
Los aislados de *Lactococcus* y *Enterococcus* serán genotipados empleando la técnica RAPD-PCR utilizando un cebador y el procedimiento descrito por Giraffa y Rossetti (2004). Los aislados de *Leuconostoc* serán genotipados igualmente mediante la técnica RAPD-PCR utilizando otros cebadores específicos, cada uno de ellos en distintas reacciones de PCR, y con el procedimiento descrito por Seseña et al. (2005). Las cantidades de los componentes de las mezclas de reacción y los programa de amplificación a utilizar serán los que se tienen establecidos en los protocolos estandarizados del IPLA. Las reacciones de amplificación se llevarán a cabo en un termociclador. Al término de la reacción los tubos con los amplificadores se mantendrán a 5°C hasta que se realice la electroforesis. En todos los ensayos se incluyó una muestra-control negativa que no contenga ADN.
3. Electroforesis en geles de agarosa de los productos de amplificación:
la separación y visualización de los productos de amplificación se realizará mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa. Los geles se visualizarán en un transiluminador ultravioleta (UV) a 254 nm.

Para la organización y manejo del cepario de BAL proveniente de la microbiota autóctona de quesos frescos y leche, se seguirá el protocolo descrito por Megahed y Moneib, (1990). Brevemente, se partirá de uno de los crioconservados de cada aislamiento BAL seleccionado al azar cada 6 meses para chequear viabilidad y pureza mediante el método de recuento de viables en el medio correspondiente y como procedimiento de control de calidad post-conservación. Paralelamente se establecerán otras metodologías de conservación como por ejemplo, la liofilización que se planea llevar a cabo en laboratorios de apoyo, donde se cuente con el equipo

liofilizador. Con respecto a la documentación, cada cepa que sea depositada en la colección recibirá un código y todos los detalles de su procedencia, identificación y otros detalles serán descritos organizadamente en una hoja de cálculo Excel. Para esto serán requeridos contar con hardware y software que permitan construir y mantener esta base de datos.

Simultáneamente al proceso de aislamiento de bacterias ácido lácticas, también se aislarán microorganismos patógenos presentes en las muestras de leche y queso, según se describe en la actividad 1.1.10: Realizar aislamiento, identificación y cuantificación de cepas patógenas presentes en leche y quesos artesanales en la zona de muestreo.

Entregable: Banco de cepas de microorganismos patógenos implementado.

1.1.10: Realizar cuantificación, aislamiento e identificación de bacterias patógenas presentes en leche y quesos artesanales en la zona de muestreo:

Para esto se seguirán los protocolos estandarizados por el Laboratorio de Salud Pública (LDSP) del Instituto Departamental de Salud de Nariño (IDSN), una de las entidades aliadas del proyecto. A continuación se describen los métodos de ensayo para los análisis microbiológicos de patógenos, según el Portafolio de Servicios del LDSP de Nariño - Código G-LSPSSP02, 2017. Para Coliformes totales y Coliformes fecales (Número Más Probable por diluciones en tubo múltiple, rango de 3 – 1100/g o mL, según Comisión Internacional para Especificaciones Microbiológicas de alimentos - ICMSF). Para bacterias mesófilas aerobias (recuento en placa por siembra en profundidad, 30 – 300 UFC/g o mL, según ICMSF). Para mohos y levaduras (recuento en placa por siembra en profundidad, 30 – 300 UFC/g o mL, según ICMSF). Las bacterias patógenas a aislar e identificar por el LDSP, incluirán: *Esherichia coli* (método horizontal para la enumeración de *E. coli* β-Glucoronidasa positivo por recuento en placa por siembra en profundidad, hasta 150 UFC/g o mL, según ISO 16649:2001); *Staphylococcus coagulasa* positivo (recuento en placa por siembra en superficie, de 15 a 150 UFC/g o mL, según ICMSF) y *Listeria monocytogenes* (por Ausencia/Presencia en 25 g o mL, según VIDAS LMO2 AFNOR BIO y FDA-BAM tradicional).

Posterior al aislamiento de microorganismos patógenos presentes en las muestras de leche y quesos artesanales procedentes de los diferentes municipios, se realizará el mantenimiento de las cepas patógenas según se describe a continuación en la actividad 1.1.11: realizar mantenimiento de cepas patógenas.

1.1.11 Realizar mantenimiento de cepas patógenas. Los aislamientos de bacterias patógenas obtenidos serán criopreservados en caldo BHI con glicerol al 20% en un ultracongelador a -80°C, para emplearse en los análisis de actividad inhibitoria de cepas BAL (Donnelly, 2004; Irkin, 2010). La organización y manejo del

cepario de microorganismos patógenos obtenidos se realizará como se describió para el cepario de BAL.

Para el mantenimiento de cepas BAL y cepas de patógenos se emplearán equipos incluidos en el Item 0.2 Equipos y software, como también los insumos descritos en el ítem 05. Materiales e insumos.

Hasta esta etapa que comprende el primer objetivo del proyecto se cuenta con el banco de cepas BAL nativas del departamento de Nariño y de microorganismos patógenos, a continuación se realizará la identificación y se evaluará el efecto inhibitorio y la potencialidad biotecnológica de dichas cepas.

OBJETIVO 2. IDENTIFICAR Y EVALUAR CEPAS BAL AUTÓCTONAS CON PROPIEDADES DE BIOPROSERVACIÓN PARA DESARROLLAR UN CULTIVO BIOPROTECTOR APLICABLE EN LA ELABORACIÓN DE QUESOS FRESCOS.

PRODUCTO 1: ARTICULOS CIENTIFICOS

Entregable: Cepas de BAL con potencial de bioprotección en quesos frescos identificadas y caracterizadas.

2.1.1 Realizar pruebas de actividad inhibitoria frente a patógenos.

Para realizar las pruebas de la actividad inhibitoria de las cepas BAL frente a microorganismos patógenos predominantes en los quesos frescos, inicialmente se prepararán las muestras como se describe a continuación.

Las cepas de bacterias ácido lácticas crioconservadas en la actividad anterior serán cultivadas en 20 mL de un medio específico para cada tipo de BAL por 72 h a 30 °C anaeróbicamente y se obtendrá un extracto del sobrenadante centrifugado a 10.000 rpm/4 °C/10 min.

Los cultivos de los microorganismos patógenos se desarrollarán a partir de las muestras crioconservadas, diluyendo hasta alcanzar una concentración de $1,5 \times 10^{-12}$ bacterias, según el patrón de Mc Farland. Se adicionarán 15 µL de la dilución de bacterias en tubos con 15 mL de Trypticase Soya semisólido o medio específico para cada tipo de microorganismos, para formar una sobrecapa, posteriormente se incubarán a 30 °C/ 48 h.

Las cepas de bacterias patógenas a evaluar serán las obtenidas en los Laboratorios del Instituto Departamental de Salud de Nariño, a partir de las muestras de leche y quesos frescos. Todos los patógenos serán propagados a partir de los criopreservados en caldo BHI y plaqueados en agar BHI para observar su pureza.

En caso de que no se logre aislar algunos de los microorganismos patógenos a estudiar, en las muestras de leche y queso recolectadas en los 22 municipios, se emplearán cepas que el Instituto Departamental de Salud de Nariño conserva como resultado de otros análisis y se mantienen como muestras de referencia.

La actividad inhibitoria se determinará por el método de difusión en pozos mediante la colocación de penicilindros de 8 mm en el medio específico para cada microorganismos patógeno y en los pozos generados por el penicilindro se deposita el cultivo con la cepa BAL, el diámetro de los halos de inhibición generados alrededor del pozo serán un indicativo del antagonismo generado (Ramirez et al., 2016).

Las cepas que den lugar a un halo de inhibición del crecimiento serán seleccionadas para determinar la presencia de sustancias antimicrobianas en los sobrenadantes libres de células (SLC) mediante el test de difusión en agar, utilizando los indicadores más sensibles. Los sobrenadantes se filtrarán empleando filtros esterilizados de 0.22 μm (Hassanien et al., 2014) y se realizarán diluciones seriadas que se dispondrán en discos esterilizados para luego depositarse en cajas de Petri conteniendo agar BHI y los patógenos que previamente serán sembrados empleando un hisopo esterilizado. Los platos se incubarán a 37°C por 24 y 48 horas, tiempos en los cuales se medirá la zona de inhibición del crecimiento de los patógenos en mm. Todas estas pruebas serán realizadas por triplicado (Arqués et al., 2005; Yang et al., 2012; Patel et al., 2013; Kargozari et al., 2014).

Diseño experimental: se realizará un diseño completamente al azar teniendo como factor el tipo de cepa y como variable de respuesta el nivel de inhibición del patógeno, evaluado a través de la medida (mm) del halo de inhibición generado. Como resultado del diseño experimental se obtendrá un conjunto de cepas con potencial biotecnológico de inhibición y serán cepas candidatas a formar parte del diseño del cultivo láctico bioprotector. Para determinar las diferencias entre tratamientos se realizarán análisis de varianza y prueba de rangos múltiples utilizando el software Statgraphics® Centurion XVI (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA).

2.1.2 Identificar cepas BAL nativas mediante secuenciación parcial del gen 16S rRNA.

La identificación molecular de las BAL se llevará a cabo mediante secuenciación parcial del gen 16S rRNA siguiendo el protocolo de PCR de colonia descrito por Revelo et al., (2013), alternativamente para la extracción de DNA, será necesario enriquecer las muestras en caldo de cultivo MRS e incubarlas a 37°C durante 24 horas o hasta que presenten turbidez (Suárez, 2007). Se utilizará, por ejemplo, el Kit BiOstic® Bacteremia DNA Isolation (USA Cientific), posteriormente, se verificará la concentración de DNA por espectrofotometría usando un equipo NanoDrop 2000. El proceso de secuenciación se llevará a cabo como un servicio tecnológico con el

IPLA de España. Los amplicones de PCR serán enviados para la secuenciación a la empresa MACROGEN (Korea), con las secuencias obtenidas se realizarán los respectivos análisis bioinformáticos.

Como parte de la actividad se llevará a cabo un proceso de estandarización de las metodologías por parte de equipo científico conformado por investigadores de la Universidad de Nariño y el IPLA de España. El procedimiento en mención se realizará en Instalaciones del IPLA durante un periodo de 4 meses para el investigador que coordinará los procesos microbiológicos y moleculares y de 20 días para otros 3 investigadores vinculados al proyecto, este proceso permitirá implementar las metodologías en laboratorios de la Universidad de Nariño.

Para el procesamiento y envío de muestras biológicas para secuenciación, se tendrá en cuenta los procedimientos y permisos acorde a lo especificado en el Manual de acceso y recursos genéticos del Ministerio de Medio Ambiente, cuyos permisos se tramitarán al iniciar el proyecto.

Los gastos contemplados para el desarrollo de esta actividad son los asociados en los gastos de viaje de investigadores a España contemplados en el ítem 07. así como también el gastos de servicio tecnológico.

Una vez realizado los procesos de identificación se podrá determinar con certeza cuales cepas son realmente diferentes unas de otras, con lo cual se procederá a realizar la caracterización tecnológica de las mismas, para identificar su potencial de aprovechamiento, no solo en la industria láctea, sino de alimentos en general y para determinar cuáles presentan características apropiadas para su utilización en un cultivo bioprotector aplicable a quesos frescos. En la actividad 2.1.3 se describe la manera como se realizará la caracterización tecnológica de las cepas BAL aisladas.

2.1.3 Realizar caracterización tecnológica de cepas BAL

Actividad acidificante: se utilizará el método propuesto por Garriga et al. (1996). Las cepas se inocularán al 10% en caldo MRS y se incubarán a su temperatura óptima de crecimiento en condiciones aerobias hasta que los cultivos alcancen la fase exponencial. El crecimiento será determinado por medida de la densidad óptica (D.O.) a 660 nm en un espectrofotómetro y se estandarizarán todas las suspensiones celulares a la misma densidad óptica. La determinación consistirá en inocular el microorganismo a evaluar (1%) en 10 mL de leche desnatada estéril e incubar a 30°C. La capacidad acidificante será calculada como el ΔpH ocurrido durante la incubación ($\Delta\text{pH} = \text{pH tras incubación} - \text{pH inicial de la leche}$), para lo que se efectuará una medida del pH antes de la inoculación, otra tras 6 h y otra tras 24 horas de incubación.

Actividad proteolítica: la cuantificación de la actividad proteolítica de los aislados se realizará por el método espectrofotométrico descrito por Church et al. (1983) y modificado posteriormente en 1985 por los mismos autores. El método está basado

en la reacción del o-phthaldialdehído (oPA) y el β -mercaptoetanol con las aminas, formando 1,2-inositol disustituido que absorbe a 340 nm. Las cepas se inocularán al 10% en caldo MRS y se incubarán a su temperatura óptima de crecimiento en condiciones aerobias hasta que los cultivos alcancen la fase exponencial. El crecimiento se determinará por medida de la densidad óptica a 660 nm en un espectrofotómetro. Una vez se alcance la fase exponencial se centrifugará a máxima potencia durante 5 minutos, las células se lavarán dos veces con tampón fosfato 32 mM, pH 7,2, para minimizar el aporte de aminoácidos desde el medio de cultivo y se estandarizarán todas las suspensiones celulares a la misma densidad óptica. Las células se resuspenderán en el mismo volumen original (1 mL) y se inocularán al 1% en leche descremada en polvo reconstituida al 10%, incubándose durante 24 horas a 22°C. Posteriormente, se tomarán 0,5 mL del cultivo en un eppendorf y se añadirán 100 μ L de agua destilada y 1 mL de ácido tricloroacético para detener la reacción, agitándose la mezcla. Después de 10 minutos, la mezcla se centrifugará durante 5 minutos a 15000 g y se conservará el sobrenadante hasta análisis posterior. La determinación consistirá en añadir a 1 mL de la solución oPA a alícuotas de 50 μ L del sobrenadante preparado como se indica posteriormente. Se incubará durante 2 minutos a temperatura ambiente, y se medirá el incremento de absorbancia a 340 nm. La solución de oPA se preparará justo antes del análisis y consistirá en la mezcla de 50 mL de tetraborato sódico 0,1 M y SDS 2% (p/v), 80 mg de oPA (disueltos en 2 mL de metanol), 2 mL de mercaptoetanol y se enrasará a 100 mL con agua destilada. Los resultados se expresarán como mmol glicina/L (mmol Gly/L), interpolando los valores de absorbancia en una curva de glicina de concentraciones comprendidas entre 0,1 mM y 10 mM.

Actividad autolítica: la capacidad autolítica de los aislados se determinará en cultivos crecidos hasta la mitad de la fase exponencial de crecimiento en caldo MRS (D.O.660 = 0,7-0,8). Éstos se recogerán y lavarán por centrifugación a 10000 g durante 10 minutos a 4°C, resuspendiéndose las células en tampón fosfato sódico 20 mM, pH 6,8 (D.O.660=0,6-0,7). Las suspensiones celulares en tampón se incubarán durante 4 horas a 30°C y se medirá el descenso de densidad óptica a 660 nm cada 30 minutos. La capacidad autolítica se expresará según Lansgrud et al. (1987) como $100 - (A1/A2 \times 100)$, donde A1 y A2 son la mínima y máxima densidad celular, respectivamente, medidas durante la incubación.

Actividad lipolítica: para evaluar la capacidad lipolítica de las cepas se utilizarán dos medios de cultivo enriquecidos en materia grasa: a) Agar Nata: agar nutritivo con un 1% de nata añadida (38% materia grasa) de acuerdo al método desarrollado por Buffa et al. (2005); b) Agar Tributirina (Panreac) según el método propuesto por Morandi et al. (2006). Las cepas se inocularán al 10% en caldo MRS y serán incubadas a su temperatura óptima de crecimiento, en condiciones aerobias hasta que los cultivos alcancen la fase exponencial. A partir de la cepa revitalizada se realizará una siembra por estría en agar naata y se incubará durante 72 horas a 37°C, o bien en agar Tributirina durante 7 días a 37°C. La presencia de un halo alrededor de la colonia se interpreta como lipólisis positiva. El radio del halo medido en mm se utilizará como unidad arbitraria de la actividad lipolítica (Morandi et al., 2006). La ventaja de utilizar agar Nata frente agar Tributirina reside en utilizar la

grasa de la leche, que es el mismo sustrato que los microorganismos encontrarán en el queso, aunque con el método agar Tributirina los halos alrededor de las colonias son más visibles que en agar Nata tras 72 horas de incubación.

Producción de compuestos volátiles: La producción de compuestos volátiles durante la acidificación de la leche será evaluada usando micro extracción en fase sólida (SPME) y cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (GC / MS). Cien μL de células bacterianas mantenidas en MRS + glicerol y almacenadas a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ se cultivarán en 5 mL de TSB-YE y se incubarán a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. El crecimiento de las cepas en leche se llevará a cabo siguiendo el método de Fernández et al. (2012). Por duplicado, una alícuota de 0,1 mL de caldo con la cepa se inoculará en 9,8 mL de leche UHT a la que se añadirá 0,1 mL de una solución de ciclohexanona (0,4 mg / mL de leche), se depositará en viales herméticos con tapón de rosca y se incubará a 30°C durante 2 días. La SPME (utilizando una fibra recubierta de carboxeno / polidimetilsiloxano de 75 μm) se realizará por duplicado utilizando 2 g de la leche fermentada siguiendo el procedimiento descrito por Soto et al. (2015) y la separación cromatográfica y la identificación de compuestos volátiles utilizando el método de Carballo et al. (2018). Los resultados se calcularán como μg de ciclohexanona equivalente / g de leche. Se utilizarán como controles dos viales con 9,9 mL de leche UHT adicionada con 100 μL de la solución de ciclohexanona y sus compuestos volátiles se analizarán como se describió previamente. Los niveles de compuestos volátiles encontrados en las muestras de leche de control se restarán de los encontrados en la leche inoculada.

Producción de bacteriocinas: las cepas bacterianas se inocularán en medio MRS (100 mL) y se incubarán a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas en condiciones aeróbicas. Después de la incubación, se obtendrá el sobrenadante libre de células mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 15 minutos. El pH del sobrenadante libre de células se ajustará a pH 6,5 - 7,0 con NaOH 1 N para neutralizar los ácidos en el caldo de cultivo. El efecto inhibitorio de H_2O_2 en el sobrenadante se neutralizará mediante la adición de la enzima catalasa (5 mg / mL). Estas bacteriocinas crudas se utilizarán para probar la actividad antagonista usando dos cepas reconocidas por su susceptibilidad a las bacteriocinas: *Lactobacillus sakei* CECT 906 y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL 1403.

Actividades enzimáticas determinadas por el sistema API Zym: Con el objetivo de conocer la actividad enzimática de las cepas se utilizará el sistema API Zym (Api System, S.A., Francia), compuesto de una galería que permite el estudio de 19 actividades enzimáticas utilizando los reactivos Zym A y Zym B y siguiendo las instrucciones del fabricante. La acción de las respectivas enzimas sobre los sustratos naftil-derivados da lugar a la liberación de β -naftol y se detecta al añadir los reactivos Zym A y Zym B. El hecho de poner en la cúpula un agente tensoactivo (reactivo Zym A) facilita la solubilización del reactivo Zym B en el medio, desarrollándose el color que varía según la actividad enzimática ensayada. La actividad se medirá observando el color desarrollado después de 5 minutos. La

reacción se considera positiva si desarrollaba un determinado color para cada actividad y negativa si presentaba un color amarillo pálido o incoloro.

Resistencia a diferentes tipos de estrés

Resistencia a la sal: Las cepas se inocularán por duplicado al 1% en medio MRS conteniendo concentraciones de 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 y 6,0% de NaCl y se incubarán durante 24 horas a 32°C en placas de microtitulación. Transcurrido este tiempo se medirá la densidad óptica a 595 nm en un lector de microplacas. Los resultados se expresarán como el porcentaje de absorbancia alcanzada por los cultivos con respecto a la mostrada por los cultivos control en ausencia de NaCl (Sánchez et al., 2005).

Resistencia a acidez: La determinación de la resistencia a la acidez se realizará como se indica en el apartado anterior, utilizando medio MRS previamente acidificado con ácido láctico a pH 4,3, 4,6, 4,9, 5,2 y 5,5. Los resultados se expresarán utilizando como control un cultivo con medio sin acidificar (Sánchez et al., 2005).

Resistencia a la temperatura: La determinación de la resistencia a la temperatura se realizará inoculando un 1% de cada cepa en caldo MRS, incubando a diferentes temperaturas (10, 15 y 20°C para los *lactococos*) y midiendo la densidad óptica a 595 nm. Los resultados se expresarán utilizando como control un cultivo incubado a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo (30°C para los *lactococos*).

Evaluación de la seguridad de los aislados

Producción de aminas biógenas: Antes de realizar los ensayos y con objeto de inducir la producción de las correspondientes enzimas, las cepas serán subcultivadas 6 veces, a intervalos de 48 h, en caldo MRS al que se añadirá un 0,1% (p/v) del aminoácido sustrato del enzima a determinar (L-tirosina y L-histidina), (L-ornitina monohidrógeno o L-lisina monohidrógeno) y un 0,005% del cofactor piridoxal-5-fosfato (Bover-Cid y Holzapfel, 1999). La actividad amino-descarboxilasa de las cepas, será ensayada utilizando el método cualitativo descrito por Bover-Cid y Holzapfel (1999). En éste se realiza una siembra en estría de la cepa en estudio, en un medio con la siguiente composición: 0,5% (p/v) de triptona; 0,5% de extracto de levadura; 0,5% de extracto de carne; 0,25% de NaCl; 0,05% de glucosa; 0,1% de Tween 80; 0,02% de MgSO₄; 0,005% de MnSO₄; 0,004% de FeSO₄; 0,2% de citrato amónico; 0,001% de tiamina; 0,2% de K₂HPO₄; 0,01% de CaCO₃; 0,005% de piridoxal-5-fosfato; 0,006% de púrpura de bromocresol y un 2% de agar. Seguidamente, se añade un 1% (p/v) del aminoácido a ensayar y se ajusta el pH a 5,3. Las placas se incuban a 37°C durante 48 horas en condiciones de cultivo aerobias. La prueba se considera positiva si, tras la incubación, en el medio se produce un viraje del color amarillo a púrpura como consecuencia del aumento de pH producido por la descarboxilación del aminoácido. En el caso de la tirosina, por tratarse de un compuesto insoluble, se considera que el ensayo es positivo cuando

alrededor de la estría desaparecen los cristales del aminoácido. Paralelamente a todos los ensayos se sembrará una placa control para cada medio sin el aminoácido. De este modo se puede conocer si el incremento del pH es debido a la producción de otros metabolitos durante el crecimiento y detectar falsos positivos.

Resistencia a antibióticos: Con el objetivo de determinar la sensibilidad de los aislados *Enterococcus* frente a distintos antibióticos se utilizará la galería ATB ENTEROC 5 (BioMérieux) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. Esta galería permite obtener antibiogramas de 12 antibióticos para cada aislado a dos concentraciones diferentes (c y C). Siendo C una concentración más elevada que c. Para realizar la determinación se preparará una suspensión celular de turbidez equivalente al patrón 0,5 de la escala de McFarland. Para ello, se suspenderán varias colonias de cultivos puros frescos sembrados en agar en una ampolla de API Suspension Medium (medio isotónico). Se inoculará la muestra preparada en la galería ATB ENTEROC distribuyendo 135 μ L por cúpula y se incubará durante 24 horas a 37°C en anaerobiosis. El primer par de cúpulas no contienen antibiótico y se utilizarán como control de crecimiento de los microorganismos. La lectura e interpretación de las galerías se realizará de forma visual, comparando el desarrollo de turbidez con el control que no contiene antibiótico. Los aislados se clasificarán como sensibles, intermedios o resistentes a los determinados antibióticos. Algunos antibióticos sólo se estudiarán para una concentración. Si el aspecto de la colonia es claro, el resultado es negativo y la cepa es sensible, si el aspecto es turbio el resultado es positivo y la cepa es resistente.

Con la información recopilada acerca de las cepas que poseen buena actividad inhibitoria frente a microorganismos patógenos típicos de quesos frescos y una vez conocidas las características tecnológicas de dichas cepas, que permiten identificar su aplicabilidad en la elaboración de quesos frescos, el paso siguiente es realizar combinaciones entre las cepas más apropiadas y evaluar su capacidad de inhibición de patógenos a nivel in vitro y posteriormente en quesos elaborados a nivel piloto.

Entregable: cultivo bioprotector diseñado

2.1.4 Evaluar diferentes mezclas de cepas y su espectro de inhibición in vitro.

Para elaborar el cultivo bioprotector se escogerán aquellas cepas que hayan mostrado tener la mayor actividad inhibitoria frente a los patógenos comunes en queso fresco y que además posean características tecnológicas apropiadas para su uso en la elaboración de quesos frescos, tales como actividad acidificante, proteolítica, producción de aromas deseables y no indeseables, actividades enzimáticas deseables, etc. Para evaluar distintas mezclas de cepas inicialmente es necesario determinar la compatibilidad entre ellas, lo cual será determinado usando el método de difusión en agar, según se describe en el trabajo de Rodríguez et al. (2007). Partiendo de los aislados conservados en congelación, los cultivos serán reactivados en medios líquidos específicos para cada tipo de BAL y se

incubarán por 18 horas a 37°C, seguidamente se cultivarán durante 24 horas en las mismas condiciones y luego se sembrarán en superficie en capsulas de Petri con agar específico, luego de una preincubación de una hora a 37°C se perforarán pocillos en el agar de las placas con un perforador estéril y se llenarán con 50 µL del sobrenadante de las cepas a ensayar. Este sobrenadante se obtendrá de un cultivo de la cepa a ensayar incubado a 37°C por 18 horas e inmediatamente centrifugado esterilmente a 5000 g por 10 minutos. Luego las cajas serán incubadas por 24 horas a 37°C y se observará la presencia o ausencia de halos de inhibición alrededor de los pocillos.

Una vez definida la compatibilidad entre las cepas BAL nativas aisladas y según el número de éstas que finalmente se haya determinado que poseen buena inhibición de patógenos y adecuadas características tecnológicas se procederá a evaluar a nivel in vitro la actividad antagónica frente a patógenos de combinaciones de dos o más de dichas cepas, en proporciones iguales o distintas, utilizando el método de difusión en pozos descrito en la actividad 2.1.1. No es posible determinar previamente las concentraciones de cepas a usar en las mezclas, ya que en ello influirán factores relacionados con los resultados de la caracterización tecnológica de las cepas.

Desarrollo Experimental: Los efectos de bioconservación serán evaluados mediante un diseño completamente al azar, considerando como factor experimental la mezcla o combinación de cepas y como variable de respuesta la capacidad inhibitoria frente patógenos, medida como el diámetro del halo de inhibición. Los resultados serán comparados mediante análisis de varianza y pruebas de rangos múltiples usando el software Statgraphics® Centurion XVI (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA). El factor experimental con mejores resultados puede ser optimizado si se logra una combinación de cepas BAL con actividades inhibitorias diferentes, dicho efecto también será evaluado y analizado mediante los mismos análisis y pruebas descritas anteriormente.

Entregable 3: cultivo bioprotector estandarizado a escala piloto

2.1.5 Evaluar el diseño y modelo de aplicación del cultivo bioprotector sobre la matriz de queso fresco. Una vez identificadas a nivel de laboratorio las combinaciones de cepas BAL que presenten la mejor actividad inhibitoria frente a microorganismos patógenos y alterantes típicos de los quesos frescos y considerando además los resultados de la caracterización tecnológica de dichas cepas, se procederá a realizar producciones piloto, según la tecnología de elaboración del queso fresco definida y estandarizada, evaluando las combinaciones de cepas más promisorias y estudiando el efecto de su adición sobre las características microbiológicas y fisicoquímicas del queso. Además se evaluará el efecto de la aplicación del cultivo sobre el rendimiento quesero y finalmente se lleva a cabo un análisis organoléptico, comparando los resultados con los quesos elaborados de modo artesanal sin incorporación del cultivo láctico.

Considerando que el cultivo bioprotector es un nuevo componente en el queso, se evaluarán los cambios que ocasiona sobre los procesos de elaboración, para lo cual se realizara de acuerdo a la actividad: 2.1.5: Evaluar el diseño y modelo de aplicación del cultivo bioprotector sobre la matriz de queso fresco.

Para asegurar el buen funcionamiento del cultivo láctico, se pasteurizará la leche con la ayuda de un pasteurizador semi/automatizado y un generador de agua helada, donde se controlarán las variables de tiempo, temperatura de calentamiento y enfriamiento, con el fin de asegurar las mejores condiciones de proceso.

Estas evaluaciones se realizarán con la ayuda de una cuba quesera con control de la temperatura de coagulación y con sistema automatizado para el corte y agitación de la cuajada. Se evaluarán los principales parámetros de fabricación de queso fresco como la temperatura de coagulación, pH inicial de la leche, tiempo e intensidad de agitación después del corte, con el fin de estandarizar el proceso que permita obtener un producto con las mejores condiciones de calidad y rendimiento.

Una de las variables críticas en el proceso de elaboración de queso es la determinación del momento óptimo para el corte de la cuajada, el cual se evaluará en la actividad 2.1.6 descrita a continuación.

2.1.6 Evaluar el punto óptimo de corte de la cuajada. Se evaluará el efecto de la adición del cultivo sobre las características de coagulación de la leche y se determinará el tiempo de corte de la cuajada que permita optimizar el contenido final de humedad y el rendimiento quesero. Para ello se utilizará un sensor óptico de coagulación (CoAguLab, Reflectonics inc., UA), el cual a través de dispersión de luz de infrarrojo cercano permite hacer un seguimiento de la evolución de las etapas de hidrólisis, agregación y endurecimiento de la cuajada (Payne y Castillo, 2007; Castillo, 2006; Fagan et al., 2007; Mateo et al., 2009). Simultáneamente se requiere la utilización de un reómetro, equipo con el cual se mide la evolución de la dureza del gel durante el proceso de coagulación, con el fin de determinar la firmeza apropiada al momento del corte de la cuajada.

Estos ensayos proporcionarán información valiosa para el diseño y estandarización del proceso de elaboración de quesos frescos con aplicación del fermento láctico, optimizando el rendimiento y la homogeneidad del producto.

El proceso de elaboración de queso fresco a escala piloto se llevará a cabo emulando las condiciones tradicionales de fabricación de las queserías artesanales, de acuerdo con el diagrama de flujo de la Figura 1. Las condiciones específicas de cada etapa del proceso se definirán de acuerdo con la información técnica recopilada en la etapa de diagnóstico.

Etapas de proceso

Recepción en planta:

- Recepción de leche y muestreo para análisis fisicoquímicos y microbiológicos.
- Paso de leche por tamiz para eliminación de partículas macroscópicas.
- Separación de materia grasa y eliminación de partículas extrañas por centrifugación.

Almacenamiento: la leche se recibe, inspecciona y se estandariza con el propósito de regular el contenido de materia grasa. Para ello se utilizará una descremadora eléctrica con capacidad de 100 L/h.

Pasteurización: se hará con el pasteurizador de mesa automatizado, programado y controlado por software, acoplado a un sistema de enfriamiento de agua para asegurar una buena pasteurización, a 75°C.

Adición de cultivo láctico: adición del cultivo láctico bioprotector desarrollado en las pruebas experimentales.

Adición de insumos: sal, carbonato o cloruro de calcio para mejorar el proceso de coagulación, en las proporciones utilizadas comúnmente en las plantas artesanales.

Ajuste de temperatura: se ajusta la temperatura óptima para el proceso de coagulación. Esto se logrará con la utilización de un baño de agua termostatado de precisión y con la utilización de una cuba quesera automatizada.

Adición de cuajo: se disuelve en agua pasteurizada y se agrega en tina de cuajado.

Coagulación: después de la adición del cuajo se agita la leche y se deja en reposo. Aquí se evaluará las velocidades de agitación, tiempos y temperaturas, con ayuda de la cuba quesera automatizada.

Corte la cuajada: es cuidadosamente cortada en pequeños trozos, cuando ha alcanzado el grado requerido de firmeza.

Calentamiento y agitación: se realiza un calentamiento progresivo hasta obtener el punto recomendado.

Desuerado parcial: eliminación de cierta cantidad de suero establecida para el proceso.

Desuerado Total: descargue de la cuajada y eliminación de todo el suero liberado en el proceso.

Salado: adición de cloruro de sodio a la mezcla de lactosuero y cuajada.

Molienda: se hará en un molino similar al utilizado en las plantas para obtener un grano fino de cuajada.

Preprensado: eliminación de suero residual por presión.

Moldeo: la cuajada se coloca en moldes de acuerdo al tipo de presentación requerida.

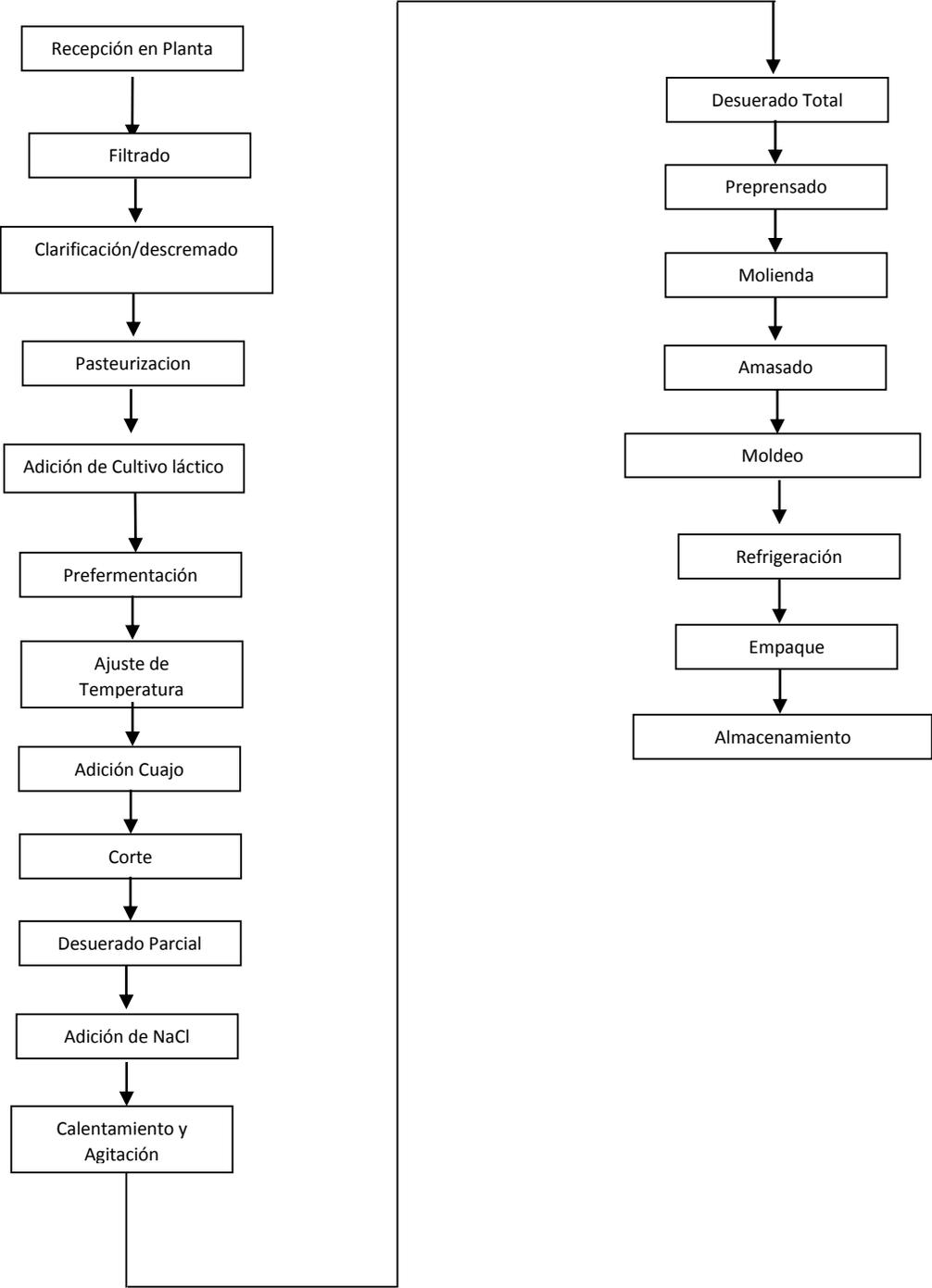
Prensado: para homogenizar el contenido de humedad de los quesos, con la ayuda de una prensa manual.

Refrigeración: se mantiene a una temperatura óptima de refrigeración hasta el momento de tajar o empacar.

Empaque: el producto se empaca en diferentes presentaciones, utilizando una empacadora al vacío.

Almacenamiento: el producto es almacenado bajo condiciones de temperatura controladas con el objeto de garantizar su vida útil hasta el momento de ser despachado y distribuido.

Figura 7: Diagrama de flujo del producto Queso Campesino



Una vez estandarizado el proceso de elaboración de queso fresco con adición del cultivo bioprotector, se procederá a evaluar el efecto de la adición de dicho cultivo sobre las características sensoriales del producto, según se describe a continuación en la actividad 2.1.7

Entregable: Queso con cultivo bioprotector caracterizado

2.1.7 Evaluar el efecto de aplicación del cultivo bioprotector sobre las características sensoriales del queso fresco. Se realizarán análisis sensoriales al queso elaborado con adición del cultivo bioprotector, para verificar si el producto sufre cambios indeseables para los consumidores. Para este análisis se utilizarán 30 consumidores, conformado por estudiantes y personal docente de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de Nariño. Se aplicará un análisis descriptivo cuantitativo, mediante una escala de 1 a 5, siendo 5 la característica más óptima del atributo (queso testigo), decreciendo los defectos hacia 1. Los atributos a evaluar serán: color, sabor, aroma y textura (Anzaldúa-Morales (1994). Se realizará un análisis de varianza para buscar diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de las pruebas.

2.1.8 Evaluar el efecto de aplicación del cultivo bioprotector sobre las características fisicoquímicas del queso fresco. Se realizarán pruebas de textura (Awad et al., 2007; Van Hekken et al., 2013), humedad (Moller et al., 2013), pH y sinéresis, para verificar los efectos que pudiera tener la adición del cultivo sobre la vida útil del queso fresco y se correlacionarán estas respuestas con los resultados de las pruebas sensoriales. Estos análisis se realizarán a distintos tiempos de almacenamiento.

Para el análisis de textura se utilizará un texturómetro presente en los laboratorios de control de calidad del programa de Ingeniería Agroindustrial. La humedad se medirá por gravimetría con ayuda de un sensor de humedad halógeno. La sinéresis se medirá a través de la pérdida de peso del queso por la liberación de suero durante el almacenamiento.

2.1.19 Evaluar el efecto de aplicar técnicas de bioprotección y BPM a escala piloto en la cadena de producción de leche y queso fresco.

El desarrollo de esta actividad se llevará a cabo en condiciones reales de producción, empleando como pilotaje una empresa de economía solidaria, entre aquellas seleccionadas en la fase inicial de proyecto que cuente con las características tanto en infraestructura, localización, acceso a vías, como también de la disposición a nivel organizativo para realizar pruebas piloto de producción en sus instalaciones.

En la planta elegida para hacer los ensayos de aplicación del cultivo bioprotector se realizará un diagnóstico inicial de las condiciones higiénico sanitarias existentes, el nivel de cumplimiento de BPM y de la calidad microbiológica de los productos elaborados. Esto permitirá identificar el efecto posterior o la diferencia al aplicar las diferentes estrategias para evaluar el mejoramiento de la inocuidad en la producción quesera.

Luego se realizarán lotes de producción piloto de 1000 a 2000 litros, registrando los parámetros de elaboración como porcentaje de grasa en materia prima, cifras de transición, características microbiológicas, parámetros fisicoquímicos como también determinación y seguimiento de vida útil del producto. Los lotes de producción piloto serán realizados empleando equipos que permita medir y controlar las variables del proceso (temperatura de coagulación, momento de corte de la cuajada, tiempo de agitación, etc.) que garanticen confiabilidad y replicabilidad en los resultados. Las muestras obtenidas serán llevadas a los laboratorios de análisis fisicoquímico y microbiológico en la Universidad de Nariño donde se llevará a cabo su caracterización y el seguimiento de vida útil.

Los lotes de queso serán evaluados con y sin aplicación del cultivo bioprotector, para poder comparar el efecto de su uso y posteriormente realizar replicación de resultados a las diferentes plantas de procesamiento beneficiarias del proyecto.

OBJETIVO 3: MEJORAR LA CALIDAD DE LA PRODUCCIÓN DE LAS QUESERÍAS ARTESANALES MEDIANTE FORMACIÓN EN BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA, BIOPROTECCIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE LOS PROCESOS DE ELABORACIÓN

PRODUCTO 1. DOCUMENTOS DE INVESTIGACION

ENTREGABLE: queseros artesanales formados en elaboración de queso bajo especificaciones de inocuidad y bioprotección.

3.1.1 Elaborar guías y manuales sobre aplicación de BPM y procesos estandarizados para elaboración de quesos frescos con inocuidad y bioprotección. Con base en la caracterización técnica y sanitaria de los procesos que se llevarán a cabo en el objetivo 1, se elaborarán guías y manuales o cartillas didácticas con lenguaje sencillo, pero abordando los requerimientos técnicos necesarios, que servirán de apoyo a los procesos de capacitación orientados a mejorar la inocuidad, la calidad y la estandarización de la producción quesera artesanal del departamento de Nariño. Entre los ejes temáticos que contendrán las cartillas están:

1. Buenas prácticas de manufactura en la producción artesanal de quesos frescos.

2. Importancia de la calidad e inocuidad como factor de competitividad en la industria quesera.
3. Estrategias para el mejoramiento de la inocuidad en la producción de quesos frescos.
4. Aplicación y uso de mecanismos de bioprotección en la producción de queso fresco campesino.

3.1.2 Realizar talleres de capacitación a productores artesanales de quesos frescos.

Esta actividad se desarrollará en dos fases. En la primera fase se realizarán 2 talleres de capacitación en las instalaciones de la Planta Piloto de Procesos Agroindustriales de la Universidad de Nariño, en cada uno de los cuales se espera capacitar a 64 productores artesanales de queso, en buenas prácticas de manufactura, procesamiento técnico para la obtención de quesos frescos y aplicación de fermentos o cultivos lácticos en quesos, también en las principales técnicas de análisis de pruebas de calidad.

En la segunda fase se desplazará personal técnico vinculado al proyecto a microempresas productoras de queso fresco a los diferentes municipios del departamento, para reforzar in situ las capacitaciones desarrolladas en la fase 1, pero esta vez bajo las condiciones propias existentes en las diferentes microempresas.

Para el desarrollo de los talleres se contará con las siguientes especificaciones

Número de personas asistentes por Taller: 64

Selección de Personas: La selección de beneficiarios para estos procesos de formación se realizará acorde al Anexo 3: Términos de referencia para la selección de beneficiarios de los procesos de formación y capacitación a desarrollarse en el marco de ejecución del proyecto denominado: “Desarrollo de un cultivo bioprotector para el mejoramiento de la inocuidad de la producción quesera artesanal del departamento de Nariño”, que se presenta en la página 134 del presente documento.

Lugar: San Juan de Pasto, instalaciones de la Universidad de Nariño sede Torobajo.

Duración por Taller: 8 horas.

Capacitadores: Profesionales e investigadores vinculados en el marco de ejecución del proyecto, como también profesionales por contratar que se vinculen en el desarrollo del proyecto, a continuación se presenta una relación de los posibles capacitadores.

NOMBRE	INSTITUCIÓN	FORMACIÓN ACADÉMICA
Oscar Arango Bedoya	Universidad de Nariño	Ing. Agroindustrial, Ph.D.
Diego Fernando Mejía España	Universidad de Nariño	Ing. Agroindustrial M.Sc.
Pablo Fernandez Izquierdo	Universidad de Nariño	Biólogo, Ph.D.
Andrés Hurtado Benavides	Universidad de Nariño	Ing. Químico, Ph.D.
Oswaldo Osorio Mora	Universidad de Nariño	Ing. Agroindustrial, Ph.D.
Jaime Gustavo Guerrero	Universidad de Nariño	Ing. Agroindustrial, M.Sc.
Profesionales contratistas por definir	Por definir	Por definir

Entregable: Resultados del proyecto socializados entre la comunidad científica.

3.1.3 Realizar procesos de divulgación de resultados del proyecto. Se programarán y realizarán durante el periodo de ejecución 2 eventos de divulgación de resultados tipo seminario, el primero se hará al tercer año de ejecución del proyecto para la entrega y socialización de resultados parciales y un segundo evento de cierre al finalizar el cuarto año de ejecución para entrega de resultados finales. Los dos eventos estarán dirigidos a estudiantes, docentes, investigadores y sector productivo del orden regional y nacional asociado a la producción láctea cuya invitación será abierta al público.

Número de personas asistentes estimado por evento: 300

Selección de personas: Se realizará participación y asistencia abierta a toda la comunidad que sea de interés el conocimiento de divulgación de los resultados, especialmente para quienes se encuentran vinculados con el sector lácteo en la región, el cupo será limitado para 300 personas.

Lugar: San Juan de Pasto (Salon en alquiler) Verificar anexo de cotizaciones para el evento disponible en carpeta de cotizaciones/ subcarpeta: Protección y divulgación:

Duración por evento: **8 horas.**

Expositores: Investigadores responsables del proceso de investigación relacionados en el rubro de talento humano como también investigadores por contratar que se vinculen en el marco de ejecución del proyecto, a continuación, se hace relación de los posibles expositores.

NOMBRE	INSTITUCIÓN	FORMACIÓN ACADÉMICA
Oscar Arango Bedoya	Universidad de Nariño	Ing. Agroindustrial, Ph.D.
Diego Fernando Mejía España	Universidad de Nariño	Ing. Agroindustrial M.Sc.
Pablo Fernandez Izquierdo	Universidad de Nariño	Biólogo, Ph.D.
Andrés Hurtado Benavides	Universidad de Nariño	Ing. Químico, Ph.D.
Oswaldo Osorio Mora	Universidad de Nariño	Ing. Agroindustrial, Ph.D.
Jaime Gustavo Guerrero	Universidad de Nariño	Ing. Agroindustrial, M.Sc.
Gloria Pérez	ADEL	Economista. M.Sc.
Investigadores contratistas por definir	Por Contratar	Por definir

Los resultados del proyecto también serán dados a conocer a la comunidad científica a través de la elaboración de al menos 6 artículos científicos, los cuales serán enviados para su publicación en revistas arbitradas tipo A tanto a nivel nacional como internacional, estos serán publicados al menos 3 a nivel nacional y 3 a nivel internacional.

Como otra estrategia de divulgación de resultados se realizarán ponencias que serán presentadas en distintos congresos relacionados con la temática del proyecto tanto a nivel nacional como internacional.

A nivel nacional entre los congresos que se participará están el Congreso Internacional en Investigación e Innovación en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Alimentos IICTA, es la continuación de una serie de eventos que desde el año 2012 ha venido realizando la Universidad Nacional de Colombia.

Como estrategia de divulgación de resultados a nivel internacional, considerando que se contará con el apoyo de institutos de investigación de España, se asistirá a algún congreso en este país, relacionado con áreas como microbiología y tecnología de los alimentos, tal como el Congreso Nacional de Microbiología de Alimentos de la SEM en Tarragona/España el cual se desarrolla anualmente.

La participación en eventos de divulgación científica y tecnológica permite intercambiar experiencias y adquirir nuevos conocimientos con investigadores y entidades que han realizado estudios en temas similares en otras regiones de Colombia u otros países, por ello el desarrollo de esta actividad fortalece las capacidades técnicas del talento humano en aras de contribuir con el desarrollo de alternativas que contribuyan con la mejora de la inocuidad de queseras artesanales en el departamento de Nariño.

11. INDICADORES PRODUCTOS ESPERADOS/ENTREGABLES

OBJETIVO 1: REALIZAR AISLAMIENTOS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y UN DIAGNÓSTICO DE LA PRODUCCIÓN ARTESANAL DE QUESOS FRESCOS EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO.

MGA WEB			OTROS ENTREGABLES	
PRODUCTO	INDICADOR	META	otros entregables asociados al objetivo	Descripción del Entregable
Infraestructura para la investigación dotada	Medido a través de : Número de infraestructura Cantidad : 2,0000	2	Diagnóstico técnico, comercial y social de la producción artesanal de quesos frescos elaborado.	Documento que contiene los resultados del diagnóstico técnico sobre las condiciones de producción en las queserías artesanales relacionado con la capacidad técnica, infraestructura, calidad composicional y microbiológica del producto, trazabilidad comercial, como también los resultados de la caracterización de la población vinculada a la producción artesanal de quesos en el departamento de Nariño.
			Banco de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) implementado	1 Cepario de bacterias ácido lácticas (BAL) nativas aisladas de muestras de queso y leche de municipios productores instalado en los laboratorios de la Universidad de Nariño.
			Banco de cepas de microorganismos patógenos implementado.	1 Cepario de microorganismos patógenos aislados de muestras de queso y leche de municipios productores instalado en los laboratorios de la Universidad de Nariño.

			Laboratorios dotados y adecuados	Se dotarán y adecuarán dos laboratorios en instalaciones de la Universidad de Nariño para la realización de las diferentes actividades científicas a realizarse en el marco del proyecto.
--	--	--	----------------------------------	---

OBJETIVO 2. IDENTIFICAR Y EVALUAR CEPAS BAL AUTÓCTONAS CON PROPIEDADES DE BIOPROSERVACIÓN PARA DESARROLLAR UN CULTIVO BIOPROTECTOR APLICABLE EN LA ELABORACIÓN DE QUESOS FRESCOS.

MGA WEB			OTROS ENTREGABLES	
PRODUCTO	INDICADOR	M E T A	otros entregables asociados al objetivo	Descripción del Resultado/Producto
Artículos científicos	Artículos publicados en revistas indexadas nacionales e internacionales <i>Medido a través de:</i> Número de artículos.	6	Cepas BAL con potencial de bioprotección en quesos frescos identificadas y caracterizadas.	1 Documento de investigación con los resultados de la identificación y caracterización mediante métodos bioquímicos y moleculares de cepas de BAL nativas con capacidad de bioprotección contra agentes patógenos en queso fresco.
			Cultivo bioprotector diseñado	1 Documento de investigación que describe la mezcla de cepas apropiada para optimizar la inhibición de microorganismos patógenos.
			Cultivo bioprotector estandarizado a escala piloto	1 Documento de investigación que describe el proceso de aplicación del cultivo bioprotector en queso

				fresco y los resultados obtenidos en pruebas pilotos en la cadena de producción.
			queso fresco con cultivo bioprotector caracterizado	1 Documento de investigación de los resultados de la evaluación de la adición del cultivo bioprotector sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y sensoriales del queso fresco.
			Artículos científicos	6 artículos científicos elaborados y enviados para publicación en revistas indexadas.

OBJETIVO 3. MEJORAR LA CALIDAD DE LA PRODUCCIÓN DE LAS QUESERÍAS ARTESANALES MEDIANTE FORMACIÓN EN BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA, BIOPROTECCIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE LOS PROCESOS DE ELABORACIÓN.

MGA WEB			OTROS ENTREGABLES	
PRODUCTO	INDICADOR	META	ENTREGABLE	Descripción del Resultado/Producto
Documentos de Investigación	Libros y/o capítulos de libros resultados de investigación <i>Medido a través de:</i> Número	1	Queseros artesanales formados en elaboración técnica de queso bajo especificaciones de inocuidad y bioprotección.	66 Queseros artesanales capacitados en buenas prácticas de manufactura, procesos estandarizados y uso de cultivos lácticos bioprotectores, lo cual permita generar producción de

			quesos frescos con una mayor calidad e inocuidad para los consumidores.
			2 eventos de divulgación en el tema del proyecto realizados.

12. IMPACTOS CIENTÍFICOS Y TECNOLÓGICOS DEL PROYECTO EN LAS ENTIDADES PARTICIPANTES

Apropiación del conocimiento científico.

Para el correcto desarrollo de pruebas experimentales biotecnológicas a realizarse en laboratorios de la Universidad de Nariño, se estandarizará inicialmente las metodologías de procesamiento en laboratorios de España con institutos reconocidos en el procesamiento de lácteos como es el IPLA (Instituto de productos lácteos de Asturias), Esto permitirá la apropiación de conocimiento investigadores del proyecto en las técnicas y metodologías usadas para la caracterización molecular e identificación de microorganismos a realizarse en la Universidad de Nariño.

Se escoge el IPLA como instituto de investigación de apoyo considerando su amplia trayectoria y experiencia en el campo en la temática central del proyecto, por otro lado cuenta con convenio interinstitucional con el departamento de Nariño a través del programa DIRENA- ADEL lo cual hace que los costos sean competitivos frente a otros institutos como se evidencia en las cotizaciones de servicios técnicos especializados.

Registro y documentación técnica del Know – How .

La ejecución de las diferentes actividades asociadas al proyecto permitirá desarrollar y estandarizar procesos aplicables al sector productivo de la cadena láctea, los cuales serán documentados y transferidos a los productores de la región. Como productos de nuevo conocimiento derivados del proyecto se espera obtener al menos:

6 artículos científicos sometidos para publicación en revistas indexadas en revistas A1, A o B.

Al menos 3 Ponencias en congresos nacionales o internacionales

1 Cartilla sobre buenas prácticas de manufactura y procesos estandarizados en la elaboración de quesos frescos, utilización de cultivos lácticos en quesos frescos.

Consolidación de capacidades para realizar actividades de I&D.

Los grupos de Investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria (TEA) y Grupo de Apoyo a la Investigación y Desarrollo Agroalimentario (GAIDA) de la Universidad de Nariño fortalecerán sus líneas de investigación especialmente aquellas relacionadas con la biotecnología aplicada, a través de formación de su recurso humano y la dotación equipos para sus laboratorios.

Con el desarrollo del proyecto se espera lograr:

- Consolidar el grupo de investigación TEA en la categoría A de Colciencias o lograr su categorización en A1.
- Consolidar el grupo de investigación TEA en la categoría A de Colciencias.

Todas las metodologías que se aplicarán en el desarrollo del proyecto podrán ser replicadas a nivel nacional con el fin de que en las otras regiones del país con alta producción de leche y derivados lácteos se pueda también aislar, identificar y caracterizar la flora microbiana típica y encontrar cepas nativas que puedan servir para el mejoramiento de los productos existentes y para el desarrollo e innovación en la industria láctea.

Para la realización de pruebas a nivel piloto se adquirirá equipos para el procesamiento de queso fresco, que se ubicarán en la Planta Piloto de Procesos Agroindustriales de la Universidad de Nariño y estarán a disposición de las empresas queseras de la región para la realización de transferencia tecnológica de los resultado del proyecto, permitiendo así consolidar las actividades de Investigación aplicada y de impacto directo al sector productivo.

Impactos sobre la productividad y competitividad cadena láctea.

El proyecto busca fortalecer la cadena láctea de Nariño y, específicamente, mejorar las condiciones de las empresas artesanales dedicadas a la elaboración de quesos frescos. Actualmente los principales problemas de estas microempresas son, en primer lugar, el corto periodo de vida útil que a nivel comercial tienen sus productos, lo cual se debe principalmente su la elevada carga microbiológica inicial, lo que a la vez representa un riesgo para los consumidores y, en segundo lugar, la variabilidad en la homogeneidad y en el rendimiento productivo debido a la carencia de métodos de procesamiento estandarizados.

El proyecto pretende contribuir, en el corto plazo, a la solución de los problemas mencionados a través de procesos de capacitación y, en el mediano o largo plazo, a soluciones más innovadoras mediante la aplicación de cultivos lácticos con

actividades de bioprotección e incluso de liberación de biopolímeros que retienen humedad y mejoran el rendimiento.

El aislamiento e identificación de cepas de BAL nativas con características tecnológicas específicas por ejemplo para la fabricación de quesos madurados podrían a futuro servir de base para el desarrollo de un queso con denominación de origen protegido en Nariño.

Impactos sobre el medio ambiente y la sociedad

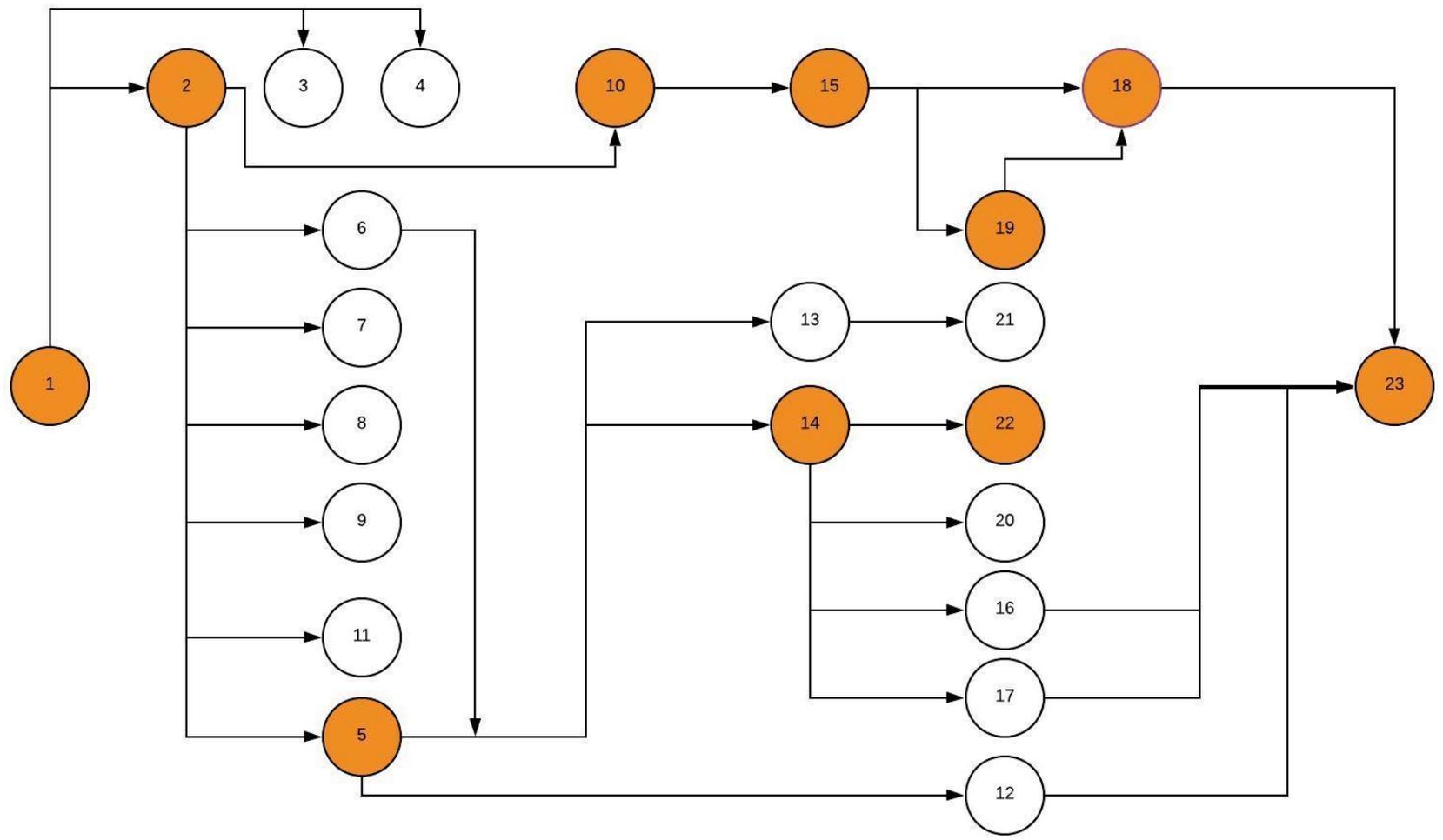
Mejorar los índices de rendimiento quesero contribuye a reducir el impacto ambiental de los lactosueros, así mismo al incrementar la vida útil de los quesos frescos, se mejora su potencial de comercialización y se reduce el volumen de producto que debe ser descartado por deterioro o vencimiento. Lo anterior no solo tiene impactos favorables sobre el ambiente, sino que contribuye mejorar los niveles de ingreso de los microempresarios dedicados a la producción de quesos frescos en la región.

13. RUTA CRÍTICA DEL PROYECTO

Código Actividad	Actividad	Actividad predecesora	Duración (Meses)
1	1. Realizar trámites de solicitud de contrato de acceso a recursos genéticos y sus derivados	_____	6
2	2. Recopilar información en empresas artesanales productoras de quesos frescos	1	6
3	3. Realizar un diagnóstico técnico y social de la producción quesera artesanal en Nariño.	1	38
4	4. Realizar adecuaciones de infraestructura y proporcionar los equipos y medios requeridos para el desarrollo del cultivo bioprotector	1	5
5	5. Recolección de muestras	1, 2	8
6	6. Realización de análisis fisicoquímicos de leche y queso.	1, 2	6
7	7. Obtener aislamientos de bacterias ácido lácticas (BAL)	1, 2	6
8	8. realizar caracterización fenotípica preliminar de BAL y seleccionar productoras de isómeros del ácido láctico L(+) o DL.	1, 2	6
9	9. Realizar mantenimiento y caracterización molecular de BAL.	1, 2	42
10	10. Realizar cuantificación aislamiento e identificación de bacterias patógenas presentes en leche y quesos artesanales en la zona de muestreo.	1, 2	17
11	11. Realizar mantenimiento de cepas patógenas.	1, 2	15
12	12. Realizar pruebas de actividad inhibitoria frente a patógenos	1	6
13	13. Identificar cepas BAL nativas mediante secuenciación parcial del gen 16S rRNA.	1	12
14	14. Realizar caracterización	1, 2, 5	12

	tecnológica de cepas BAL.		
15	15. Evaluar diferentes mezclas de cepas y su espectro de inhibición In Vitro.	1,2,10	6
16	16. Evaluar el diseño y modelo de aplicación del cultivo bioprotector sobre la matriz de queso fresco.	1,5,14	9
17	17. Evaluar el proceso de elaboración de queso fresco con el cultivo bioprotector.	1,5,14	9
18	18. Evaluar el punto óptimo de corte de la cuajada.	1,2,10,15,19	9
19	19. Evaluar el efecto de aplicación del cultivo bioprotector sobre las características sensoriales del queso fresco	1,2,10,15	8
20	20. Evaluar el efecto de aplicación del cultivo bioprotector sobre las características fisicoquímicas del queso fresco.	1,5,14	20
21	21. Evaluar el efecto de aplicar técnicas de bioprotección y BPM a escala piloto en la cadena de producción de leche y queso fresco.	1,5,6, 13	24
22	22. Elaborar guías y manuales sobre aplicación de BPM y procesos estandarizados para elaboración de quesos frescos con inocuidad y bioprotección.	2,3,4,5,6,7,9,12,13	24
23	23. Realizar talleres de capacitación a productores artesanales de quesos frescos.	1	30

RUTA CRITICA DEL PROYECTO - Diagrama de actividades



ACTIVIDAD	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
TIEMPO DE DURACION	6	6	38	5	8	6	6	6	42	17	15	6	12	12	6	9	9	9	8	20	24	24	30

OPCIONES DE RUTAS POSIBLES (Considerando tiempos de holgura con tiempos de ejecución simultáneos).

1. 1, 2, 10, 15,19,18,23 = 6 + 6 + 12 + 3 + 8 + 9 + 13= **60 meses**
2. 1, 2, 10, 15,18,23 = 6 + 6 + 12 + 3 + 9 + 24 = **60 meses**
3. 1, 3 = 6 + 38 = 44 meses
4. 1,2,6,13,21 = 6 + 6 + 6 + 12 + 24= 54 meses
5. 1,2,6,14,22 = 6 + 6 + 6 + 12 + 24= 54 meses
6. 1,2,6,14,20 = 6 + 6 + 6 + 12 + 20 = 50 meses
7. 1,2,6,14,16,23 = 6 + 6 + 6 + 12 + 9 + 30 = 59 meses
8. 1,2,7 = 6 + 6 + 6= 18 meses
9. 1,2,8 = 6 + 6 + 6= 18 meses
- 10.1,2,9 = 6 + 6 + 43 = 55 meses
- 11.1,2,11 = 6 + 6 + 15 = 27 meses
- 12.1,2,5, 12,23 = 6 + 6 + 8 + 6 + 30 = 56 meses
- 13.1,2,5,14,22 = 6 + 6 + 10 + 14 + 24 = **60 meses**

Tiempo de Ejecución método de Ruta Critica = 60 meses. (5 años)

14 PLAN OPERATIVO

PLAN OPERATIVO DEL PROYECTO (POA).								
OBJETIVOS ESPECIFICOS	PRODUCTO	ENTREGABLE	ACTIVIDAD	MEDIO DE VERIFICACION	RESPONSABLE	MESES	INICIO	Costo de la Actividad
1. Realizar aislamientos de bacterias ácido láctico y un diagnóstico de la producción artesanal de quesos frescos en el departamento de Nariño.	Infraestructura para la investigación dotada	Diagnóstico técnico y social de la producción artesanal de quesos frescos	1. Realizar trámites de solicitud de contrato de acceso a recursos genéticos y sus derivados	Permiso/licencia de acceso a recursos genéticos tramitados	UDENAR Ph.D. Oscar Arango	6	1	
			2. Recopilar información en empresas artesanales productoras de quesos frescos	Actas de visita, registros de información recolectada	FUDASCOL	6	6	80.335.518,44
			3. Realizar un diagnóstico técnico y social de la producción quesera artesanal en Nariño	Documento con diagnóstico técnico y social de la producción quesera artesanal en Nariño	FUDASCOL	38	7	79.015.518,41
		Banco de cepas de Bacterias Acido Lácticas (BAL)	4. Realizar adecuaciones de infraestructura y proporcionar los equipos y medios requeridos para el desarrollo del cultivo bioprotector	Laboratorios adecuados, equipos instalados	UDENAR Ph.D. Oscar Arango	5	7	3.166.085.216,22
			5. Recolección de muestras de leche y queso.	Registros de recolección de muestras	UDENAR Ph.D. Oscar Arango	8	16	72.825.532,41
			6. Realización de análisis fisicoquímicos del leche y queso.	Reporte de análisis de laboratorio	UDENAR M.Sc. Zully Ximena Suarez	6	18	109.665.372,56
			7. Obtener aislamientos de bacterias ácido lácticas (BAL)	Reporte de grupos de bacterias aisladas	UDENAR M.Sc. Dolly Revelo	6	18	120.117.191,51

			8. Realizar caracterización fenotípica preliminar de BAL y seleccionar productoras de isómeros del ácido láctico L(+) o DL	Reporte de isómeros de ácido láctico determinados	UDENAR M.Sc. Dolly Revelo	6	18	95.100.266,11
			9. Realizar mantenimiento y caracterización molecular de BAL	Registro de cepas aisladas y almacenadas	UDENAR M.Sc. Dolly Revelo	42	18	84.648.447,18
		3. Banco de cepas de microorganismos patógenos	10. Realizar aislamiento, identificación y cuantificación de cepas patógenas en leche y quesos artesanales en la zona de muestreo	Reporte de análisis de laboratorio	Instituto departamental de salud de Nariño - IDSN	17	16	109.294.819,35
			11. Realizar mantenimiento de cepas patógenas	Cepas criopreservadas	UDENAR M.Sc. Dolly Revelo	15	18	102.382.819,35
2. identificar y evaluar cepas bal autóctonas con propiedades de bioproservación para desarrollar un cultivo bioprotector aplicable en la elaboración de quesos frescos.	Artículos de investigación	1. Cepas de BAL con potencial de bioprotección en quesos frescos identificadas y caracterizadas	12. Realizar pruebas de actividad inhibitoria frente a patógenos	Reporte técnico de pruebas de inhibición	UDENAR M.Sc. Dolly Revelo	6	25	68.182.141,12
			13. Identificar cepas BAL nativas mediante secuenciación parcial del gen 16S rRNA.	Reportes de caracterización de cepas nativas con propiedades de bioprotección	UDENAR M.Sc. Dolly Revelo	12	25	68.182.141,06
			14. Realizar caracterización tecnológica de cepas BAL.	Reporte de análisis de laboratorio	UDENAR M.Sc. Dolly Revelo	12	25	190.805.401,06
		2. Cultivo bioprotector diseñado	15. Evaluar diferentes mezclas de cepas y su espectro de inhibición In vitro	Reportes de resultados del diseño experimental 1 de mezcla óptima.	UDENAR M.Sc. Diego Fernando Mejía España	6	37	77.049.327,14
		1. Cultivo bioprotector estandarizado a escala Piloto	16. Evaluar el diseño y modelo de aplicación del cultivo bioprotector sobre la matriz de queso fresco	Reportes de resultados del diseño experimental 2 de diseño de aplicación.	UDENAR Ph.D. Andrés Hurtado Benavides	9	40	68.182.141,06
			17. Evaluar el punto óptimo de corte de la cuajada	Reporte de la evaluación del proceso de coagulación	UDENAR Ph.D. Oscar Arango	9	40	59.314.954,98

			18. Evaluar el efecto de aplicación del cultivo bioprotector sobre las características sensoriales del queso fresco	Reporte de evaluación de cepas a escala piloto	UDENAR Ph.D. Oscar Arango	9	40	65.226.412,36
			19. Evaluar el efecto de aplicación del cultivo bioprotector sobre las características fisicoquímicas del queso fresco.	Reporte de análisis de laboratorio	UDENAR Ph.D. Oscar Arango	8	40	71.137.869,75
			20. Evaluar el efecto de aplicar técnicas de bioprotección a escala piloto en la cadena de producción de queso fresco.	Reporte de análisis de laboratorio e informe de resultados.	FUDASCOL	20	41	74.093.598,44
3. Mejorar la calidad de la producción de las queserías artesanales mediante formación en buenas prácticas de manufactura, bioprotección y estandarización de los procesos de elaboración.	Documentos de Investigación	Queseros artesanales formados en elaboración industrial de queso bajo especificaciones de inocuidad y bioprotección	21. Elaborar guías y manuales sobre aplicación de BPM y procesos estandarizados para elaboración de quesos frescos con inocuidad y bioprotección	Guías y manuales elaborados	UDENAR M.Sc. Diego Fernando Mejía España	24	37	73.470.683,67
			22. Realizar talleres de capacitación a productores artesanales de quesos frescos	Evidencias de talleres realizados	FUDASCOL	24	37	143.684.071,06
		Resultados del proyecto socializados entre la comunidad científica	23. Realizar procesos de divulgación de resultados del proyecto	Evidencias del seminario realizado	UDENAR Ph.D. Oswaldo Osorio Mora	30	31	87.820.141,06

15 PRESUPUESTO

RESUMEN									
RUBROS	CONTRAPARTIDA	CONTRAPARTIDA	CONTRAPARTIDA	CONTRAPARTIDA	CONTRAPARTIDA		FNCT%I	TOTAL	%
	UNIVERSIDAD DE NARIÑO - UDENAR	ADEL- Programa DIRENA -Desarrollo con Identidad Regional entre	INSTITUTO DEPARTAMENTAL DE SALUD DE NARIÑO - IDSN	FUNDACION PARA EL DESARROLLO AGROINDUSTRIAL Y SOCIAL DE	Especie/Efectivo	%	Efectivo		
1 Talento Humano	\$ 1.045.833.993,60	\$ 22.733.482,00	\$ 17.760.533,00	\$ 11.854.762,00	\$ 1.096.182.770,60	29%	\$ 2.754.710.688,00	\$ 3.852.893.458,60	27,6
2 Equipos	\$ 250.000.000,00				\$ 250.000.000,00	8%	\$ 3.001.230.107,12	\$ 3.251.230.107,12	30,1
3 Capacitacion						0%	\$ 96.130.520,00	\$ 96.130.520,00	1,0
4 Servicios tecnológicos					\$ -	0%	\$ 74.941.500,00	\$ 74.941.500,00	0,8
5 Materiales e insumos					\$ -	0%	\$ 1.096.736.135,60	\$ 1.096.736.135,60	11,0
6 Protección y divulgación					\$ -	0%	\$ 142.700.657,00	\$ 142.700.657,00	1,4
7 Viajes					\$ -	0%	\$ 609.717.114,00	\$ 609.717.114,00	6,1
8 Infraestructura					\$ -	0%	\$ 422.106.151,00	\$ 422.106.151,00	4,2
9 Otros					\$ -	0%	\$ 371.905.360,00	\$ 371.905.360,00	3,7
10 Costos Administrativos					\$ -	0%	\$ 871.594.690,00	\$ 871.594.690,00	8,7
11 Seguimiento y Evaluación (interventoria)					\$ -	0%	\$ 537.003.558,00	\$ 537.003.558,00	5,4
12 TOTAL	\$ 1.295.833.993,60	\$ 22.733.482,00	\$ 17.760.533,00	\$ 11.854.762,00	\$ 1.348.182.770,60		\$ 9.978.776.480,72	\$ 11.326.959.251,32	\$ 100

16 ANALISIS DE RIESGOS

	TIPO DE RIESGO	DESCRIPCION DEL RIESGO	PROBABILIDAD E IMPACTO	EFFECTOS	MEDIDAS DE MITIGACION
1-Propósito (Objetivo general)	Asociados a fenómenos de origen biológico: plagas, epidemias	No se encuentran en los aislamientos realizados microorganismos nativos con actividad inhibitoria frente a patógenos presentes en quesos frescos.	Probabilidad : 3. Moderado Impacto: 3. Moderado	Imposibilidad de generar cultivo bioprotector nativo	Aplicar cepas nativas con otras propiedades biotecnológicas que permita mejorar la producción quesera en el departamento de Nariño. Adaptar un cultivo a partir de cepas comerciales.
2-Componente (Productos)	Asociados a fenómenos de origen natural: atmosféricos, hidrológicos, geológicos, otros	Imposibilidad de acceso a municipios para toma de muestras donde exista cepas BAL nativas	Probabilidad : 4. Probable Impacto: 4. Mayor	No se toman las muestras en los tiempos programados para una zona específica de trabajo	Modificar rutas de muestreo para diferentes tiempos y planificar toma de muestras días/semanas siguientes para la zona de interés.
	De costos	Los equipos de laboratorio como materiales requeridos son de alto nivel tecnológico, los cuales no se consiguen en la industria nacional y por tanto deben ser importados con moneda de pago en dolares USD. En el	Probabilidad : 4. Probable Impacto: 4. Mayor	Incremento de la TRM ocasionaría un déficit presupuestal, haciendo que no se pueda comprar todos los equipos y materiales requeridos para el buen desarrollo y ejecución del proyecto.	En el presupuesto del proyecto en la ficha "OTROS" se considera un rubro de cobertura para compensar posibles subidas de la TRM,

		momento de elaboración del presupuesto la TRM: 3.461 (30 de septiembre Fuente https://www.dataifx.com/monedas). Las empresas importadoras argumentan que las cotizaciones presentadas están sujetas a la variación de la TRM, por tanto los precios			
Actividad Ruta crítica: Recolección de muestras de leche y queso	Asociados a fenómenos de origen natural: atmosféricos, hidrológicos, geológicos, otros	Deterioro de muestras por las grandes distancias de muestreo a los laboratorios de análisis de la Universidad de Nariño	Probabilidad : 3. Moderado Impacto: 4. Mayor	Imposibilidad de realizar aislamientos de Cepas BAL Nativas	Uso de refrigerantes apropiados para garantizar la conservación de las muestras.
Actividad Ruta crítica: Realizar pruebas de actividad inhibitoria frente a patógenos	Asociados a fenómenos de origen natural: atmosféricos, hidrológicos, geológicos, otros	Las cepas de Bacterias lácticas no demuestren propiedades antagonicas frente a cepas patógenas presentes en los quesos frescos.	Probabilidad 3. raro Impacto: 3. Moderado	El cultivo bioprotector a desarrollar no tendría efecto directo sobre la inhibición de microorganismos patógenos por ausencia de metabolitos secundarios con propiedades inhibitorios como bacteriocinas.	Empleo de BAL como microorganismos acidificantes para producción controlada de ácido láctico, como también el uso de otras propiedades biotecnológicas asociadas a la bioconservación de queso como la producción de exopolisacáridos.

Actividad Ruta crítica: Recopilar información de empresas artesanales productoras de queso fresco.	Legales	Imposibilidad de viajar a zonas lecheras por aspectos de seguridad y presencia de grupos armados ilegales	Probabilidad 3. Moderado Impacto: 4. Moderado	Imposibilidad de hacer recolección de muestras y realizar el trabajo social del proyecto.	Socializar el proyecto previamente con la comunidad donde se incluya a actores, viajar con todos los elementos de identificación para los profesionales vinculados al proyecto
Actividad ruta crítica: Realizar procesos de divulgación de resultados del proyecto	De calendario	Cruce de fechas de eventos científicos de carácter nacional e Internacional que se realicen simultáneamente.	Probabilidad 1. probable Impacto: 2 Menor.	Baja difusión de resultados generados en el marco de ejecución del proyecto.	Baja difusión de resultados generados en el marco de ejecución del proyecto.

17 INGRESOS Y BENEFICIOS

17.1 Relación de Ingresos Y Beneficios

TIPO	Descripción	Medido a través de	Bien producido	RPC	Cantidad	Valor Unitario	Valor Total
Beneficio	Mayor nivel de identificación del consumidor hacia un marca de queso fresco de origen artesanal.	Unidad	Otros	0,8	1	\$ 3.900.000.000,00	\$ 3.900.000.000,00
Beneficio	Disminución de la variabilidad en la calidad microbiológica, fisicoquímica , nutricional y organoléptica del queso fresco	Unidad	Otros	0,8	1	\$ 3.800.000.000,00	\$ 3.800.000.000,00
Beneficio	Incremento de la demanda del queso fresco debido a mayor confianza de consumo por seguridad y mejor calidad del producto	Kilogramos	Otros	0,8	1	\$ 6.500.000.000,00	\$ 6.500.000,00
Beneficio	Disminución de riesgos de contaminación por agentes patógenos en quesos frescos tradicionales	Unidad	Otros	0,8	1	\$7.500.000,00	\$7.500.000,00
Beneficio	Mayor tiempo de vida útil del queso fresco en los canales de comercialización incrementando así los tiempos y distancias donde se comercializa el producto.	Día	Otros	0,8	1	\$ 4.800.000.000,00	\$ 4.800.000.000,00

17.2 Sustentación de beneficios beneficios

No	Beneficio del proyecto	Sustentación del Beneficio
1	Mayor nivel de identificación del consumidor hacia una marca de queso fresco de origen artesanal.	Dado que las bacterias ácido lácticas BAL según sus características pueden generar propiedades tecnológicas que mejoran la calidad del producto, un cultivo láctico bioprotector previamente diseñado puede generar y resaltar dichas propiedades y traducirse en factores organolépticos diferenciadores al momento de ser consumido, si estas diferencias tecnológicas se las promueve bajo una marca los clientes van a poder identificar el producto y ganar así gusto por su consumo, en consecuencia promueve incremento de la demanda favoreciendo a las queserías artesanales del departamento de Nariño.
2	Disminución de la variabilidad en la calidad microbiológica, fisicoquímica, nutricional y organoléptica del queso fresco	Es conocido que la calidad de las diferentes variedades de queso fresco está influenciada por la tipología de bacterias ácido lácticas pueda tener naturalmente y aquellas residuales de los procesos de pasteurización, considerado la gran variedad de las misma y múltiples propiedades tecnológicas genera variabilidad en el producto terminado, haciendo que aun siendo el mismo tipo de queso producido por dos empresas diferentes pueda presentar variaciones e incluso entre los mismos lotes de producción de una misma empresa. La aplicación de un tipo de cepas BAL estandarizado garantiza homogeneidad en la producción en los diferentes lotes de proceso y por tanto repercute en una identificación fácil por parte del consumidor, ganando así preferencia al momento de la compra.
3	Incremento de la demanda del queso fresco debido a mayor confianza de consumo por seguridad y mejor calidad del producto	Cada día la población se preocupa más por su salud y bienestar demandando productos sanos e inocuos que contribuyan a su mejoramiento de calidad de vida, tradicionalmente los quesos frescos son catalogados de alto riesgo por el riesgo de contaminación y por tanto existe precaución en su consumo puesto que muchas cifras han demostrado casos de intoxicación debido a contaminación microbiológica. La aplicación de un cultivo bioprotector para los quesos frescos artesanales en el departamento de Nariño, junto con un proceso técnico de acompañamiento a queseros artesanales permite

		contribuir en el mejoramiento de la calidad del queso fresco y de esta forma dar una garantía de seguridad y confianza en el consumo de queso fresco, traduciéndose en un incremento en la demanda de este tipo de derivados.
4	Disminución de riesgos de contaminación por agentes patógenos en quesos frescos tradicionales	Uno de los efectos principales que logra un cultivo láctico bioprotector es generar un microambiente que no favorece el crecimiento de microorganismos patógenos, esto debido a diferentes factores como la alteración del pH o la producción de metabolitos secundarios por parte de algunas cepas BAL como bacteriocinas, se ha comprobado que el efecto del cultivo láctico diseñado con cepas específicas generan inhibición de microorganismos patógenos, traduciéndose así en menores riesgos para los consumidores.
5	Mayor tiempo de vida útil del queso fresco en los canales de comercialización incrementando así los tiempos y distancias donde se comercializa el producto.	<p>Cuando un queso fresco no se le hace control de su calidad microbiológica el producto se deteriora rápidamente, haciendo que el producto ni siquiera alcance a llegar a su destino en las condiciones óptimas requeridas o esperadas por el consumidor, esto se traduce en pérdidas para las empresas queseras artesanales.</p> <p>La solución propuesta de optimizar el proceso de elaboración de quesos frescos mediante el diseño y aplicación de cultivos lácticos bioprotectores promueve ventajas comerciales por incremento de mayor tiempo de vida útil, esto permite alcanzar mercados donde no se puede llegar tradicionalmente, incrementando así el potencial de mercados objetivos para las empresas queseras del departamento, con un producto más saludable y competitivo.</p>

18 EVALUACION ECONOMICA

ALTERNATIVA DE SOLUCION	INDICADORES DE RENTABILIDAD			INDICADORES DE COSTO EFICIENCIA	INDICADORES DE COSTO MINIMO	
	Valor Presente Neto (VPN)	Tasa Interna de Retorno (TIR)	Relación Beneficio Costo (BC)	Costo por beneficiario	Valor presente de los costos	Costo Anual Equivalente (CAE)
Aplicación de un cultivo láctico bioprotector para para inhibición de microorganismos patógenos, realizar procesos de formación en buenas prácticas de manufactura.	\$ 1.346.012.372,86	18,18 %	1,16	\$ 2.561.583,66	\$ 8.453.226.086,19	\$ 327.384.826,40

19 CRONOGRAMA DEL PROYECTO

Actividad del proyecto	TIEMPO EN BIMESTRES																														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
1.1.1 Realizar trámites de solicitud de contrato de acceso a recursos genéticos y sus derivados																															
1.1.2 Recopilar información en empresas artesanales productoras de quesos frescos																															
1.1.3. Realizar un diagnóstico técnico y social de la producción quesera artesanal en Nariño.																															
1.1.4 Realizar adecuaciones de infraestructura y proporcionar los equipos y medios requeridos para el desarrollo del cultivo bioprotector																															
1.1.5. Recolección de muestras de leche y queso																															
1.1.6. Realización de análisis fisicoquímicos de leche y queso.																															
1.1.7. Obtener aislamientos de bacterias ácido lácticas (BAL)																															
1.1.8. Realizar caracterización fenotípica preliminar de BAL y seleccionar productoras de isómeros del ácido láctico L(+) o DL																															
1.1.9. Realizar mantenimiento y caracterización molecular de BAL																															

20 ANALISIS DE SOSTENIBILIDAD

El Manual Metodológico General para la Identificación, Preparación, Programación y Evaluación de Programas y Proyectos de Ciencia, Tecnología e Innovación que establece los criterios y características de los programas de Ciencia, Tecnología e Innovación, define que los proyectos pueden presentarse en dos vías: Investigación básica e investigación aplicada. Consistiendo la primera en trabajos experimentales o teóricos, que se emprenden principalmente para obtener nuevos conocimientos acerca de los fundamentos de los fenómenos y hechos observables, sin pensar en darles ninguna aplicación o utilización determinada, independientemente del área del conocimiento. Mientras que la segunda consiste en trabajos originales realizados para adquirir nuevos conocimientos; sin embargo, esta última está dirigida fundamentalmente hacia un objetivo práctico específico, independientemente del área del conocimiento. La investigación aplicada se emprende para determinar los posibles usos de los resultados de la investigación básica, o para determinar nuevos métodos o formas de alcanzar objetivos específicos predeterminados encaminados a mejorar la productividad o calidad de vida de la población.

El presente proyecto es del tipo desarrollo experimental e investigación aplicada, razón por la cual no se esperaría que al finalizar su ejecución se generen impactos directos e inmediatos. Sin embargo la sostenibilidad del proyecto se sustenta en la determinación de los impactos que tiene el proyecto y su incidencia económica en los actores de la cadena y la población en general como se relaciona a continuación.

Capacidad investigativa fortalecida para el servicio de la cadena láctea

Entre los impactos más inmediatos que se obtendrían con el proyecto se encuentra el fortalecimiento de capacidades investigativas en áreas del conocimiento relacionadas con el sector lácteo. En primer lugar el equipo de investigadores que estarán vinculados al proyecto habrán logrado adquirir un gran bagaje de conocimientos, experiencias y competencias en áreas como por ejemplo la biotecnología aplicada al sector lácteo, el análisis, caracterización y desarrollo de productos lácteos, evaluación y mejora de la calidad de los procesos productivos, etc. En segundo lugar el poder contar con una infraestructura de laboratorios de microbiología y análisis fisicoquímico de alimentos diseñados según requerimientos técnicos y dotados con equipos y medios de última tecnología, sumado a la disponibilidad de un banco de cepas de bacterias ácido lácticas que han sido identificadas y caracterizadas en su potencial y aptitudes tecnológicas, permitirán dar continuidad a procesos investigativos, a través de la formulación y consecución de recursos para nuevos proyectos, orientados a lograr impactos más directos para sector lácteo nariñense.

Específicamente los proyectos que darían continuidad al presente son:

- Realizar investigación para el escalamiento a nivel industrial y la producción comercial del fermento láctico desarrollado.
- Estudiar la utilización de bacterias ácido lácticas autóctonas identificadas en este proyecto para el desarrollo de productos innovadores o posiblemente un producto que pudiese llegar a tener una denominación de origen protegido.
- Fortalecer la asociatividad de los microempresarios del sector lácteo en Nariño y su gestión empresarial para comercializar, en nichos de mercado específicamente identificados, sus productos bajo una marca única.

Mejoramiento de la productividad y la calidad:

Otro de los impactos inmediatos que tendría el proyecto en el sector productivo se deriva del diagnóstico técnico y social que se hará en las empresas artesanales productoras de quesos frescos. Con la información recopilada se diseñarán e implementarán procesos de capacitación orientados a mejorar la calidad higiénica de los productos, su homogeneidad y los rendimientos de producción. Con lo anterior se espera incrementar la vida útil de los productos, lo que representa contar con mayor tiempo para la distribución en el mercado y disminución de rechazos por mala calidad o deterioro. En consecuencia, se mejorarían los ingresos para los microempresarios y disminuyen los riesgos asociados a contaminación microbiana para los consumidores

Posibilidad de acceso a nuevos mercados nacionales o internacionales mediante el mejoramiento y desarrollo tecnológico de nuevos productos:

Durante la fase de aislamiento, identificación y caracterización de las actividades tecnológicas de las cepas BAL, es posible encontrar cepas autóctonas, que tengan características que las hagan viables para su aplicación en procesos fermentativos y de maduración del queso, con lo cual sería posible desarrollar quesos madurados que resulten candidatos para un proceso de obtención de una denominación de origen (DO), obteniéndose un producto diferencial en el mercado para ser comercializado por las empresas queseras del departamento.

Posibilidad de creación de empresas asociadas de base biotecnológica:

Considerando el logro de resultados positivos en el proyecto, se requerirá la producción industrial de los cultivos lácticos desarrollados para que sean utilizados en la producción quesera, generando así la posibilidad y necesidad de crear una empresa que los comience a producir masivamente a partir de los procesos y documentación técnica (know – how) desarrollados durante la ejecución del proyecto.

Esta ruta de éxito y de creación de empresas de base tecnológica resultado de procesos de investigación ya se ha dado en España, específicamente en esta línea de trabajo. Donde cultivos lácticos fueron diseñados para estandarizar la producción de quesos autóctonos con denominación de origen, hoy en día dichos quesos se comercializan industrialmente con cepas específicas que le confieren las características únicas y propias. Las asociaciones de productores crearon la empresa que produce y les provee los cultivos lácticos.

Reducción de riesgos para la salud humana:

El proyecto en uno de sus componentes busca mejorar la calidad microbiológica de la producción de queso fresco campesino, producto característico y tradicional del departamento de Nariño. Con el desarrollo del proyecto se pretende identificar y caracterizar cepas de BAL nativas de cuencas lecheras del departamento de Nariño, que tengan las características de producir metabolitos capaces de inhibir microorganismos patógenos, lo que repercutiría en una mayor inocuidad del producto y menores riesgos para la salud de los consumidores.

En términos económicos se traduce en ahorros por tratamiento de enfermedades asociadas a ETAs “Enfermedades transmitidas por alimentos”.

En términos de mercado incide como un factor diferencial que puede influir en la decisión de compra del consumidor y en consecuencia en un mayor margen de venta para las empresas transformadoras.

Desarrollo de nuevos productos y aplicaciones industriales usando bacterias ácido lácticas.

En el marco de desarrollo del proyecto se conformara un banco de cepas de Bacterias ácido –lácticas autóctonas de las diferentes regiones del departamento de Nariño, dada la diversidad de microclimas y ecosistemas con los que cuenta el departamento se espera contar con una alta diversidad de microorganismos con potencialidad de diferentes usos biotecnológicos, no solo en la industria quesera sino también en otros sectores de la industria de alimentos, tal sería el caso de descubrir nuevas cepas bacterianas que puedan usarse como probióticos.

Lo anterior abre un camino hacia la mejora de procesos existentes y el desarrollo de nuevos productos y procesos en la industria alimentaria en aras de mejorar la productividad del departamento de Nariño.

Sostenibilidad de adecuaciones y dotación de laboratorios

Las adecuaciones realizadas y la dotación de los laboratorios de microbiología y de análisis fisicoquímica serán empleados por los grupos de investigación relacionados anteriormente como laboratorios de investigación para la continuidad en próxima investigación en procesos biotecnológicos y demás líneas estratégicas que permitan lograr un mejoramiento de la cadena láctea, la cual es una de las principales cadenas productivas en el departamento de Nariño.

Por otro al implementarse pruebas técnicas de evaluación y control de calidad en leche y productos derivados se prestará un servicio a empresas y organizaciones que requieran de análisis técnicos de sus productos lo cual puede ser ofertado como un servicio a la comunidad por parte de la Universidad de Nariño como ejecutora del proyecto, este servicio tendrá un costo que posteriormente pueda ser estandarizado según las características técnicas de los equipos y los consumibles de los mismos, de tal forma que se garantice su permanencia en el tiempo y puedan tener un fin social y al servicio del sector productivo e investigativo de la región.

Se garantiza en el marco de ejecución del proyecto la publicación de 6 artículos científicos sometidos a evaluación para ser publicados en revistas indexadas en revistas A1, A o B.

21 BIBLIOGRAFIA

- Abdalla, O.M., G.L. Christen, and P.M. Davidson. 1993. Chemical composition of and *Listeria monocytogenes* survival in White pickled cheese. *J. Food Prot.* 56(10): 841–846.
- Abushelaibi, A., S. AlMahdin, K. El-Tarabily, N.P. Shah, and M. Ayyash. 2017. Characterization of Potential Probiotic Lactic acid Bacteria Isolated from Camel Milk. *LWT - Food Science and Technology*. DOI 10.1016/j.lwt.2017.01.041.
- Acuña, L., R.D. Morero, and A. Bellomio. 2010. Development of Wide-Spectrum Hybrid Bacteriocins for Food Biopreservation. *Food Bioprocess Technol.* 4(6): 1029–1049.
- ADEL - Nariño. 2014. Cadena Láctea de Nariño. San Juan de Pasto.
- Agrocadenas. 2005. La cadena de lácteos en Colombia: una mirada global de su estructura y dinámica. Bogotá D.C.
- Alegría, Á., P. Álvarez-Martín, N. Sacristán, E. Fernández, S. Delgado, and B. Mayo. 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *Int. J. Food Microbiol.* 136(1): 44–51.
- Alegría, A., S. Delgado, C. Rocas, B. López, and B. Mayo. 2010. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* 143(1-2): 61–6.
- Alquicira, L. (2006). 2006. Determinación del mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133.
- Alvarado, C., Z. Chacón, J. Otoniel, B. Guerrero, and G. López. 2007. De Bacterias Ácido Lácticas De Un Queso. *Rev. Científica Univ. del Zulia XVII*: 301–308.
- Anzaldúa-Morales, A. 1994. La Evaluación Sensorial de Los Alimentos en la Teoría y la Práctica. Acribia.
- Arqués, J.L., E. Rodríguez, P. Gaya, M. Medina, and M. Nuñez. 2005. Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. *Int. Dairy J.* 15(6-9): 893–900. r

- Aslim, B., Z. Yuksekdağ, E. Sarıkayab, and Y. Beyatlı. 2005. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. *Food Sci Technol* 38: 691–694.
- Awad, S., N. Ahmed, and M. El Soda. 2007. Evaluation of isolated starter lactic acid bacteria in Ras cheese ripening and flavour development. *Food Chem.* 104: 1192–1199.
- Barboza, J.E., H. Vázquez, R. Salcedo, and M. Bautista. 2004. Probióticos y conservadores naturales en alimentos. 14(3): 32–38.
- Betancourt Botero, S.P., D.C. Vanegas Gamboa, G.A. Bolívar Escobar, and C. Ramírez Toro. 2013. Detección de isómeros del ácido láctico: metabolitos de bacterias ácido lácticas aisladas de masas ácidas fermentadas colombianas. *Rev. Argent. Microbiol.* 45(03): 205–206.
- Bou, G., F. Olmos, C. García, J. Sáez-Nieto, and S. Valdezate. 2011. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. 29th–08 ed.
- Brooks, J.C., B. Martinez, J. Stratton, a. Bianchini, R. Krokstrom, and R. Hutkins. 2012. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. *Food Microbiol.* 31(2): 154–158.
- De Buyser, M.-L., B. Dufour, M. Maire, and V. Lafarge. 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.* 67(1): 1–1v7.
- Domingos-Lopes, M.F.P., Stanton, C., Ross, P.R., Dapkevicius, M.L.E., Silva, C.C.G. 2017. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiol.* 63: 178-190.
- Carr, F.J., D. Chill, and N. Maida. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28(4): 281–370.
- Castro, G., E. Valbuena, W. Bríñez, E. Sánchez, and H. Vera. 2009. Comparación Del Empleo De Nisinga Y Cultivos. *Rev. Cient. FCV-LUZ XIX*: 201–209.
- Cheong, E.Y.L., A. Sandhu, J. Jayabalan, T.T. Kieu Le, N.T. Nhiep, H.T. My Ho, J. Zwieler, N. Bansal, and M.S. Turner. 2014. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control* 46: 91–97.

- Cho, G.S., and H.K. Do. 2006. Isolation and identification of lactic acid bacteria isolated from a traditional Jeotgal product in Korea. *Ocean Sci. J.* 41(2): 113–119.
- Claeys, W.L., S. Cardoen, G. Daube, J. De Block, K. Dewettinck, K. Dierick, L. De Zutter, A. Huyghebaert, H. Imberechts, P. Thiange, Y. Vandenplas, and L. Herman. 2013. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control* 31(1): 251–262.
- Cleveland, J., T.J. Montville, I.F. Nes, and M.L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71(1): 1–20.
- DANE. 2016. Encuesta Nacional Agropecuaria - ENA 2016. Bogotá, D.C.
- Deegan, L.H., P.D. Cotter, C. Hill, and P. Ross. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int. Dairy J.* 16(9): 1058–1071.
- Delgado-Guerrero, R. 2012. Plan de Desarrollo Departamental “Nariño Mejor” 2012-2015. : 296.
- Díaz-Pinillos, M.A., M. Chávez-Castillo, and E.A. Saucedo-Amaya. 2012. *Listeria monocytogenes* en leche y queso fresco como vehículo transmisor de listeriosis humana en la Provincia de Trujillo , Perú. *Rev. Cienc. y Tecnol. Esc. Postgrado UNT*: 23–38.
- Díez, L. 2011. Efectos de agentes enológicos y pediocina PA-1 sobre las bacterias lácticas del vino.
- DNP. 2010. Consolidación De La Política Sanitaria y De Inocuidad Para Las Cadenas Láctea y Cárnica Conpes 3676. Bogotá D.C.
- Donnelly, C.W. 2004. Growth and Survival of Microbial Pathogens in Cheese. *Cheese Chem. Phys. Microbiol.* 1: 541–559.
- European Food Safety Authority. 2010. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA J.* 8(1496): 410.
- Fagan, C.C., M. Castillo, F. a. Payne, C.P. O'Donnell, M. Leedy, and D.J. O'Callaghan. 2007. Novel online sensor technology for continuous monitoring of milk coagulation and whey separation in cheesemaking. *J. Agric. Food Chem.* 55(22): 8836–8844.

- FAO. 2011. Producción lechera. Prod. y Prod. Lácteos Available at <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/es/#.VX-Qes-5akp> (verified 9 January 2011).
- Favaro, L., L. Ana, D. Vic, and D. Vic. 2015. Bacteriocinogenic LAB from cheeses Application in biopreservation? 41.
- FDA, F. and D.A., C. Leonard, and J. Sheehan. 2005. Presentation: On the safety of rawmilk (with a word about pasteurization).
- FEDEGAN. 2015. Federación Colombiana de Ganaderos FEDEGAN. Fondo Estabilización de Precios.
- FEDEGAN. 2016. Censo programa de vacunación contra fiebre aftosa 2016 San Juan de Pasto.
- Fenelon, M.A., M.P. Ryan, M.C. Rea, T.P. Guinee, R.P. Ross, C. Hill, and D. Harrington. 1999. Elevated temperature ripening of reduced fat Cheddar made with or without lactacin 3147-producing starter culture. *J. Dairy Sci.* 82(1): 10–22.
- Feutry, F., M. Oneca, F. Berthier, and P. Torre. 2012. Biodiversity and growth dynamics of lactic acid bacteria in artisanal PDO Ossau-Iraty cheeses made from raw ewe's milk with different starters. *Food Microbiol.* 29(1): 33–42.
- Fung, D.Y. 1997. Overview of Rapid Methods of Microbiological Analysis. En: *Food Microbiological Analysis New Technologies*. Marcel Dekker, New York.
- Gala, E., S. Landi, L. Solieri, M. Nocetti, A. Pulvirenti, and P. Giudici. 2008. Diversity of lactic acid bacteria population in ripened Parmigiano Reggiano cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 125(3): 347–51.
- Gálvez, A., H. Abriouel, R.L. López, and N. Ben Omar. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* 120(1-2): 51–70.
- Garabal, J.I., P. Rodríguez-Alonso, and J.A. Centeno. 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from raw cows' milk cheeses currently produced in Galicia (NW Spain). *LWT - Food Sci. Technol.* 41(8): 1452–1458.
- García, M., S. Revah, and L. Gómez. 1998. Productos lácteos en Biotecnología Alimentaria (L Noriega, Ed.).
- Garde, S., M. Ávila, M. Medina, and M. Nuñez. 2005. Influence of a bacteriocin-producing lactic culture on the volatile compounds, odour and aroma of Hispánico cheese. *Int. Dairy J.* 15(10): 1034–1043.

- Giraffa, G., Rossetti, L., 2004. Monitoring of the bacterial composition of dairy starter cultures by RAPD-PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 237, 133-138.
- Gobernación de Nariño. 2019. Plan Departamental de extensión agropecuaria. San Juan de Pasto.
- Griffiths, M. 2010. Improving the safety and quality of milk: milk production and processing. Elsevier.
- Hassanien, M.F.R., S. a. Mahgoub, and K.M. El-Zahar. 2014. Soft cheese supplemented with black cumin oil: Impact on food borne pathogens and quality during storage. *Saudi J. Biol. Sci.* 21(3): 280–288.
- Herbin, S., F. Mathieu, F. Brulé, C. Branlant, G. Lefebvre, and A. Lebrihi. 1997. Characteristics and genetic determinants of bacteriocin activities produced by *Carnobacterium piscicola* CP5 isolated from cheese. *Curr. Microbiol.* 35(6): 319–326.
- Herreros, M. a., R. Arenas, M.H. Sandoval, J.M. Castro, J.M. Fresno, and M.E. Tornadijo. 2007. Effect of addition of native cultures on characteristics of Armada cheese manufactured with pasteurized milk: A preliminary study. *Int. Dairy J.* 17(4): 328–335.
- Herreros, M. a., H. Sandoval, L. González, J.M. Castro, J.M. Fresno, and M.E. Tornadijo. 2005. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiol.* 22(5): 455–459.
- Holo, H., Z. Jeknic, M. Daeschel, S. Stevanovic, and I.F. Nes. 2001. Plantaricin from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology* (147): 643–651.
- Van Hoorde, K., T. Verstraete, P. Vandamme, and G. Huys. 2008. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. *Food Microbiol.* 25(7): 929–35.
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). 2000. productos lácteos Queso. Tercera actualización.
- Instituto Departamental De Salud De Nariño- IDSN. 2014. Perfil Sanitario Leche Cruda – Prueba Piloto. San Juan de Pasto.
- Instituto Departamental De Salud De Nariño - IDSN. 2015. Informes de Inspección, Vigilancia y Control "Grupo de alimentos leche y sus derivados"

- Instituto Departamental De Salud De Nariño - IDSN. 2017. Informes de Inspección, Vigilancia y Control "Grupo de alimentos leche y sus derivados"
- INS, and Minsalud. 2014. Protocolo de vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Bogotá, D.C.
- Irkin, R. 2010. Determination of microbial contamination sources for use in quality management of cheese industry: "Dil" cheese as an example. *J. fur Verbraucherschutz und Leb.* 5: 91–96.
- Jay, J.M. 2000. *Modern food microbiology*. 6th ed. Aspen publication, Maryland, USA.
- Jehanno, D., D. Thuault, and C.M. Bourgeois. 1992. Development of a method for detection of lactic acid bacteria producing exclusively the L-(+)-isomer of lactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(12): 4064–4067.
- Joerger, R. 2003. Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages. *Poult. Sci.*: 640 – 647.
- Jokovic, N., M. Nikolic, J. Begovic, B. Jovcic, D. Savic, and L. Topisirovic. 2008. A survey of the lactic acid bacteria isolated from Serbian artisanal dairy product kajmak. *Int. J. Food Microbiol.* 127(3): 305–11.
- Jørgensen, H.J., T. Mørk, and L.M. Rørvik. 2005. The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *J. Dairy Sci.* 88(11): 3810–3817.
- Kargozari, M., S. Moini, A. Akhondzadeh Basti, Z. Emam-Djomeh, H. Gandomi, I. Revilla Martin, M. Ghasemlou, and A.A. Carbonell-Barrachina. 2014. Effect of autochthonous starter cultures isolated from Siahmazgi cheese on physicochemical, microbiological and volatile compound profiles and sensorial attributes of sucuk, a Turkish dry-fermented sausage. *Meat Sci.* 97(1): 104–14.
- Larson, A.E., E.A. Johnson, and J.H. Nelson. 1999. Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial cheese brines. *J. Dairy Sci.* 82(9): 1860–1868.
- Macedo, A.C., T.G. Tavares, and F.X. Malcata. 2004. Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. *Food Microbiol.* 21(2): 233–240.
- Madziva, H., K. Kailasapathy, and M. Phillips. 2006. Evaluation of alginate-pectin capsules in Cheddar cheese as a food carrier for the delivery of folic acid. *LWT - Food Sci. Technol.* 39(January 1998): 146–151.

- Mahaut, M., R. Jeantet, and G. Brulé. 2003. Introducción a la tecnología quesera.
- Marcos, E., S.T. Castillo, F. A. Dimitrov, B.D. Gombossy, and R.P. De Souza. 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* 32,: 134 – 142.
- Margolles, A., A. Rodríguez, and C.G. de los Reyes-Gavilán. 1997. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening, and cold storage of Afuega'l Pitu cheese. *J. Food Prot.* 60(6): 689–693.
- Mateo, M.J., D.J. O'Callaghan, C.D. Everard, C.C. Fagan, M. Castillo, F.A. Payne, and C.P. O'Donnell. 2009. Influence of curd cutting programme and stirring speed on the prediction of syneresis indices in cheese-making using NIR light backscatter. *LWT-Food Sci. Technol.* 42(5): 950–955.
- Megahed, S.A., and N.A. Moneib. 1990. The establishment and maintenance of a small culture collection in Egypt with a computerized database. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 6(2): 109–113.
- Mendia, C., F.J. Ibañez, P. Torre, and Y. Barcina. 2000. Effect of pasteurization and use of a native starter culture on proteolysis in a ewes' milk cheese. *Food Control* 11: 195–200.
- Minagricultura. 2016. Informe de Resultados Producción de Leche Tercer trimestre de 2016. Bogotá D.C.
- Ministerio de Salud y Protección Social, C., U. de E. de R. para la I. de los A. UERIA, and I.N. de S. INS. 2011. Identificación de riesgos biológicos asociados al consumo de leche cruda bovina en Colombia. Imprenta Nacional de Colombia, Bogotá, D.C.
- Minprotección, FAO, and OSAN. 2013. Documento técnico de la situación en Seguridad Alimentaria y Nutricional – SAN. Bogotá, D.C.
- Miteva, V., T. Stefanova, I. Budakov, I. Ivanova, V. Mitev, A. Gancheva, and M. Ljubenov. 1998. Characterization of bacteriocins produced by strains from traditional Bulgarian dairy products. *Syst. Appl. Microbiol.* 21(1): 151–161.
- Moller, K.K., F.P. Rattray, W.L.P. Bredie, E. Hoier, and Y. Ardo. 2013. Physicochemical and sensory characterization of Cheddar cheese with variable NaCl levels and equal moisture content. *J. Dairy Sci.* 96(4): 1953–71.
- Montel, M.-C., S. Buchin, A. Mallet, C. Delbes-Paus, D. a Vuitton, N. Desmasures, and F. Berthier. 2014. Traditional cheeses: rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int. J. Food Microbiol.* 177: 136–54.

- Moraes, P.M., L.M. Perin, M.B. Tassinari Ortolani, A.K. Yamazi, G.N. Viçosa, and L.A. Nero. 2010. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *LWT - Food Sci. Technol.* 43(9): 1320–1324.
- Moreno Vásquez, F.C., G. Rodríguez Martínez, V.M. Méndez Mancera, L.E. Osuna Ávila, and M.R. Vargas. 2012. Análisis microbiológico y su relación con la calidad higiénica y sanitaria de la leche producida en la región del Alto de Chicamocha (departamento de Boyacá). *Rev. Med. Vet. (Bogota)*. 14: 61–83.
- Neira Bermúdez, E., and J.A. de Silvestri Saade. 2016. Analisis del proceso de ordeño y de la calidad higienica de la leche utilizada en la fabricacion de queso Paipa. *Rev. Lasallista Investig.* 6(2): 163–170.
- Nikolic, M., A. Terzic-Vidojevic, B. Jovcic, J. Begovic, N. Golic, and L. Topisirovic. 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 122(1-2): 162–70.
- Oliver, S.P., K.J. Boor, S.C. Murphy, and S.E. Murinda. 2009. Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathog. Dis.* 6(7): 793–806.
- Olivera, J. 2011. Caracterización tecnológica de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de la leche.
- Ordiales, E., M.J. Benito, A. Martín, R. Casquete, M.J. Serradilla, and M. de Guía Córdoba. 2013. Bacterial communities of the traditional raw ewe's milk cheese "Torta del Casar" made without the addition of a starter. *Food Control* 33(2): 448–454.
- Ortigosa, M., P. Torre, and J.M. Izco. 2001. Effect of pasteurization of Ewe's milk and use of a native starter culture on the volatile components and sensory characteristics of roncal cheese. *J. Dairy Sci.* 84(6): 1320–30.
- Ouwehand, A.. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: *Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects*. Inc, Marcel Dekker, New York, USA.
- Patel, A., N. Shah, P. Ambalam, J.B. Prajapati, O. Holst, and A. Ljungh. 2013. Antimicrobial profile of lactic acid bacteria isolated from vegetables and indigenous fermented foods of India against clinical pathogens using microdilution method. *Biomed. Environ. Sci.* 26(9): 759–64.
- Pescuma, M., E.M. Hébert, F. Mozzi, and G. Font de Valdez. 2010. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 141(1-2): 73–81.

- Ramos-Izquierdo, B., A. Bucio-Galindo, C. Bautista-Muñoz, E. Aranda-Ibañez, and F. Izquierdo-Reyes. 2009. Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas para la elaboración de queso crema tropical. *Univ. y Cienc.* 25(2): 159–171.
- Reis, J. a., a. T. Paula, S.N. Casarotti, and a. L.B. Penna. 2012. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Eng. Rev.* 4: 124–140.
- Reu, K. de, K. Grijspeerdt, and L. Herman. 2004. A Belgian survey of hygiene indicator bacteria and pathogenic bacteria in raw milk and direct marketing of raw milk farm products. *J. food Saf.* 24(1): 17–36.
- Revelo Romo, D., M.I. Gomez Perdomo, M. Concha Obando, D. Bravo, and P. Fernandez Izquierdo. 2013. Characterization of hydrocarbonoclastic marine bacteria using the 16S rRNA gene: a microcosm case study. *Dyna* 80(180): 122–129.
- Rilla, N., B. Martínez, and A. Rodríguez. 2004. Inhibition of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in Afuega'l Pitu cheese by the nisin Z-producing strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IPLA 729. *J. Food Prot.* 67(5): 928–933.
- Rivas, F.P., M.P. Castro, M. Vallejo, E. Marguet, and C. a. Campos. 2012. Antibacterial potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from ewes' milk and cheese. *LWT - Food Sci. Technol.* 46(2): 428–436.
- Roberts, A., M.. Pierson, J.. Marcy, C.. Alvarado, and S.. Summer. 2002. The effect of sorbic acid on the survival of *E. coli* O157:H7; *Salmonella*; *L. monocytogenes* and *S. aureus* on shredded cheddar and mozzarella cheese.
- Rodríguez González, A., R. Cárcoba Ruiz, and E.P. Cuesta Alonso. 2001. Produccion por cultivo continuo de un fermento lactico mixto de adición directa para elaboración de queso. : 9.
- Rodríguez R., V., A. Calderón R., and O. Vergara G. 2014. Calidad de leches crudas en tres empresas acopiadoras en Córdoba. *Rev. Colomb. Cienc. Anim.* 6(1): 103–115.
- Rodríguez, M.E., Z.C. Rueda, B.G. Cárdenas, J.O. Rojas, and G. López Corcuera. 2007. Selección y elaboración de un cultivo iniciador a partir de cepas de *Enterococcus* aisladas de un queso Venezolano ahumado andino. *Rev. Cient. la Fac. Ciencias Vet. la Univ. del Zulia* 17: 641–646.
- Rosero, R.R., D.. Mejia, and O. Osorio. 2014. Sistema de monitoreo y control estadístico para el rendimiento en la industria quesera. *Rev. La Fac. Agron.* (67): 308–310.

- Royo, M.A. 2017. Nutrición en la salud pública. Escuela Nacional de Sanidad. Ministerio de Economía, Industria y competitividad. España.
- Ruiz, C.T., S. Orozco, L.S. Rodríguez, L. Idárraga, and M. Olivera. 2012. Factores que afectan el recuento de UFC en la leche en tanque en hatos lecheros del norte de Antioquia-Colombia. *Rev U.D.C.A Act. Div Cient* 15(1): 147–155.
- Sánchez, I., Seseña, S., Palop, LI., 2004. Polyphasic study of the genetic diversity of lactobacilli associated with “Almagro” eggplants spontaneous fermentation, based on combined numerical analysis of Randomly Amplified Polymorphic DNA and Pulsed- Field Gel Electrophoresis patterns. *J. Appl. Microbiol.* 97, 446-458.
- Sociedad De Agricultores Y Ganaderos de Nariño -SAGAN. 2019. Encuesta de producción de leche en el Departamento de Nariño. 2019.
- Scott, R., R.K. Robinson, and R.. Wilbey. 2002. Fabricación de queso. Acribia, Zaragoza, España.
- Seseña, S., Sánchez, I., Palop, M.LL., 2005. Characterization of *Lactobacillus strains* and monitoring by RAPD-PCR in controlled fermentations of “Almagro” eggplants. *Int. J. Food Microbiol.* 104, 325-335.
- Shirai, K., I. Guerrero, and P. Lara. 1996. Bacterias lácticas en alimentos fermentados (Ciencia, Ed.). 3rd ed.
- Signorini, L.M., G.J. Sequeira, J.C. Bonazza, R. Dalla Santina, L.E. Martí, and L.S. Frizzo. 2008. Utilización de microorganismos marcadores para la evaluación de las condiciones higiénico-sanitarias en la producción primaria de leche. *Rev. Cient.* 18(2): 207–217.
- Sistema nacional de Salud y Ministerio de protección social. 2011. Evaluación de Riesgos de *Listeria monocytogenes* en queso fresco en Colombia. Imprenta Nacional de Colombia, Bogotá D.C.
- Suárez, R.V. 2007. Caracterización molecular de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño.
- Valdés-Stauber, N., and S. Scherer. 1994. Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterium linens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(10): 3809–3814.
- Van Hekken, D.L., M.H. Tunick, N.Y. Farkye, and P.M. Tomasula. 2013. Effect of hydrostatic high-pressure processing on the chemical, functional, and

rheological properties of starter-free Queso Fresco. *J. Dairy Sci.* 96(10): 6147–60.

Vázquez, S.M., H. Suárez, and S. Zapata. 2009. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Rev. Chil. Nutr.* 36(1): 64–69.

Veyrat, A., Miralles, M.C., Pérez-Martínez, G., 1999. A fast method for monitoring the colonization rate of lactobacilli in a meat model system. *J. Appl. Microbiol.* 87, 49-61.

Yang, E., L. Fan, Y. Jiang, C. Doucette, and S. Fillmore. 2012. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express* 2: 48.

Yousef, A.E., and E.H. Marth. 1988. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of Colby cheese. *J. Food Prot.* 51(1): 12–15.

Zegler, J. (2018). Tendencias mundiales en alimentos y bebidas para 2018. MINTEL.

22 ANEXOS

ANEXO 1: JUSTIFICACION DE LOS REQUERIMIENTOS DE ADECUACION DE INFRAESTRUCTURA Y DOTACION DE EQUIPOS PARA LA IMPLEMENTACION DE LOS LABORATORIOS DE ANÁLISIS FISICOQUIMICO Y MICRIBIOLÓGICO DE ALIMENTOS.

De acuerdo con la metodología del proyecto, se requieren dos tipos de laboratorios, uno de microbiología, en el cual se realizarán las actividades correspondiente al aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas (BAL) a partir de las muestras de leche y queso colectadas en las microempresas queseras ubicadas en diferentes municipios de las cencas lecheras de Nariño, las pruebas de actividad antagónica de las BAL frente a los patógenos predominantes en el queso fresco artesanal, se conformará y mantendrá el cepario de BAL y se hará el diseño del cultivo bioprotector. El en otro laboratorio se realizarán los análisis fisicoquímicos de las muestras de leche y del queso, tanto en la fase inicial de diagnóstico, como en la etapa de desarrollo del cultivo, en la cual se requiere evaluar el efecto de la aplicación del cultivo bioprotector sobre la cinética de coagulación de la leche y sobre las características fisicoquímicas y sensoriales del queso fresco.

Los laboratorios deben poseer un diseño adecuado, con separación por secciones o áreas que eviten la contaminación cruzada, estar construidos con materiales inertes y de fácil limpieza y desinfección, sistemas de ventilación con filtros de aire que cumplan con requerimientos técnicos específicos acordes al tipo de ensayos a realizar, entre otras muchas exigencias. Actualmente en la Universidad de Nariño no se cuenta con laboratorios de análisis microbiológico y fisicoquímico de alimentos que cumplan con los estándares de calidad requeridos, que permitan garantizar que los ensayos se realicen en condiciones óptimas y que los resultados obtenidos sean confiables. Por las anteriores razones y para garantizar un adecuado desarrollo del proyecto, se ha incluido la adecuación de los laboratorios mencionados, con un diseño que cumpla con los estándares requeridos actualmente para este tipo de instalaciones.

Por otro lado, para el desarrollo de las diferentes pruebas microbiológicas y fisicoquímicas se requiere contar con equipos especializados. En la región no se cuenta con laboratorios que tengan la capacidad, las metodologías estandarizadas y los equipos necesarios para llevar a cabo las actividades planteadas en el proyecto de investigación, razón por la cual considerar el pago de servicios tecnológicos en otra zona del país resultaría inviable tanto técnica como financieramente.

Es de anotar que las adecuaciones de infraestructura mencionadas se llevarán a cabo en edificios que hacen parte de las instalaciones de la Universidad de Nariño, sede Torobajo, cuya dirección es Calle 18 con Carrera 50, predio con matrícula inmobiliaria Numero: 240-35928.

ANEXO 2: JUSTIFICACION DE LOS REQUERIMIENTOS DE FORMACION COMO UN ELEMENTO PARA ALCANZAR LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO

La calidad microbiológica de la producción quesera puede verse afectada por diversos factores a lo largo de toda la cadena productiva, desde la obtención de la leche en finca, pasando por las plantas de transformación y los sistemas de distribución hasta llegar a los consumidores.

El mejoramiento de la calidad microbiológica de la producción quesera artesanal en el departamento de Nariño es un objetivo que puede alcanzarse, si se llevan a cabo acciones que involucren una prevención integral de los riesgos de contaminación desde la finca hasta el consumidor. Como se mencionó antes, en la región se han desarrollado procesos de capacitación orientados a mejorar la calidad sanitaria de la leche a nivel de productores, sin embargo la etapa de transformación, especialmente la que se lleva a cabo en la microempresas queseras no ha recibido la suficiente atención con miras a reducir el riesgo que los productos allí elaborados representan para la salud pública.

Los sistemas de bioprotección han demostrado a escala de laboratorio y en su aplicación industrial un efecto inhibitorio frente a microorganismos alterantes y patógenos en diversos tipos de queso, generando así mejoras significativas en su calidad microbiológica. Sin embargo, dicha mejora en la calidad será efectiva y podrá maximizarse si, además de aplicar el sistema de bioprotección por adición de un fermento láctico específico, el queso es elaborado cumpliendo principios de buenas prácticas de manufactura (BPM) y procedimientos estandarizados por parte de las personas responsables de su procesamiento.

Por lo anterior, considerando que la mejora de la calidad microbiológica en queso fresco es el objetivo principal del proyecto, en éste se incluye brindar procesos de capacitación a pequeños productores queseros. Este proceso formativo permitirá que los productores cuenten con los conocimientos requeridos para la manipulación adecuada de los procesos y productos, haciendo que se disminuyan así los riesgos de contaminación microbiológica. De esta manera se aborda el objeto del proyecto en forma integral, contribuyendo así a la consecución de las metas e impactos propuestos.

Respecto a la duración de los procesos de capacitación de los productores queseros, está en concordancia con el tiempo de ejecución del proyecto y se llevarán a cabo en el tercer año del mismo.

ANEXO 3: TÉRMINOS DE REFERENCIA PARA LA SELECCIÓN DE BENEFICIARIOS DE LOS PROCESOS DE FORMACIÓN Y CAPACITACIÓN A DESARROLLARSE EN EL MARCO DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO DENOMINADO: “DESARROLLO DE UN CULTIVO BIOPROTECTOR PARA EL MEJORAMIENTO DE LA INOCUIDAD DE LA PRODUCCIÓN QUESERA ARTESANAL DEL DEPARTAMENTO DE NARIÑO”

Los candidatos para participar de los procesos de formación en el marco de ejecución del proyecto deberán cumplir con los siguientes criterios y requisitos.

1. Criterios y requisitos para la participación de candidatos al proceso de formación.

Los candidatos seleccionados deberán tener vinculación en cargo directivo u operativo de una organización/microempresa dedicada al acopio y/o procesamiento de leche. Se seleccionarán 22 microempresas acopiadoras y/o productoras de quesos frescos, una por cada uno de los 22 municipios ubicados en las distintas cuencas lecheras del Departamento de Nariño.

Para la selección de las microempresas se tendrán en cuenta los siguientes factores:

- a) Mayores volúmenes y tipo de producción
- b) Mayor número de empleados o personas que derivan su sustento de la empresa
- c) Mayor disposición de participar en el proyecto
- d) Capacidad de infraestructura física y equipos instalada
- e) Condiciones higiénico sanitaria actuales de procesamiento.
- f) Condiciones geográficas de localización (temperatura, altura sobre el nivel del mar) que garantice contar con mayor variabilidad genética en los asilamientos de BAL.

Una vez definidas las microempresas/organizaciones, los criterios para seleccionar los beneficiarios de la capacitación de dicha organización se hará como se describe a continuación.

2. Criterios y metodología de evaluación y calificación para seleccionar los beneficiarios.

Metodología y criterios de evaluación

Los beneficiarios de las actividades de capacitación que se desarrollarán en el marco del proyecto serán en primera instancia los propietarios, copropietarios, administrativos o empleados de cada una de las plantas de procesamiento de queso

o del centro de acopio de leche donde se realicen procesos de transformación. Cada microempresa podrá postular un máximo de 5 candidatos para los procesos de capacitación.

Por parte del equipo coordinador del proyecto se diseñará una evaluación técnica la cual será aplicada al personal que postule cada una de las organizaciones, resultado de la cual se seleccionará un máximo de 3 candidatos por cada una de las microempresas.

La metodología de evaluación será una prueba escrita donde se busca evidenciar el hecho de que los candidatos cuenten con las habilidades de lectoescritura suficientes para adquirir los conocimientos, el nivel de conocimiento básico en elaboración de quesos frescos y en condiciones higiénicas de procesamiento.

Calificación

Los candidatos seleccionados por cada microempresa serán aquellos que ocupen los 3 primeros lugares en el proceso de evaluación técnica, con puntajes en escala de 1 a 100 siendo 100 el máximo puntaje posible.

En caso de quedar cupos disponibles se invitará a participar a propietarios o empleados de otras microempresas productoras de queso ubicadas en los diferentes municipios de las cuencas lecheras del departamento de Nariño.

3. Condiciones de compromiso de los beneficiarios para contribuir con el objeto del proyecto.

Los beneficiarios se comprometen a aplicar los conocimientos adquiridos en los procesos de formación a sus respectivas áreas de trabajo de las organizaciones y/o empresas participantes, promoviendo así el fortalecimiento de la inocuidad en la producción quesera.

Los beneficiarios de los procesos de formación se comprometerán a replicar la información en la técnicas y procedimientos de mejoramiento de la calidad quesera a las demás personas que forman parte de las diferentes organizaciones especialmente, haciendo énfasis en aquellas áreas encargadas de producción y control de calidad.

Los beneficiarios se comprometen a conformar un comité con demás integrantes de la empresa cuyo fin será velar por el cumplimiento de las técnicas y metodologías impartidas en los procesos de formación con el fin de disminuir el riesgo de contaminación microbiológica en la producción de quesos frescos.