FORMATO PARA LA PRESENTACIÓN DEL PERFIL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

CONVOCATORIA 2024

1. Cuantificación e identificación de bacterias deteriorativas por métodos convencionales y moleculares, evaluación sensorial y cambios fisicoquímicos durante el tiempo de vida útil del queso amasado elaborados en Tulcán, Provincia del Carchi, Ecuador.

2. Tipo de proyecto:

- [ ] **Proyecto de Investigación Básica**
- [x] **Proyecto de Investigación y Desarrollo (I+D)**
- [ ] **Proyecto de Investigación y Desarrollo (I+D+I)**

3. Grupo de investigación
CIENCIA, TECNOLOGÍA Y GESTIÓN EN EL PROCESAMIENTO DE ALIMENTOS (CITEGPA)

4. Líneas de investigación y campos del conocimiento

Línea 1	Tecnología, biotecnología calidad e inocuidad en el procesamiento de alimentos
Línea 2	Agroecología

5. Especialidad del campo

Campo Amplio	Ingeniería, Industria y Construcción
Campo Específico	Industria y Producción
Campo Detallado	Procesamiento de Alimentos

6. **Eje y sub-eje de la propuesta**

Eje	Salud pública y comunitaria
Sub-eje	Soberanía alimentaria como una estrategia para

	mitigar la desnutrición infantil.

7. Director del proyecto, integrantes internos y/o externos (coautores, o colaboradores), todos son participantes en la investigación.

Nombre del integrante	Rol en el proyecto	Institución	Actividades a cargo del investigador	Tiempo en el que participará en el proyecto	Productos que generará el participante	Correo electrónico	Teléfono
Gualberto León	Director de investigación	UPEC	Representación y administración del Proyecto. Elaboración de informes requeridos por la dirección de investigación Compras de equipos, reactivos e insumo Revisión bibliográfica Calibración de equipos y validación de métodos Cuantificación de bacterias deteriorativas presuntivas durante el tiempo de vida útil de los quesos amasados por métodos de siembra en superficie. Cuantificación de parámetros fisicoquímicos durante el tiempo de vida útil de	Febrero 2024/Febrero 2026	Informes cuatrimestrales y requeridos por la Dirección de Investigación. Archivos de solicitud de especificaciones técnicas de equipos, insumos y reactivos. Archivos de necesidad de compra de equipos, insumos y reactivos. Carpetas con artículos científicos Resultados de cuantificación de bacterias deteriorativas y de parámetros fisicoquímicos. Informe final 1 artículo científico.	gualberto.leon@upec.edu.ec	0979923783

			los quesos amasados. Informe final				
Miguel Anchundia	Coautor	UPEC	Componente estadístico del proyecto Compras de equipos, reactivos e insumo Revisión bibliográfica Calibración de equipos y validación de métodos Identificación de bacterias deteriorativas durante el tiempo de vida útil de los quesos amasados por método bioquímicos. Identificación de bacterias deteriorativas durante el tiempo de vida útil de los quesos amasados por métodos moleculares. Evaluación estadística de los resultados de los objetivos asignados	Febrero 2024/Febrero 2026	Elaboración de componente estadístico del proyecto Archivos de solicitud de especificaciones técnicas de equipos, insumos y reactivos. Archivos de necesidad de compra de equipos, insumos y reactivos. Carpetas con artículos científicos Resultados de identificación bioquímica y molecular de bacterias deteriorativas de los quesos amasados Evaluación estadística de resultados 1 artículo científico	miguel.anchundia@upec.edu.ec	0983549937
			Componente estadístico del proyecto Compras de equipos, reactivos e insumo		Elaboración de componente estadístico del proyecto Archivos de solicitud de		

Carlos Paredes	Coautor	UPEC	Revisión bibliográfica Calibración de equipos y validación de métodos Determinación de las características sensoriales y de textura durante el tiempo de vida útil de los quesos amasados Evaluación estadística de los resultados de los objetivos asignados	Febrero 2024/Febrero 2026	especificaciones técnicas de equipos, insumos y reactivos. Archivos de necesidad de compra de equipos, insumos y reactivos. Carpetas con artículos científicos Resultados de las características sensoriales y de textura de los quesos amasados durante su tiempo de vida útil Evaluación estadística de resultados 1 artículo científico	carlos.paredes@upec.edu.ec	0989373335
Carla Vaca	Apoyo Administrativo	UPEC	Revisión de Bibliografía Recolección de datos relevantes del proyecto Colaboración en el tratamiento de datos Recolección de Información de Equipos y Materiales Seguimiento procesos de adquisiciones de Equipos y Materiales	Febrero 2024/Febrero 2026	Construcción de Estado del Arte Informes cuatrimestrales Colaboración en la elaboración de Artículos científicos Solicitud de bienes de Equipos y Materiales Informe de seguimiento de los procesos de adquisición	carlae.vaca@upec.edu.ec	0998668975

			Seguimiento de cronograma de actividades del proyecto de investigación Generar archivo físico del proyecto de investigación		de Equipos y materiales Informe de cumplimiento del cronograma de actividades del proyecto de investigación Custodio de archivo físico del proyecto de investigación		

8. **Fecha de entrega del perfil**

Octubre 18 del 2023

9. **Fecha planificada de finalización del proyecto**

Febrero 27 de 2026

10. Introducción

El queso amasado Carchense, es un queso fresco, definido como un alimento no madurado obtenido de la cuajada no cortada, por acidificación natural, molido, amasado, moldeado en moldes perforados y espolvoreado de sal de consumo humano; desmenuzado manualmente, moldeado y prensado (INEN 1528, 2012). Este alimento es único en la provincia, en el país y en el mundo por su tradición, su historia, su sabor y su contextura (Diario La Hora, 2019).

Posee características fisicoquímicas de pH entre 6.53 y 6.86, actividad de agua entre 0.97 y 0.98 y cloruro de sodio entre 1.92 y 2.69%, humedad entre 4.45 y 5.15%, proteína cruda entre 26.06 y 37.56%, grasa entre 38.14 y 51.84% y carbohidratos totales entre 8.08 y 32.46% (Anchundia y col., 2019), que lo hacen un ecosistema ideal para el desarrollo de microorganismos deteriorativos. Este alimento empacado al vacío tiene un tiempo de vida útil de 21 días.

El tiempo de vida útil es relativamente corto debido a cambios químicos, bioquímicos y físicos que son determinados por la actividad de los microorganismos y las enzimas producidas, que traen como consecuencia cambios en los atributos sensoriales como el color, el sabor, el olor, el flavor y la textura. Debido a la formación de película blanquecina amarillenta, espesa, gelatinosa y viscosa, la aparición de olores desagradables por la hidrolisis de proteínas y lípidos, decoloración debido a la

formación de pigmentos y la producción micotoxinas durante el almacenamiento en refrigeración. También se altera la composición nutricional tal como el contenido de agua, proteínas, carbohidratos y lípidos, lo cual reduce su valor comercial. (Ho, Howes & Bhandari, 2017; Kačániová et al., Lacivita et., 2019, 2019 Hoda S. El-Sayed & El-Sayed, 2021)

Así mismo, la reducción de la vida útil tiene como efecto la pérdida del alimento, que se convierte en desecho, produciendo un efecto negativo en la seguridad alimentaria y nutricional, efectos perjudiciales en el ambiente y graves pérdidas económicas para los consumidores y fabricantes. (Martin, Torres & Wiedmann, 2020)

Es importante mencionar que en el Ecuador no existen investigaciones relacionadas con la cuantificación e identificación de microorganismos deteriorativos en quesos frescos y mucho menos en el queso amasado de la provincia del Carchi, sin embargo, dada la importancia de las bacterias deteriorativas se han realizados investigaciones internacionales que demuestran que las bacterias que causan deterioro del queso son, bacterias psicrótrofas, Gram negativas, coliformes, *E. coli*, bacterias ácido lacticas, bacterias proteolíticas como *Bacillus spp*, *B. stearothermophilus* , *B. licheniformis* , *B. coagulans* , *B. cereus*, *B. subtilis* y *B. circulan*, los lipolíticos predominantes en los estudios fueron especies de *Pseudomonas, Enterobacter*, entre otros.

Los estudios microbiológicos están basados en métodos tradicionales de cultivo, aislamiento e identificación, sin embargo, existen microorganismos que no son cultivables, de tal manera que el aislamiento e identificación no es posible y su estudio deben ser realizados con tecnología y métodos independientes de cultivos utilizando técnicas de biología molecular tal como la PCR, secuencia de próxima generación, entre otros, que permitan contribuir a revelar y catalogar extensivamente a los quesos desde el punto de vista de microorganismos deteriorativos. (Xue et al., 2018)

La microbiota identificadas por las nuevas tecnologías contribuyen significativamente con la calidad, inocuidad y a otros parámetros fisicoquímicos de los quesos frescos, así como su impacto en toda la cadena de producción, desde la pasteurización de la leche, hasta la culminación de la vida útil. Entender la microbiota es crucial para desarrollar características deseables y la calidad del producto final. En este sentido, la secuenciación de próxima generación en los últimos 5 años ha sido utilizada ampliamente para describir la microbiota de los alimentos lo cual ha permitido un análisis más detallado de la diversidad microbiana en comparación con métodos cultivos dependientes. (Nam et al. 2021)

El uso de la secuenciación de próxima generación y técnicas de biología molecular ha hecho que la microbiología de alimentos haya revolucionado rápidamente para analizar la diversidad microbiana presente en matrices de alimentos, produciendo

resultados mucho más claros, y de alto impacto que las investigaciones dependientes de cultivos. (Marino et al., 2020)

11. El problema

El tiempo de vida útil de los quesos frescos amasado fabricados en la provincia del Carchi, está determinado por cambios químicos, bioquímicos y físicos debido al crecimiento de microorganismos deteriorativos y a su vez por su actividad enzimática. También son afectadas las características sensoriales y nutricionales debido a la perdida de firmeza, textura, aparición de colores sobre la superficie, viscosidad, sabores y olores desagradables, disminuyendo el contenido de nutrientes, entre otros. Cambios que conllevan a una reducción en el tiempo de comercialización en perchas, disminuye su valor comercial y problemas de distribución para toda la población. La consecuencia de no estudiar la carga microbiana y la microbiota deteriorativa de los quesos frescos amasados afecta a la seguridad alimentaria de niños y de gran parte de la población que consumen estos tipo de alimentos. (Mastromatteo et al., 2014; Kačániová et al, 2019, Nam et al., 2021)

El estudio contribuirá al cumplimiento de los objetivos de desarrollo sostenible 12, 13, 14 y 15, ya que conociendo la microflora deteriorativa se puede investigar métodos de conservación, materiales de empaque, componentes bioactivos, métodos de limpieza, entre otros, que pueden mejorar el tiempo de duración en comercialización. El no realizar la investigación acerca de la vida útil de los queso amasados, por su corto tiempo de vida útil, puede generar grandes cantidades de desechos que serán recogidas de los sitios de comercialización, ser desechado en el medio ambiente, creando problemas de contaminación y generar problemas económicos para los consumidores y fabricantes. (Martin,Torres-Frenzel & Wiedmann, 2021)

Los microorganismo deterioradores reportados en quesos artesanales del noroeste de Italia, mozzarella, suaves egipcios, tipo Grana, Kareish, Tallaga, Ras y quesos cuajada acida, son los siguientes: bacterias mesófilas, proteolíticas, lipolíticas, coliformes, especies de *Enterococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, bacterias ácidos lácticas, especies de *Clostridium*, *Aeromonas* y *Pseudomonas* (Dal Bello et al., 2010; Mastromatteo et al., 2014, Mohamed, Hegazy, & Mahgoub, 2013; Alessandria, et al., 2016; Odeyemi et al., 2019; Hassan et al., 2020; Samelis et al., 2021). Microorganismos que interaccionan y que llevan a cabo sucesiones complejas que deben ser caracterizados en cada tipo de queso fresco ya que estos alimentos son un ecosistema que proporciona condiciones ideales para su crecimiento y supervivencia.

El queso amasado carchense es un queso fresco que se comercializa en la provincia del Carchi y que tiene un alto impacto en la economía de la zona, este alimento se encuentra en la base de la alimentación de los carchenses ya que es un producto fabricado por microempresas de la localidad, a partir de la leche producida en la región, generando fuentes de empleos y bienestar en la población (Anchundia y col., 2019). La compresión del deterioro del queso amasado es de suma importancia para prolongar la vida útil y a la vez contribuir con el cumplimiento de los objetivos de

desarrollo sostenible 1, 2 y 3. Los microorganismos deteriorativos que forman parte de la microbiota del queso amasado de la provincia del Carchi causan cambios sensoriales, fisicoquímicos y los problemas antes mencionados, estos microorganismos no han sido estudiados durante el tiempo de vida útil, por lo cual se plantean los siguientes objetivos.

12. Objetivos

Objetivo general

Cuantificar e identificar a las bacterias deteriorativas por métodos convencionales y moleculares, evaluación sensorial, cambios de textura y fisicoquímicos durante el tiempo de vida útil del queso amasado elaborados en Tulcán, Provincia del Carchi, Ecuador.

Objetivos específicos

1. Cuantificar bacterias deteriorativas presuntivas durante el tiempo de vida útil de los quesos amasados por métodos de siembra en superficie.

2. Identificar bacterias deteriorativas durante el tiempo de vida útil de los quesos amasados por método bioquímicos.

3. Identificar bacterias deteriorativas durante el tiempo de vida útil de los quesos amasados por métodos moleculares.

4. Cuantificar parámetros fisicoquímicos durante el tiempo de vida útil de los quesos amasados.

5. Determinar las características sensoriales y textura durante el tiempo de vida útil de los quesos amasados.

13. Justificación y alcance territorial

En las últimas décadas la población mundial ha crecido y a la par la demanda de alimentos, en tal sentido el Ecuador tiene una población de 16.938.986 habitantes, de los cuales la provincia del Carchi tiene 172.828 habitantes, distribuidos en los diferentes cantones de la siguiente manera: Tulcán con 92.375 habitantes, Montúfar con 29.590 habitantes, Bolívar 15.677 habitantes, Espejo con 14.522 habitantes, Mira con 12.727 habitantes y Huaca con 7.937 habitantes (INEC, 2023). La población es dinámica, crece en el tiempo y demanda de una mayor cantidad de alimentos, por lo cual extender la vida útil de los alimentos es una necesidad imperante en la industria

alimentaria, en tal sentido el desarrollo de proyectos de investigación que aporten conocimiento para lograr este cometido debe ser priorizado para cumplir con la demanda de la población ya indicada.

En la provincia del Carchi y zona norte del Ecuador el queso amasado es de gran importancia ya que forma parte de su base de alimetación. Este queso tiene impacto directo en el desarrollo económico, fabricado por microempresas locales a partir de la leche producida en la región, generando fuentes de empleos y bienestar para la población (Anchundia y col., 2019), teniendo en cuenta lo antes mencionado las instituciones públicas han realizado eventos nacionales tales como: 'En busca del mejor queso amasado carchense', con el objetivo de conseguir la denominación de origen protegida para el queso amasado, ya que este queso es único en la provincia, en el país y el mundo, por su tradición, su historia, su sabor, su contextura. Por lo cual se busca que el queso amasado sea parte del patrimonio alimentario de los carchenses y lograr situarlo con la denominación de origen protegida como cualquier producto artesanal que tiene el país. (El Productor, 2019)

Un queso amasado con mayor tiempo de vida útil permitirá conservar la textura, mantener su sabor, las características nutricionales y sobre todo el mantenimiento de las características de calidad, haciendo de este alimento un producto aceptado y apetecido por el consumidor. (Natrella, Gambacorta & Faccia, 2022). En este sentido controlar el crecimiento y reproducción de los microorganismos deteriorativos es crítico para extender la vida útil de los quesos, a pesar de que la leche pasteurizada como materia prima contiene una carga microbiana baja, en el proceso de producción existe contaminación cruzada, para evitar este tipo de contaminación se establecen protocolos para minimizar el problema de aumento de la carga de microorganismos, estos protocolos no siempre tienen un 100% de efectividad por lo cual hasta obtener el queso amasado siempre habrá un incremento en el la carga microbiana (Song et al., 2022). El cuantificar e identificar los microorganismos que deterioran al queso amasado permitirá investigar y proponer métodos de conservación, de limpieza y saneamiento en las microempresas de procesamiento, y también investigar métodos y materiales de empaque que permitan alargan la vida útil a más de 20 días.

La secuenciación de alto rendimiento por metagenómica y enfoques de biología molecular permitirá entender el rol de los microorganismos deteriorativos durante el tiempo de vida útil. Los quesos son ecosistemas donde los microorganismos han evolucionado para adaptarse a condiciones abióticas tales como acidez o salinidad, adicionado a condiciones bióticas tales como competencia o depredación. Los microbiomas de quesos también han servido como modelos de comunidades para estudiar los procesos complejos de importancia tales como la formación de comunidades microbianas, interacciones, transferencia horizontal de genes. Estas herramientas son útiles para la caracterización de quesos ya que provee una resolución taxonómica a nivel de especie y cepa además de información funcional (Xu et al., 2021). También, el enfoque con técnicas de biología molecular y metagenómica para la identificación de microorganismos deteriorativos permitirán

obtener información de mayor impacto que los métodos dependientes de cultivo, enfoques que se están utilizando en el área de Ciencia, Tecnología e ingeniera en alimentos en los últimos diez años a nivel mundial y que pueden ser abordados por esta investigación en el Laboratorio de Microbiología Molecular de Alimentos que se pretende establecer en las instalaciones de la UPEC mediante la compra de equipos.

Al tener el conocimiento, mediante la investigación acerca de los microorganismos deteriorativos, la industria láctea se enfocaría en extender la vida útil de los quesos dada su importancia para los consumidores, debido a las cantidades de nutrientes que contienen, y poder extender su distribución desde el sitio de fabricación hasta zonas lejanas donde se consume este tipo de queso, y a la vez pensar en introducir este producto en nuevos mercados nacionales e internacionales. El extender la vida útil de los quesos amasados permitirá aumentar la oferta de alimentos sanos, de calidad, nutritivos, con características sensoriales adecuadas, accesible a la población, por ende, este estudio ayudará a proporcionar seguridad y soberanía alimentaria en la población que consuma este tipo de alimentos, así mismo permitirá contribuir al cumplimiento de los objetivos de desarrollo sostenible 1, 2 y 3 que hacen referencia a lo siguiente: fin de la pobreza, hambre y salud y bienestar respectivamente. En este contexto también se aporta a los ODS 12, 13, 14 y 15 porque al alargar el tiempo de vida útil del queso amasado la producción de residuos será menor, haciendo del proceso de producción de queso más amigable con el ambiente.

Por lo antes mencionado, se presenta el proyecto de investigación a desarrollarse con las microempresas de quesos amasados de la provincia del Carchi, puesto que este alimento es único y típico de la provincia por su tradición, su historia, su sabor y su contextura (Diario La Hora, 2019). Al no existir trabajos de investigación acerca de la temática planteada, la Carrera de Alimentos, mediante la línea de investigación " Tecnología, biotecnología calidad e inocuidad en el procesamiento de alimentos" y sublíneas de investigación "Calidad, inocuidad y gestión en el proceso de diseño, desarrollo e innovación de alimentos", pretende aportar conocimientos para la innovación en el proceso de producción del queso amasado.

El proyecto de investigación está orientado al cumplimiento de los objetivos de desarrollo sostenible mencionados y a la sostenibilidad, donde la Universidad Politécnica Estatal del Carchi se destaca, esto permitirá generar conocimiento de impacto, y a su vez potencializar la innovación en la zona de influencia, satisfaciendo las necesidades de la población, colocando a la Universidad Politécnica Estatal del Carchi como una institución transformadora para la calidad de vida de la población.

14. Sostenibilidad

El proyecto “Cuantificación e identificación de bacterias deteriorativas por métodos convencionales y moleculares, evaluación sensorial y cambios fisicoquímicos durante el tiempo de vida útil del queso amasado elaborados en Tulcán, Provincia del Carchi, Ecuador”, está programado para una duración de 24 meses, en el cual se

plantea la instalación de un laboratorio de Microbiología Molecular de Alimentos, que tiene relevancia para la provincia del Carchi ya que permitirá realizar análisis a nivel de biología molecular de diferentes microorganismos que pueden intervenir en el deterioro de alimentos de la región, microorganismos patógenos que producen ETAS, vigilancia epidemiológica de alimentos que se comercializan en los distintos mercados, entre otros.

El estudio de los microorganismos deteriorativos en el queso amasado y en otros alimentos contribuye a la sostenibilidad de las industrias alimentarias, ya que las industrias al comprender cómo los microorganismos afectan la vida útil de los alimentos y a la generación de desechos pueden reducir las pérdidas económicas y minimizar el impacto ambiental asociado con la producción de estos tipos de alimentos.

La Universidad Politécnica Estatal del Carchi, mediante la carrera de Alimentos y con el desarrollo del proyecto planteado, puede impactar de forma positiva en la industria alimentaria ya que puede proporcionar datos al productor, que posibiliten la innovación en los procesos de producción y alcanzar alimentos de alta calidad, aceptabilidad y de mayor tiempo de vida útil, lo cual permitirá la posible introducción de producto alimentarios carchenses en los mercados nacionales e internacionales, posicionando a la provincia del Carchi como innovadora en productos tradicionales, llamando la atención de los gobierno local, nacional e internacionales, para realizar inversión en nuevos proyectos que aprovechen el potencial de infraestructura y talento humano de la Universidad. Ubicando a la Universidad Politécnica Estatal del Carchi como generadora de conocimiento que transforma su zona de influencia.

Las universidades que cuentan con laboratorios de análisis de biología molecular tienen ventaja competitiva ya que les da a los estudiantes herramientas y capacidades técnicas de última generación para el análisis de microorganismos y genes de interés en la industria de alimentos. Esta ventaja puede ser atractiva para el ingreso de estudiantes en el estudio de la carrera ya que cuando egresan pueden ser talentosos e equipos de investigación que realicen estudios con equipos y herramientas de biología molecular. Esto aumenta el prestigio de la institución y su capacidad para competir a nivel nacional e internacional. La inclusión de este laboratorio en el entorno universitario brinda a los estudiantes la oportunidad de obtener experiencia práctica en técnicas y tecnologías avanzadas lo cual enriquece su educación y los prepara mejor para su futuro profesional. La investigación realizada en el laboratorio puede conducir a la creación de tecnologías y patentes que pueden ser comercializadas y generar ingresos para la universidad. Promoviendo la transferencia de tecnología y la colaboración con la industria.

Se pretenden realizar como segunda fase del proyecto el estudio de la micobiota de quesos amasados mediante la identificación y cuantificación de mohos y levaduras, así como su interacción en estas matrices de alimentos, también responsables de deterioro.

Otros estudios que pueden ser realizados el laboratorios de Microbiología Molecular de Alimentos son la cuantificación, identificación e interacción de microorganismos deteriorativos en frutas, derivados de frutas, carnes y derivados cárnicos, lácteos y derivados lácteos, entre otros. También se pueden abordar el almacenamiento de material genético como un banco de especies utilizadas como alimentos con altos contenidos de nutrientes que se van perdiendo por su bajo consumo y desconocimiento, realizar estudios acerca de genes y el clonaje molecular para la producción de metabolitos de interés para la industria de alimentos, entre otros estudios que involucren el estudio de genes. La realización de estos estudios permiten la posibilidad de generación de convenios interinstitucionales que permitan garantizar el funcionamiento del proyecto y del laboratorio de Microbiología Molecular en el tiempo.

15. Marco Teórico

El queso amasado Carchense está considerado dentro de la denominación de queso fresco y se define como un alimento no madurado obtenido de la cuajada no cortada, por acidificación natural, molido, amasado, moldeado en moldes perforados y espolvoreado de sal de consumo humano; desmenuzado manualmente, moldeado y prensado. (INEN 1528, 2012).

Este alimento es único en la provincia, en el país y el mundo por su tradición, su historia, su sabor y su contextura. (Diario La Hora, 2019)

Posee características fisicoquímicas de pH entre 6.53 y 6.86, actividad de agua entre 0.97 y 0.98 y cloruro de sodio entre 1.92 y 2.69%, humedad entre 4.45 y 5.15%, proteína cruda entre 26.06 y 37.56%, grasa entre 38,14 y 51.84% y carbohidratos totales entre 8,08 y 32.46% (Anchundia y col., 2019), que lo hacen un ecosistema ideal para el desarrollo de microorganismos deteriorativos y cuando es empacado al vacío tiene un tiempo de vida útil de 21 días.

El tiempo de vida útil es relativamente corto debido a cambios químicos, bioquímicos y físicos que son determinados por la actividad de los microorganismos y las enzimas producidas. La consecuencia de estos cambios es la alteración de atributos sensoriales como el color, el sabor, el olor, el flavor y la textura debido formación de una película blanquecina o amarillenta, espesa, gelatinosa y viscosa, aparición de olores desagradables por la hidrolisis de proteínas y lípidos, decoloración del queso y formación de colonias pigmentadas, e incluso producción de micotoxinas durante el almacenamiento en refrigeración. También se altera la composición nutricional tal como el contenido de agua, proteínas, carbohidratos y lípidos, lo cual reduce su valor comercial. (Ho, Howes & Bhandari, 2017; Kačániová et al., Lacivita et., 2019, 2019 Hoda S. El-Sayed & El-Sayed, 2021)

Otras implicaciones de la reducción de la vida útil es la perdida de alimentos que se convierten en desechos que ocasionan inseguridad alimentaria y nutricional, consideraciones ambientales y pérdidas económicas para los consumidores y fabricantes. (Martin, Torres & Wiedmann, 2020)

Es de hacer notar que en Ecuador no existen investigaciones relacionadas con la cuantificación e identificación de microorganismos deteriorativos en quesos frescos y mucho menos en quesos amasados de la Provincia del Carchi, sin embargo dada la importancia de las bacterias deteriorativas se han realizados investigaciones internaciones que demuestran que las bacterias que causan deterioro de los quesos son, bacterias psicrótrofas, Gram negativas, coliformes, *E. coli*, bacterias, ácido lacticas, bacterias proteolíticas como *Bacillus spp*, *B. stearothermophilus* , *B. licheniformis* , *B. coagulans* , *B. cereus*, *B. subtilis* y *B. circulan*, lipolíticos predominantes fueron especies de *Pseudomonas, Enterobacter*, entre otros.

Así mismo existen investigaciones que muestras cambios fisicoquímicos y sensoriales corridos durante el periodo de tiempo de vida útil de distintos tipos de queso. Estos estudios se describen brevemente a continuación:

Abdel & Soliman (2019) evaluaron la prevalencia de algunos microorganismos deteriorativos en algunas variedades de quesos duro Ras y quesos procesados mediante análisis de acidez y cloruro de sodio. Realizaron la evaluación microbiológica mediante el análisis de coliformes totales, *E. coli*, conteo total de microorganismos proteolíticos, conteo total de microorganismos lipolíticos y conteo de *Enterococcus*. Entre los resultados obtuvieron que la acidez titulable (%) de los quesos Ras y procesados fueron 0.5 0.5 ± 0.073 y 0.93 ± 0.062 respectivamente, mientras que la sal estuvo en 3.4 ± 0.078 y 1.03 ± 0.05% respectivamente. Muchas muestras estuvieron contaminadas con un alto número de coliformes, bacterias proteolíticas, lipolíticas y *Enterococcus*. La identificación *bioquímica de los coliformes aislados en los quesos Ras revelaron la presencia de Citrobacter diversus* (16.13%), *Citrobacter freundii* (12.9%) y *Klebsiella oxytoca* (11.29%), mientras que *E. coli* solamente fue detectado en un aislado, mientras que en quesos procesados fueron identificadas *Enterobacter intermedius* (21.43), *E. coli* (20%), *Citrobacter freundii* (20%), *Klebsiella oxytoca* (12.86%), *Citrobacter diversus* (11.4%) y *Erwinia chrysanthemi* (7.14%). El conteo de bacterias proteolíticas estuvo conformado principalmente por Bacillus spp, B. stearothermophilus , B. licheniformis , B. coagulans , B. cereus, B. subtilis y B. circulan. Los microorganismos lipolíticos predominantes fueron especies de *Pseudomonas* y *Enterobacter*. Los enterococcus predominante fueron *Ent. durans* (22.42%), *Ent. ratti* (20.69%), *Ent. faecium* (17.24%), *Ent. faecalis* (13.79%), *Ent. italicus* (13.79%) y *Ent. caccae* (8.63%) en quesos Ras. En quesos procesados fueron, *Ent. Durans* con mayor prevalencia, *Ent. cloaccae* (16.22%), *Ent. faecium* (10.81%), *Ent. ratti* (10.81%) y *Ent. italicus* (8.1%). Los autores asocian la diversidad de microorganismo a pobres prácticas higiénicas, condiciones y manipulación durante el procesamiento.

Teider et al. (2019) realizaron el estudio, *Pseudomonas spp*. y otros microorganismos psicrótrofos en quesos frescos Minas Brasileños inspeccionados y no inspeccionados. El objetivo propuesto fue evaluar la actividad proteolítica alcalinas y lipolítica, así como su potencial de producción de enzimas metaloproteasas. Evaluaron 10 muestras de quesos inspeccionados y 10 no inspeccionados. La media del conteo total de psicotrofo fue 1.07 (± 2.18) × 10^9 UFC/g en las muestras inspeccionadas y 4.5 (±5.86) × 10^8 UFC/g en muestras no inspeccionadas. El promedio de *Pseudomonas* spp. fue de 6.86 (±18.6) × 10^5 y 2.08 (±3.65) × 10^6 UFC/g para las muestras inspeccionadas y no inspeccionadas respectivamente. En total 694 cepas de psicotrofas y 47 *Pseudomonas* spp fueron aisladas, del cual 59,9% y 68.1% fueron simultáneamente lipolíticas y proteolíticas. Del total de 65.63% de los organismos psicotrofos contenían el gel *aprX* fueron confirmadas como *Pseudomonas spp* utilizando este gen especifico utilizando la PCR como metodología de identificación. El análisis filogenético del gen 16S r RNA de otros psicotrofos que producían el gen *aprX* fueron identificadas como *Serratia spp*. (n=7), *Raoultella ornithinolytica* y *Acinetobacter schindleri* (n=1) en las muestras inspeccionadas y *Psychrobacter sanguinis* (n=1) y *Leuconostoc mesenteroides* (n=1) en las no inspeccionadas.

Kačániová et al. (2020) estudiaron la microbiota de quesos eslovacos no ahumados "Parenica", mediante el conteo de aerobios mesófilos totales, bacterias ácido lácticas y bacterias coliformes en PCA a 30 °C, MRS, APT, MSE a 37 °C y VRBL a y 37 °C respectivamente. Fueron evaluadas un total de 42 quesos colectados en 3 meses. Los aislados de bacterias Gram positivas y Gram negativas fueron identificados por MALDI-TOF MS. *Bacillus* sp. y *Enterococcus faecium* fueron las especies de bacterias más frecuentes. Las bacterias ácido lácticas estuvieron representadas por *Lactobacillus helveticus, L. jensenii, L. alimentarius, L. crispatus, L. curvatus, L. fermentum, L. suebicus, L. delbrueckii* ssp. *lactis, L. paracasei* ssp. *paracasei, Lactococcus lactis* ssp. *lactis, Leuconostoc lactis* y *Le. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*. Mediantes está caracterización lograron determinar al perfil de microorganismos constituyen los tradicionales quesos elaborados con leche cruda de origen eslovaco, de tal manera que este estudio provee información de las cepas de microorganismos para la industrialización de estos productos típicos de Slovakia.

Estudios en microorganismos deteriorativos como *Clostridium tyrobutyricum*, fueron estudiadas utilizando la secuenciación del gen 16S rRNA y confirmado con MALDI-TOF MS. También fue estudiada por elementos palindrómicos repetitivos PCR (rep-PCR) combinado con electroforesis de agarosa y hexaplex-PCR, debido a que producen metabolitos como como H_2 y CO_2 (presencia de gases) y ácidos orgánicos principalmente ácido butírico que produce sabores rancios y defectos de textura pronunciados en el queso, como hendiduras, grietas y ojos no deseados. Estos cambios deteriorativos conllevan a grandes pérdidas financieras para la industria láctea (Podrzaj, Burtscher & Domig, 2021; Burtscher et al., 2020)

Una vez conocidos los microorganismos deteriorativos se deben realizar investigaciones enfocadas en buscar alternativas para inactivar a estos microorganismos en todas las fases de la cadena de producción de alimentos, mantener sus características sensoriales, nutricionales y sus características microbiológicas que conllevaran a una mejor distribución de los quesos frescos desde su región de fabricación, generar menos desechos, reducir su impacto ambiental y reducir los problemas económicos a consumidores y fabricantes.

Algunos estudios realizados en los últimos 5 años que tiene como objetivo lo mencionado en el párrafo anterior se citan a continuación:

Ricciardi et al. (2019) llevaron a cabo el estudio, irradiación con rayos X como una técnica validada para prolongar la vida útil del queso ricotta, para lo cual evaluaron una intensidad de 0.5. 2 y 3 KGy de intensidad en quesos manufacturado artesanal e industrialmente. Fueron realizados análisis microbiológicos, sensoriales y pH durante almacenamiento refrigerado. En microbiología determinaron aerobios mesófilos, *Pseudomonas spp*, *Enterobacteriaceae* y *Bacillus cereus.* La evaluación sensorial fue llevada a cabo por 7 panelistas entrenado, capacitados para evaluar olores desagradables, color, textura y aceptación global utilizando una escala de 0 a 7 puntos donde 4 representó el umbral de aceptabilidad del queso. Entre los resultados obtenidos evidenciaron que los quesos artesanales irradiados con 0,5 y 2 KGy fueron aceptables por más de 20 días, mientras que los no tratados no fueron aceptables desde los 3 días de almacenamiento. La vida útil de los quesos irradiados con 0.5 KGy tuvieron 14 días debido a la apariencia y defectos sensoriales. Los quesos fabricados industrialmente con todas las intensidades de rayos X prolongaron su vida útil a 84 días comparados con el control el cual fue rechazado a los 40 días de evaluación por defectos sensoriales. Estos resultados mostraron que el tratamiento con rayos x puede prolongar el tiempo de vida útil del queso ricotta, de tal manera que la comercialización en el tiempo de los quesos es mayor y que pueda distribuirse en condiciones adecuadas lejos de los lugares de producción.

Barukc˘ic´ et al. (2020) tuvieron como objetivo investigar la aplicación de atmosfera modificada (MAT) en el empacado de quesos frescos obtenidos por coagulación ácido y compararlos con los empacados comunes donde se utiliza aire atmosférico y vacío. Realizaron la evaluación de microbiológica de deterioro mediante el análisis de aerobios mesófilos, *Enterobacteriaceae*, *E. coli* y *Staphylococcus aureus*, fisicoquímica mediante la determinación de acidez, pH, materia seca total, contenido de grasa y parámetros de textura tales como, dureza (H), elasticidad (mm) y masticabilidad (mJ) utilizando metodologías oficiales y los parámetros de textura utilizando un analizador de textura TA.HD Plus. La evaluación sensorial se llevó a cabo mediante un panel sensorial entrenado de 5 personas, utilizando una escala de 20 puntos, basada en la norma ISO22935-2 2009, fueron evaluados los parámetros de apariencia, olores desagradables, sabor y consistencia. Entre los resultados

encontraron que en la muestra control, la acidez disminuye desde 4.66 a 4.47, el conteo de aerobios mesófilos incrementó y en la evaluación sensorial obtuvieron un puntaje entre 17.63 y 19.73, mientras que en las muestras empacadas con atmosfera modificada y vacío la acidez disminuye muy ligeramente y el crecimiento microbiano disminuyo y en la evaluación sensorial obtuvo un puntaje promedio de 17.72 al final de los 18 días de almacenamiento. Sus resultados confirmaron que el vació y MAP prolongan la vida útil de los quesos frescos, conservando las características fisicoquímicas y sensoriales.

Kõrge et al. (2020) evaluaron extracto de castaña en combinación con un empaque de quitosano en la reducción de microbiota deteriorativa y la micotoxina ácido ciclopiazónico en queso Gouda, para lo cual contaminaron a las muestras con microflora deteriorativa, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* y *Penicillium commune*. El diseño experimental incluyo películas de quitasano con i)extracto de castaña, ii) ácido tánico y iii) sin aditivos y los microorganismos deteriorativos, se evaluaron los cambios deteriorativos por efectos microbiológicos durante 37 días de almacenamiento a 4 °C y 25 °C. Fueron estudiados los cambios microbiológicos y químicos tales como el ácido ciclopiazónico, pH y humedad. El conteo de los microorganismos mostró una disminución más efectiva en aquellos quesos con películas sin aditivos, sin embargo, las películas con aditivos fueron más efectivas en propiedades protectoras contra la producción de micotoxinas, perdida de humedad y cambios de pH.

Song et al. (2022) evaluaron el tratamiento con dióxido de carbono fase densa en quesos Quark y su efecto sobre la vida útil, fisicoquímica, reológica, microestructura y compuestos volátiles en almacenamiento. El tratamiento aplicado a 20 MPa, 45 min, 55 °C fue exitoso para extender la visa útil de los quesos estudiados inhibió a las levaduras y redujo la proteólisis y alteraciones en el pH y color, los quesos evaluados a los 14 días mostraron propiedades reológicas similares al día 0 de almacenamiento. El tratamiento aplicado demostró ser promisorio para mejor la calidad y estabilidad durante el almacenamiento

Los estudios microbiológicos de bacterias deteriorativas en quesos, antes citados están basados en métodos tradicionales de cultivo, aislamiento e identificación, sin embargo, existen microorganismos que no son cultivables, de tal manera que aislamiento e identificación no es posible. Actualmente existen tecnología y y métodos independientes de cultivos basados en técnicas de biología molecular tal como la PCR, secuencia de próxima generación, entre otros que permiten contribuir a revelar y catalogar extensivamente a los quesos desde el punto de vista de microorganismos deteriorativos. Los métodos metagenómicos basados en alto rendimiento utilizan la secuenciación del gen 16S rRNA que tienen la ventaja de incrementar la profundidad, correr la secuencia de muchas muestras y ser más efectivas en costos. (Xue et al., 2018)

Algunos estudios basados en métodos tradicionales de cultivo y aislamiento han sido investigados en quesos, sin embargo, existen microorganismos que no son cultivables, de tal manera que aislamiento e identificación no es posible. Se debe utilizar métodos basados en cultivos y métodos independientes basados en técnicas moleculares de PCR y DGGE para contribuir a revelar y catalogar extensivamente a los quesos. Comparado a los métodos tradicionales, los métodos metagenómicos basados en alto rendimiento utilizando la secuenciación del gen 16S rRNA tienen la ventaja de incrementar la profundidad, correr la secuencia de muchas muestras y ser más efectivas en costos. (Xue et al., 2018)

La microbiota determinada por secuencia de próxima generación, contribuye significativamente con la calidad, inocuidad y a otros parámetros fisicoquímicos de quesos, así como su impacto en cada fase el procesamiento, desde la pasteurización de la leche hasta la culminación de la vida útil. Entender la microbiota es crucial para desarrollar características deseables y la calidad del producto final. La secuencia de próxima generación en los últimos 5 años ha sido utilizada ampliamente para para describir a la microbiota de los alimentos permitiendo un análisis más detallado de la diversidad microbiana en comparación con métodos cultivos dependientes. (Nam et al. 2021)

El uso de la secuenciación de próxima generación y técnicas de biología molecular ha hecho que la microbiología de alimentos haya revolucionado rápidamente para analizar la diversidad microbiana presente en matrices de alimentos, produciendo resultados mucho más claros y de alto impacto que las investigaciones dependientes de cultivos. (Marino et al., 2020).

También se menciona que la reconstrucción de genomas para estudiar los genomas microbianos sin aislamiento permite descubrir especies desconocidas y su potencial actividad que pueden contribuir al flavor en quesos, determinar genes de resistencia, genes que codifican bacteriocinas, entre otros. (Ercolini, 2020). Entender el metagenoma de los quesos es útil para mejorar las características sensoriales, extender la vida útil, mejorar la calidad del producto e inocuidad. (Salazar el al., 2018)

Dada la importancia de los métodos de biología molecular como la PCR y la secuenciación de próxima generación y poder contribuir en el desarrollo del conocimiento en la determinación de la microbiota deteriorativa en quesos amasados, que son la identidad de la Provincia del Carchi, se utilizará este enfoque en el desarrollo del proyecto de investigación. Algunos estudios han sido realizados utilizando metagenómica y quesos, que se muestran a continuación:

Salazar et al. (2018) investigaron el metagenoma de queso gouda pasteurizado y no pasteurizado utilizando la secuenciación del gen 16S, rDNA. Utilizaron 90 muestras de AND como moldes para realizar la PCR, se utilizó la región V4 del gen 16r rDNA, se utilizó la tecnología Illumina para la secuenciación. Los organismos dominantes de los quesos estudiados fueron *Bacillaceae*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*,

Streptococcus, y *Staphylococcus*. También se detectaron *Brachybacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Yersinia, Klebsiella* y *Weisse*. Los resultados de este estudio fueron importantes ya que determinaron la microbiota asociada a los quesos Gouda y como el microbioma juega un rol importante en la calidad e inocuidad.

Marino et al. (2020) realizaron el estudio denominado perfil metagenómico de diferentes tipos de quesos italianos Mozzarella alto en humedad, con el objetivo de estudiar la composición de la microbiota mediante metodología de NGS para lo cual secuenciaron el gen 16S rRNA, utilizando los primer primers (16S-341F 5′-CCTACGGGNGGCWGCAG-3′ y 16S-805R 5′-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3′), las librerías fueron secuenciadas con tecnología Ilumina con extremos emparejados y una longitud de 300 pb. Determinaron las posibles rutas de la diversidad bacteriana, teniendo en cuenta los diferentes tipos de leche utilizado en los procesos de fabricación (leche de búfala y vaca), tipo de acidificación (natural o por cultivos starter seleccionado), estatus de certificación (con o sin certificación) y puntos de muestreo (minorista local o masivo). Entre los resultados obtenidos mostraron que los quesos Mozzarella elaborados con leche de vaca y búfala acidificadas con cultivos comercial estuvieron dominadas *Streptococcus thermophilus*, mientras que los acidificados con cultivos naturales por *L. delbrueckii subsp. bulgaricus, L. helveticus* y *S. thermophilus*, sin embargo, varias especies de bacterias ácido lácticas no starter fueron frecuentemente detectadas. La diversidad microbiana en los quesos Mozzarella fue mucho mayor que en los quesos elaborados con leche de búfala. Una alta prevalencia de especies deteriorativas y psicrófilas fueron observada en muestras provenientes de ventas al por mayor sugiriendo una mayor exposición a refrigeración y un mayor tiempo de consumo desde su producción lo cual afecta significativamente la diversidad de la microbiota.

Dimov et al. (2021) llevaron a cabo el estudio metagenómico basado en NGS de cuatro quesos verdes búlgaros tradicionales de Tcherni Vit. Este estudio estuvo basado en la secuenciación metagenómica de próxima generación (NGS) del gel 16S, región V3–V4, y ITS2, utilizando la tecnología illumina HiSeq 2 × 250 bp paired end reads y obtener una visión de la composición microbiana. Los resultados mostraron un rica microbiota compuesta por un promedio de 120 eubacterias y 16 especies de hongos. Los firmicutes estuvieron representados por *Strepotococcaceae*, *Lactobacillaceae* y *Staphylococcaceae* mientras que las *Actinobacteria*s estuvieron representadas principalmente por el género *Brevibacterium* y *Corynebacterium.* Las Proteobacteria que fueron detectadas estuvieron en baja cantidad. Las halófilas fueron principalmente *Cobetia* y *Psychrobacter* . Con referencia a los hongos, el 99.99% pertenecieron a la división *Ascomycota*, representados casi por igual por las familias *Eurotiomycetes* (exclusivamente por *Penicillium roqueforti*), *Saccharomycetes* (principalmente por los géneros *Debaryomyces*, *Pichia*, *Candida* y *Kluyveromyces*) y *Sordariomycetes* (principalmente por *Scopulariopsis flava*). Los autores encontraron microbiota

potencialmente benéfico con potencial para inhibir el crecimiento de especies de bacterias patógenas, así como, neutralizar la posible presencia de micotoxinas.

Samelis et al. (2021) realizaron la caracterización microbiológica y metagenómica de un queso ácido fresco tipo Galotyri para lo cual analizaron 5 batches con un pH 4.1 para el conteo total de microorganismos selectivo y 150 aislados presuntivos de bacterias ácido-lácticas fueron caracterizados bioquímicamente. Adicionalmente los batches fueron sujetos al análisis de secuenciación del gen 16S rARN, región V2–4–8 y la región hipervariable V3–7–9. La secuenciación de amplicones de 400 pb fue realizado utilizando la tecnología Ion Torrent PGM por CeMIA SA. Las bacterias ácido lácticas prevalecieron en las muestras seguido por las levaduras. Las *Enterobacteria*, *Pseudomonas* y *Staphylococci* estuvieron presente en un número <100 células viable /g de queso. Los starter *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* fueron los más abundantes, seguidas por los no starter *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, y *Leuconostoc mesenteroides*, cuya frecuencia de aislamiento fue dependiente de los batches. *Lactococcus lactis* fue aislado esporádicamente, excepto en un batch. Por otro lado, *Lactococcus lactis*, *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Salinivibrio* y *Shewanellaceae* fueron detectadas con abundancia relativa en cultivo independiente a pesar del hecho que el conto viable en los quesos fue bajo o no detectado. Los estudios metagenómicos confirmaron la presencia de S. thermophilus y Lb. Delbrueckii. El estudio demostró que el alimento es rico en cepas de BAL autóctonas no starter, que merecen investigación biotecnológica.

Xu et al. (2021) estudiaron la microbiota en queso Cheddar identificando y confirmado bacterias que causan grietas en su tiempo de vida útil, aplicando monoazida de propidium combinado con el secuenciamiento del gen 16S rRNA, región V4, secuenciado en 5 corridas por separado en un secuenciador Ion Torrent PGM, qPCR, identificación de los aislados y fabricación a nivel de planta piloto de los quesos. Fue estudiada la leche como una fuente de microorganismos deteriorativos después de ser tratada por UHT, se observa un incremento del número total de bacterias incluyendo 68 veces más del género *Thermus*, aunque estas no estuvieron asociadas a la formación de grietas. La leche utilizada para hacer quesos que desarrollaron grietas contenía un bajo número de bacterias totales, mayor diversidad alfa, mayor proporción *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus* y *Clostridium*, siendo los primeros quienes incrementaron significativamente con el transcurso de la vida útil, en particular *Limosilactobacillus* (*Lactobacillus*) *fermentum* quien estuvo en proporciones importantes en los quesos que presentaron grietas como defectos. Los quesos desarrollados a nivel de planta piloto desarrollaron grietas cuando fueron inoculados con cepas de of *L. fermentum* y otras bacterias ácido lácticos heterofermetativas o consorcios bacterianos no cultivados provenientes de leche pasteurizada.

La secuenciación de alto rendimiento es utilizada para estudiar los cambios de la microbiota de diferentes tipos de quesos durante el procesamiento, composición, vida útil y propiedades funcionales, el microbiona provee características únicas para cada tipo de queso que debe ser investigado (Nam et al. 2021). Estos análisis de secuenciamiento por metataxonomica fueron utilizado para caracterizar las comunidades microbianas de quesos del mediterráneo oriental y china para mapear el origen microbiano asociadas a cada región, de tal manera que puede utilizar a los metagenomas como un marcador de origen de los quesos (Kamilari et al., 2022). La revisión de estos dos trabajos son mostrados a continuación.

Kamilari et al. (2022) utilizaron a la metagenómica como una herramienta para caracterizar las comunidades microbianas de quesos del mediterráneo oriental y mapear el origen microbiano asociadas a cada región. Para ello secuenciaron en gen 16S rRNA región V3 con el primer 5´-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTAT AAGAGACAG-3´ y región V4 con el primer 5´-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3´ utilizando la tecnología de Illumina

Xue et al. (2018) estudiaron la diversidad bacteriana en quesos Rushan chino de diferentes regiones geográficas, para lo cual aplicaron técnicas de secuenciación de alto rendimiento, seleccionaron tres regiones a estudiar Weishan, Eryuan y Jianchuan. La microbiota de estas tres regiones geográficas fue distinta en términos de composición taxonómica y abundancia. El análisis discriminante linear del tamaño de efecto determino que las especies taxonómicas en los quesos Rushan provenientes de Weishan estuvieron compuestos por Lactobacillus pentosus, Lactobacillus crustorum, Lactobacillus brevis, Leuconostoc mesenteroides y Pediococcus pentosaceus, en los quesos Rushan provenientes de Aryuan fueron Lactobacillus kefiranofaciens, Lactococcus lactis, Acetobacter pasteurianus y Moraxella osloensis en comparación con Acinetobacter que fue más abundante en las muestras de queso Rushan provenientes de Jianchuan. Este estudio contribuye a caracterizar la diversidad microbiana de los quesos Rushan chino provenientes de diferentes regiones geográficas.

16. Marco Metodológico

Descripción del área de estudio

El área de estudio es la provincia del Carchi, tal como se muestra en la Figura 1, donde se observar la ubicación de los cantones Montufar, Huaca, Tulcán y Espejo donde se fabrican los quesos mencionados en la Tabla 3. Limita al norte con la República de Colombia; al Sur y Oeste con la Provincia de Imbabura; al Este con la Provincia de Sucumbíos y al Oeste con la Provincia de Esmeraldas. La provincia del Carchi tiene 172.828 habitantes, distribuidos en Tulcán 92.375, Montúfar 29.590,

Bolívar 15.677, Espejo 14.522, Mira 12.727 y Huaca 7.937 (INEC, 2023).

Enfoque

La presente investigación se realizará con un enfoque cuali-cuantitativo debido a que se obtendrán resultados referentes a la cuantificación de microorganismos deteriorativos, parámetros fisicoquímicos, sensoriales y de textura, así mismo se identificarán género y especie de los microorganismos deteriorativos presentes. Los datos serán analizados estadísticamente para responder a los objetivos planteados, se tratarán de establecer patrones de distribución de los microorganismos y las características fisicoquímicas, sensoriales y de textura, lo que permitirá tener una perspectiva acerca de los microorganismos responsables del deterioro y de las otras características estudiadas en los quesos frescos amasados elaborados en la provincia del Carchi.

Figura 1. Mapa de la ciudad del Carchi.

Fuente: Tulcán OnLine (2023)

Tipo de investigación

La investigación es de tipo experimental ya que se realizarán pruebas o ensayos para establecer la cantidad y tipos de microorganismos deteriorativos presentes en los quesos amasados y a su vez determinar los efectos a nivel fisicoquímico, sensorial y de textura, se tomará una muestra al azar para poder hacer inferencia de la población de quesos que se fabrican en la provincia del Carchi. La investigación estará diseñada mediante un conjunto de ensayos que permitirá

establecer los valores de cada uno de los parámetros en estudio. También tendrá un enfoque exploratorio debido a que no existen la cuantificación de microorganismos deteriorativos, identificación a nivel de especie y género, y efecto sobre las propiedades fisicoquímicas, sensoriales y de textura en quesos frescos amasados.

Métodos

1. Se realizará la cuantificación presuntiva de bacterias aeróbicas mesofilas, bacterias proteolíticas, bacterias lipolítica, coliformes totales, *Pseudomonas spp*, *Enterococcus spp, Micrococcus spp*, Bacilos ácidos lácticos mesófilos, Bacilos ácidos lácticos termófilos y Streptococcus ácidos lácticos termófilos, *Clostridium spp* y *Aeromonas spp* de acuerdo con lo indicado por Altieri et al. (2005), Mohamed, Hegazy & Mahgoub, (2013), Mastromatteo et al., (2014), Bassi et al., (2020) y Quintieri et al., (2021) para la cual se tomaran 10 gramos de queso, serán homogenizados en citrato de sodio al 2% en un stomacher, se realizarán diluciones seriadas en agua peptona mediante la siembra en superficie en distintos tipos de agares bajo las siguientes condiciones:

1.1. Aerobios mesófilos en Agar Plate Count (PCA) a 37 ^{o}C por 48 horas.

1.2. Bacterias proteolíticas en Agar Plate Count con leche descremada (Plate Count Skimmed Milk Agar) a 30 ^{o}C por 120 horas.

1.3. Bacterias lipolíticas en Agar Trybutyrin(Trybutyrin agar) a 30 ^{o}C por 72 horas.

1.4. Coliformes totales/E. coli en agar coliformes cromogénico (Chromogenic Coliform Agar) con suplemento selectivo (C.F.C) a 25 ^{o}C por 48 horas.

1.5. Enterococcus en agar Slanetz y Bartley con 50 mg suplemento TTC a 37 ^{o}C por 48 horas.

1.6. Micrococcus en agar Manitol Sal a 32 ^{o}C por 72 horas.

1.7. Bacilos ácidos lácticos mesófilos y bacilos ácidos lácticos termófilos en Agar DeMan, Rogosa y Sharpe a 35 ^{o}C por 48 horas y 42 ^{o}C por 48 horas en condiciones anaeróbicas.

1.8. *Streptococcu*s ácido lácticos en agar M17 35 ^{o}C por 48 horas

1.9. *Clostridium spp* en agar Reinforced Clostridial a 35-37°C for 40-48 horas en condiciones anaeróbicas.

1.10. *Aeromonas spp* en agar Aeromonas medio base suplementado con 2.5 mL de suplemento selectivo de ampicilina.

2. Se realizará la identificación bioquímica de acuerdo con la metodología descrita por Samelis et al., (2021) para lo cual a los aislados de bacterias ácido lácticas presuntivos se confirmarán en principio por las reacciones de catalasa negativa y

gran positivas utilizando la prueba de peróxido de hidrogeno al 3% y KOH al 3% respectivamente y serán agrupados al criterio taxonómico bioquímico base a nivel de género y especie, estas pruebas serán incubadas a 25 ^{o}C. así mismo el agrupamiento se basará en la morfología celular utilizando un microscopio de contraste de fases de los presuntivos que crecieron en agar MRS o en caldo cerebro corazón, producción de CO2 a partir de glucosa, producción de amonio a partir arginina, crecimiento en caldo MRS con 4 y 6,5% de cloruro de sodio, formación de limo a partir de glucosa y perfil de fermentación utilizando el de identificación API 50 CHL.

Para el caso de la identificación de los asilados de bacterias Gram negativas, se realizará una tinción de Gram y la prueba de oxidasa colocando a las colonias presuntivas en un papel de filtro al cual se añadirá unas gotas de solución de tetramethyl-p-phenylenediamine al 1%. Posteriormente se seleccionarán las colonias Gram negativas, oxidasas positivas o negativas para su identificación tentativa mediante el kit API 20E siguiendo las instrucciones del fabricante y los códigos del manual de identificación.

3. Se identificará a las bacterias deteriorativas mediante kits de PCR Real Time Tecnología Multiplex de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando un termociclador tiempo real, así mismo, se realizará la extracción de ADN y secuenciación, para la extracción de ADN se tomarán 50 mg de las muestras, serán incubados durante 90 min a 65 °C con 600 µL de tampón CTAB, 30 µL de proteinasa K y 2 µL de solución de RNasa, posteriormente serán centrifugados para colectar 300 µL del lisado que será utilizado para la extracción total de ADN, el ADN será extraído utilizando un Kit de extracción. La diversidad bacteriana será obtenida mediante la preparación de librerías y secuenciación del gen 16S rRNA, siguiendo dos pasos de amplificación: una paso inicial de amplificación por PCR utilizando primers específicos del locus 16S (16S-341F 5′-CCTACGGGNGGCWGCAG-3′y 16S-805R 5′-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3′) y subsecuente amplificación integrando el dominio de unión de la ceda de flujo relevante (5′-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-3′para el primer forward y 5′-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-3′para el primer reverse. Marino et al., (2019) y Bassi et al., (2020).

Así mismo a los aislados presuntivos de bacterias ácido lácticas (BAL) agrupados en base a su biotipo y características bioquímicas serán confirmadas por la secuenciación del Gen 16S rRNA para lo cual los aislados presuntivos serán subcutivados por 12 horas a 25 °C, 1.5 mL de los cultivos será utilizado para el proceso de extracción de ADN, el pellet que contiene el ADN de cada aislado de BAL será resuspendido en 100 µL de buffer TBE (pH 8.0, 50 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA) y permanecerán a 20 °C hasta su análisis.

La región V1-V9 del gen 16S rRNA (ca. 1500 bp) será amplificada utilizando el primer universal bacteriano 8F (5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´) y 1492R (5´-CGGTTACCTT GTTACGACTT-3´). La reacción de amplificación será preparada utilizando el kit PCR de amplificación de acuerdo a las instrucciones del fabricante

utilizando 50 ng del templado de ADN en un volumen de reacción de 50 µL y se utilizará un termociclador de punto final bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, annealing a 58 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 1 min seguido por una extensión final a 72 °C por 2 min. Los productos de PCR serán separados en geles de agarosa al 1.2% teñido con Sybr Green y purificados utilizando el Kit de extracción del gel. Se realizará la secuenciación de Sanger, del producto amplificado usando el primer universal bacteriano 8F (5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´) y 1492R (5´-CGGTTACCTT GTTACGACTT-3), se realizará por servicio en Macrogen Korea. El análisis taxonómico será llevado a cabo utilizando el programa BLAST del GenBnak perteneciente al NCBI. (Sameli et al., 2021)

Para el caso de los aislados presuntivos de las Enterobacterias la identificación será realizada utilizando la región consenso intergenica repetitiva enterobacterial (ERIC) y amplificación del gen 16S rRNA. El ADN será extraído de la misma forma que los aislados presuntivos de BAL. El templado de ADN será amplificado utilizando los primers ERIC1R (5′-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3′) and ERIC2 (5′-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3′). El volumen de reacción será de 25 µL que contendrán 50 ng de ADN molde, 2 U de taq polimerasa, 200 µM de cada dNTP, 1.5 µM de MgCl2 and 1 mM de cada primer. Las condiciones de la PCR en termociclador punto final serán: desnaturalización inicial 96 °C for 5 min, 30 ciclos de 95 °C por 60 s, 52 °C por 60 s y 72 °C por 7 min, y una extensión final a 72 °C por 10 s. Después de la amplificación, 5 µL de cada producto de la reacción será sujeto a electroforesis en geles de agarosa al 2% teñido con Sybr Green en buffer TBX 0.5X, los aislados que se diferencien en una o más bandas serán consideradas como ERIC tipos diferentes. Al menos un aislado de cada ERIC tipo será sujeto a una amplificación parcial del gen 16S rRNA utiizando los primers P1V1 (5′-GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC-3′) y P4V3 (5′-ATC TCA GCA TTT CAC CGC TAC-3′). Los productos de la PCR serán secuenciados por servicio en Macrogen Korea, para determinar la cercanía relativa de los aislados, estas secuencias serán alineadas con las cepas tipos del GenBank utilizando al algoritmo Blast. (Maifreni et al., 2013)

4. En la cuantificación de los parámetros fisicoquímicos se determinarán humedad, actividad de agua, pérdida de peso, pH y color, de acuerdo con lo indicado por Barukc̆ic´ et al., (2020) y por Quintieri et al. (2021).

5. Para la determinación de las características sensoriales de los quesos amasados se entrenará un panel de jueces expertos en evaluación sensorial de quesos, tomando como referencia la técnica de Análisis Descriptivo Cuantitativo (ADC) indicados en la Norma ISO 22935-1:2023.

Posteriormente se utilizarán métodos recomendados para la evaluación sensorial, en el que se detallan las técnicas para evaluar las propiedades sensoriales de apariencia, textura y flavor de los quesos.

Para reclutar los miembros del panel sensorial de quesos, se organizará un curso de entrenamiento de jueces sensoriales especializados en quesos, de los participantes

se seleccionará dieciséis jueces que serán los encargados de evaluar las muestras de los quesos amasados que serán utilizados en la investigación, el proceso de entrenamiento del panel consta de las siguientes etapas:

- Inducción

-Capacitación y talleres prácticos

* Características de apariencia.

* Características olfato /gustativas.

* Características de textura.

Se realizará una inducción completa sobre el tema de evaluación sensorial en alimentos, con énfasis en los productos lácteos, descriptores, características y competencias de los evaluadores, técnicas de evaluación y de forma complementaria se realizará una prueba diagnóstica para determinar las capacidades de los evaluadores.

En la capacitación y talleres prácticos se capacitará al panel para determinar características sensoriales de apariencia, características olfato gustativas, características sensoriales de textura y la estructuración y elaboración de las fichas de descripción sensorial de los quesos, para determinar los cambios generados en los quesos durante el tiempo de vida útil.

Previo a los ensayos de las muestras de quesos amasado serán acondicionadas a temperatura ambiente 20°C a 22°C dos horas antes de las pruebas sensoriales. Los quesos serán presentados en bandejas, una unidad entera y muestras cortadas en forma de paralelepípedo 1,5 x 1,5 x 5 cm como se sugiere en la guía de evaluación sensorial. La evaluación de las muestras se realizará por triplicado para cada productor de queso amasado.

En análisis de textura instrumental será realizado con un Texturómetro 4EZ-SX Short Model. Las muestras serán acondicionadas a temperatura ambiente 20°C - (+- 2°C) dos horas antes de los análisis, el tamaño de las muestras de queso será de dos centímetros cúbicos. Los datos se obtendrán con un ordenador conectado a la prensa por medio de una tarjeta que convierte la información analógica en información digital. Las pruebas se realizarán por triplicado. Los parámetros a ser analizados serán los siguientes:

*Dureza

*Gomosidad

*Elasticidad

*Masticabilidad

*Friabilidad

Los datos obtenidos de los parámetros en estudio serán tabulados y analizados mediante estadística descriptiva e inferencial, de acuerdo con los indicado en el componente estadístico de la investigación (Punto 19). No hay consideraciones bioéticas ya que en el estudio no hay intervención ni ensayos con seres humanos

17. Las variables

La variable dependiente es el tiempo de vida útil, tiempo en el cual el queso amasado mantiene las características idóneas para ser consumido, es importante ya que determina el tiempo en el cual puede el alimento puede ser consumido como acompañante de distintos tipos de platos. Una transcurrido el tiempo de vida útil, los quesos deben ser recogidos desde los puntos de comercialización para ser utilizado como alimento para animales, ser desechados en el ambiente creando contaminación en suelos y cuerpos de aguas, perdida económicas, inseguridad alimentaria y nutricional, cortas distancias de distribución, En el caso de los quesos amasados el tiempo de vida útil es de 20 días.

Las variables independientes son los cambios en el microbiona, microbiota y producción de enzimas, debido al consumo de nutrientes y al metabolismo microbiano, que conllevan a que los quesos amasados, cambien el pH, la humedad, la pérdida de peso, actividad de agua, atributos sensoriales y de textura. Una vez ocurridos los cambios mencionados, estos alimentos no sean comestibles. Por esta razón es importante cuantificar e identificar a los microorganismos deteriorativos tanto por métodos dependiente de cultivos, por métodos moleculares y metagenómica, así como los cambios antes mencionados que producen.

18. Operacionalización de las variables de la investigación

Tabla 2. *Matriz de operacionalización de las variables*

Variable	Concepto	Dimensiones	Indicadores
Independiente.	Vida útil	Tiempo	Días

Dependiente.	Calidad microbiológica	Cuantificación de microorganismos deteriorativos: * Bacterias aeróbicas mesofilas. * Bacterias proteolíticas. * Bacterias lipolíticas. * Coliformes totales. * Pseudomonas spp. * Enterococcus spp. * Micrococcus spp. * Bacilos ácidos lácticos mesófilos. * Bacilos ácidos lácticos termófilos. * Streptococcus ácidos lácticos termófilos. * Clostridium spp. * Aeromonas spp	Unidades formadoras de colonias/gramo (UFC/g)
	Identificación bioquímica de microoganismos de deriorativos	Microorganismos identificados	Números géneros y especies identificados
	Identificación molecular de microoganismos de terioriativos	* Microorganismos identificados. * Metagenomas	* Números géneros y especies identificados. * Número de metagenomas.
	Calidad fisicoquímica	Cuantificación de: * Humedad. * Actividad de agua (aw) * Pérdida de peso. * pH. * Color	* % de humedad. * aw (valores entre 0-1). % de peso perdido. * pH (valores entre 1-14) * L, a, b

Calidad Sensorial	**Apariencia:** *Forma *Aspecto del color *Aspecto de la pasta **Características olfato gustativas:** *Intensidad de olor *Intensidad de aroma *Tipicidad de olor y aroma *Sabor dulce *Sabor ácido *Sabor salado *sabor amargo *Persistencia *Regusto **Textura** *Elasticidad *Firmeza *Adherencia *Solubilidad *Impresión de humedad *Cremosidad *Granulosidad *Friabilidad *Masticabilidad.	Número de quesos que cumplen con el perfil sensorial del queso amasado.
Parámetros de textura	*Dureza *Gomosidad *Elasticidad *Masticabilidad *Friabilidad	*Newton *Newton *Newton *Newton *Newton

19. Componente estadístico de la investigación

En la provincia del Carchi existen 13 empresa dedicadas a la fabricación de quesos amasados de acuerdo con la información levantada en el año 2021, los cuales se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Empresas dedicadas a la fabricación de quesos amasados en la provincia del Carchi

Empresa	Tipo de producto	Marca del Producto	Ubicación
Carmita	Queso Amasado	Queso fresco carmita	Montufar

Lácteos Jhonny	Queso Amasado	Queso Lácteos Jhonny	Huaca
La Favorita	Queso Amasado	Queso La Favorita	Montufar
La Delicia	Queso Amasado	Queso San Gabriel	Montufar
Liderlac	Queso Amasado	Queso Liderlac	Montufar
Caserito	Queso Amasado	Queso Caserito	Tulcán
Montulac	Queso Amasado	Queso montulac	Montufar
Villareal	Queso Amasado	Queso Villareal	Tulcán
San Pedro	Queso Amasado	Queso San Pedro	Montufar
Q' Señor	Queso Amasado	Queso Q' Señor	Espejo
Prodalsam	Queso Amasado	Don Queso	Montufar
Andreita	Queso Amasado	Queso Andreita	Montufar
San José	Queso Amasado	Queso San José	Montufar

El muestreo se realizará teniendo en cuenta que las variables dependientes a ser medidas son cuantitativas y conociendo que el total de las plantas son 13, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$n = \frac{\mathrm{N} * (\frac{\mathrm{Z}\alpha}{2})^2 * \sigma^2}{(N-1)e^2 + (\frac{\mathrm{Z}\alpha}{2})^2 \sigma^2} + \cdots$$

Donde:

N= Tamaño total de la población
$Z_{\alpha/2}$= Estadístico Z, asociado al nivel de significancia, en este caso se utilizará 0.05, entonces es el Z correspondiente a un nivel de significancia de 0.975.
α= La desviación estándar
e= Error estándar

El cálculo del tamaño de muestra realizado con la formula anterior, da un valor de 3,15. Para tener una mayor representatividad en los datos, se tomarán 5 muestras del total de universo.
Como se mencionó en el apartado referente al marco teórico, el tiempo de vida útil es de 20 días, los cambios microbiológicos, sensoriales y fisicoquímicos se evaluarán cada 6 días, desde el inicio de la adquisición de las muestras, en consecuencia, se analizan los días 0, 6, 12, 18 y 24 días. En el transcurso de la investigación las muestras serán almacenadas en condiciones de refrigeración a 4 ^{o}C.

Las muestras serán adquiridas por triplicado en los días ya mencionado y por planta de procesamiento muestreada se tomarán 15 muestras de 250 gramos. El total de muestras de las 5 plantas procesadoras de queso en estudio serán de 45.

Las muestras serán adquiridas en las plantas de procesamiento el mismo día de producción, serán trasladas a las instalaciones de los Laboratorios de Microbiología, Análisis Sensorial y de Análisis de Alimentos de la Universidad Politécnica Estatal del Carchi para su análisis.

Los datos obtenidos serán tabulados, se analizarán mediante estadística descriptiva y se obtendrán estadísticos como la media, la varianza y la desviación estándar y serán presentados en tablas. Así mismo, se realizarán comparaciones entre las medias de las muestras provenientes de las distintas plantas con la finalidad de determinar diferencias estadísticas entre los parámetros evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA). Una vez aplicado el ANOVA, se utilizará el estadístico de diferencia mínimas significativa, para discriminar cuales de las medias son distintas en los parámetros de estudio. Se utilizará un intervalo de confianza al 95% y los ensayos serán realizados por triplicado. Los valores serán presentados como la media más o menos la desviación estándar. Los análisis estadísticos serán llevados a cabo mediante el programa RStudio versión 2022.02.1+461

20. Impactos esperados

Matriz de impactos	
Social	La industria de producción de quesos amasados del Carchi al contar con la identificación de los microorganismos deteriorativos, responsables de la pérdida de alimentos a lo largo de la cadena de suministro, desde la producción hasta el consumidor final. Permitirá aumentar la calidad del producto y alargar su vida útil, esto propenderá en el reconocimiento del producto, abriendo nuevos mercados a nivel nacional e internacional, reactivando la economía de la provincia y a su vez incrementando la calidad de vida de los carchenses. Por otra parte, la transferencia tecnológica del conocimiento generado de esta investigación será realizada mediante proyectos de vinculación con la sociedad, en donde se darán a conocer los resultados y conclusiones mediante capacitaciones y seminarios a los productores de quesos amasados de la provincia del Carchi.
Científico	El aporte científico de la investigación será la identificación de los microorganismos específicos que actúan en el deterioro del queso amasado de la provincia del Carchi, puesto que en la actualidad se desconoce de estos microorganismos que afectan al proceso de producción, con la ejecución de la investigación se incentivara en los productores de estos alimentos al desarrollo de estrategias

	efectivas de control de microorganismos deterioradores en la industria alimentaria. Esto incluye la formulación de conservantes naturales, el diseño de nuevos envases con compuestos bioactivos, la optimización del proceso de producción de queso amasado y la investigación de métodos de otros métodos de conservación.
Económico	Mediante la identificación de los microorganismos deteriorativos del queso amasado de la provincia del Carchi, se extiende la vida útil del producto, evitando la generación de desechos, lo cual se traduce en mayor rentabilidad para los productores, así mismo, en la producción de queso amasado se utilizarán estrategias específicas para controlar la proliferación de microorganismos deteriorativos, mejorando la calidad del producto abriendo nuevos mercados a nivel nacional e internacional posicionando al queso amasado como un producto de identidad de la provincia y dando una mayor dinámica a la economía de la provincia.
Político	El desarrollo de la investigación contribuirá a mantener la seguridad y soberanía alimentaria y nutricional en niños y gran parte de la población que consumen a estos tipos de alimentos, al potencializar las características del queso amasado y mantenido dentro de la cultura carchense el consumo de este producto, y a la vez por medio de este alimenta dar a conocer la cultura y tradición carchense. La ejecución de investigación permite garantizar alimentos inocuos, nutritivos y accesibles a la población como parte del derecho a la salud establecido en la Constitución Nacional del Ecuador (2008) en el Artículo 32; también, la inocuidad alimentaria es establecida en la Ley Orgánica Del Régimen de la Soberanía Alimentaria (LORSA) (2010).
Actividad I+D+i	La investigación es una indagación original y planificada cuyo objetivo es generar nuevo conocimiento que contribuya a una mejora significativa en el proceso de producción del queso amasado de la provincia del Carchi del cual se pretende: Cuantificar la microflora deteriorativas de los quesos amasados. Identificación molecular de la microflora deteriorativa. Cuantificar los cambios fisicoquímicos, sensoriales y de textura.
	Mediante el desarrollo de la investigación se contribuirá a los siguientes ODS: ODS 1: Fin de la pobreza.

ODS	ODS 2: Hambre cero. ODS 3: Salud y Bienestar. ODS 9: Industria, innovación e infraestructura. ODS 12: Producción y consumo responsable. ODS 13: Acción por el clima. ODS 14: Vida submarina. ODS 15: Vida de ecosistemas terrestres.
Otro (especifique)	La investigación contribuirá en la educación de los estudiantes de la carrera de alimentos identificando los microorganismos que afectan al proceso productivo del queso amasado, con estos conocimientos específicos los estudiantes realizaran propuestas innovadoras de nuevos procesos productivos. Así mismo con la implementación del Laboratorio de Microbiología Molecular se pretende realizar otras investigaciones como la identificación e interacción de microorganismos deteriorativos en frutas, derivados de frutas, carnes y derivados cárnicos, lácteos y derivados lácteos, entre otros. También se pueden abordar el almacenamiento de material genético como un banco de especies utilizadas como alimentos con altos contenidos de nutrientes que se van perdiendo por su bajo consumo y desconocimiento, realizar estudios acerca de genes y el clonaje molecular para la producción de metabolitos de interés para la industria de alimentos, entre otros estudios que involucren el estudio de genes.

21. Transferencia de resultados

Una vez finalizada la investigación y conociendo los microorganismos deterioradores de queso amasado, estos resultados primeramente serán socializados con los productores de este alimento para que evalúen el efecto de los microorganismos en la calidad e inicien con estrategias que minimicen el efecto deteriorador y maximice la vida útil del producto.

Con los resultados se escribirán artículos científicos para ser publicados en revistas de alto impacto y a la vez la participación en congresos científicos nacionales e internacionales para una mayor difusión de los resultados sobre todo a nivel internacional para un posicionamiento de la UPEC como una universidad que genera conocimiento para la solución de problemáticas de su zona de influencia.

También se hará uso de los medios digitales con los que cuenta la UPEC para que los resultados lleguen a los diferentes sectores del país, en este contexto, los estudiantes de la carrera de Alimentos conocerán de la problemática encontrada con la investigación y las posibles soluciones, para luego ser plasmadas en un proyecto de vinculación con la sociedad donde los estudiantes difundirán los conocimientos adquiridos a los productores de queso amasado de la provincia del Carchi, la utilización de estas diferentes estrategias para la transferencia de conocimientos los resultados no quedaran desapercibidos en la sociedad, ubicando a la Universidad Politécnica Estatal del Carchi como una institución que transforma sociedades por medio del conocimiento.

Productos de investigación

Tipo de producto	Cantidad
Artículos científicos publicados en revistas SJR (Q1 o Q2) o WOS (Factor de impacto igual o superior a 2)	2
Artículos científicos publicados en revistas SJR (Q3 o Q4) o WOS (Factor de impacto inferior a 2)	1

22. Cronograma

El cronograma para la realización de las actividades se muestra a continuación.

No	Actividad	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	Revisión bibliográfica																								
2	Compras de equipos, reactivos e insumo																								
3	Calibración de equipos y validación de métodos																								
4	Cuantificación de bacterias deteriorativas presuntivas durante el tiempo de vida útil de los quesos amasados por métodos de siembra en superficie.																								
5	Identificación de bacterias deteriorativas durante el tiempo de vida útil de los quesos amasados por método bioquímicos.																								
6	Identificación de bacterias deteriorativas durante el tiempo de vida útil de los quesos amasados por métodos moleculares.																								
7	Cuantificación de parámetros fisicoquímicos durante el tiempo de vida útil de los quesos amasados.																								
8	Determinación de las características sensoriales y de textura durante el tiempo de vida útil de los quesos amasados.																								
9	Análisis e interpretación de resultados																								
10	Redacción de artículos científicos y aceptación por revista.																								
11	Elaboración de informe final del proyecto																								

23. Recursos y presupuesto

Tabla 4. *Presupuesto para el desarrollo de la investigación*

ACTIVIDADES	RECURSOS	PARTIDA	CPC	CANTIDAD	PRESUPUESTO ($)		Fecha de ejecución
					PRECIO UNITARIO ($)	TOTAL	
1.Cuantificación de bacterias deterioriativas presuntivas durante el tiempo de vida útil de los quesos amasados por métodos de siembra en superficie.	Agar Plate Count (Envase de 500 g).	530829	35290107	1	100.91	100.91	abr-24
	Agar Plate Count with Skimmed Milk (Envase de 500 g).	530829	35290107	1	125.16	125.16	abr-24
	Agar Trybutyrin (Envase de 500 g).	530829	35290107	1	111.11	111.11	abr-24
	Agar Chromogenic Coliform (Envase de 500 g).	530829	35290107	1	477.43	477.43	abr-24
	Aero Pseudo Selective Agar (GSP Agar)	530829	35290107	1	149	149	abr-24
	Agar Slanetz y Bartley (medio base) (Envase de 500 g).	530829	35290107	1	500	500	abr-24
	Suplemento TCC 1% (1 caja con 10 viales de vidrio de 22±0.25 x 55±0.5 mm. con tapón de plástico.).	530829	35440.01.1	1	100	100	abr-24
	Agar Manitol Sal (Envase de 500 g).	530829	35290107	1	82.71	82.71	abr-24

	Agar DeMan. Rogosa and Sharpe (Envase de 500 g).	530829	35290107	1	338.34	338.34	abr-24
	Agar M17 (Envase de 500 g).	530829	35290107	1	99	99	abr-24
	Agar Sabouraud Dextrose with Chloramphenicol (Envase de 500 g).	530829	35290107	1	218.69	218.69	abr-24
	Agar Reinforced Clostridial (Envase de 500 g).	530829	35290107	1	91.91	91.91	abr-24
	Agar Kanamycin Aesclulin Azide (KAA) (Envase de 500 g).	530829	35290107	1	492.65	492.65	abr-24
	Suplemento Selectivo de Ampicilina (1 caja con 5 viales de vidrio de 1 mL) tapón de plástico.).	530829	35440.01.1	1	30	30	abr-24
	Agua peptona (Envase de 500 g).	530829	35440.01.1	2	79.96	159.92	abr-24
	Citrato de sodio (Envase de 500 g).	530829	239991211	1	48.02	48.02	abr-24
	Caldo DeMan. Rogosa and Sharpe (Envase de 500 g).	530829	35290.08.2	1	114.27	114.27	abr-24
	Caldo infusion cerebro corazon (Envase de 500 g).	530829	3529010746	1	85.59	85.59	abr-24
	Caldo M17 (Envase de 500 g).	530829	35440.01.1	1	95.78	95.78	abr-24
	Incubadora de CO2	840104	441802011	1	8085	8085	abr-24
2. Identificación de bacterias deteriorativas durante el tiempo de vida útil de los quesos amasados por método bioquímicos	Solución de glicerol anhidro (Envase de 500 mL)	530829	3525011217	1	60	60	abr-24
	Solución de peroxido de hidrogeno al 30% (Envase de 500 mL)	530829	342800011	1	31	31	abr-24
	Caldo base rojo fenol (Envase de 500g)	530829	35440.01.1	1	90.3	90.3	abr-24

	Campanas Durham 6X25 mm de vidrio (Empaque de 250 unidades)	530829	35440.01.1	1	144.22	144.22	abr-24
	Moeller Medio Base para Decarboxilasas (Envase de 500g).	530829	35440.01.1	1	164.131	164.131	abr-24
	Arginina L-aminoácido (Envase de 500g).	530829	35440.01.1	1	214.14	214.14	abr-24
	Purpura de bromocresol (Envase de 25g)	530829	35440.01.1	1	19.18	19.18	abr-24
	Kit API 50 CHL (Envase de 10 unidades)	530829	35290.08.2	12	366.3	4395.6	abr-24
	kit API 20E (Caja de 25 unidades)	530829	35290.08.2	6	214.5	1287	abr-24
	Kit API 20 NE (Caja de 25 unidades)	530829	35290.08.2	6	393.8	2362.8	abr-24
	Reactivo API 20E (envase de 6 ampollas)	530829	35290.08.2	2	271.7	543.4	abr-24
	Medio de suspensión API (100 ampollas de 5 ml)	530829	35290.08.2	3	221.1	663.3	abr-24
	Aceite de parafina (Envase de 1X 125 mL)	530829	35290.08.2	2	39.6	79.2	abr-24
	Reactivo de Zinc (Envase de 2X10g)	30829	35290.08.2	3	113.3	339.9	abr-24
	Oxidasa (Envase de 50 Ap. x 0.75 ml)	530829	35290.08.2	1	442.2	442.2	abr-24
	Reactivo de James (Empaque de 2 ampollas de 5 mL)	530829	35290.08.2	1	147.4	147.4	abr-24
	Reactivo NIT 1 + NIT 2 (Empaque de 2 ampollas de 5 mL)	530829	35290.08.2	1	311	311	abr-24
	API 50 CHL Medio API 50 CHL Envase de 10X10 mL)	530829	35290.08.2	2	118.8	237.6	abr-24

	Aceite de parafina (Envase de 500 mL)	530829	35290.08.2	1	45.66	45.66	abr-24
	Cloruro de Bario (99.99 de pureza) (Envase de 500 g)	530829	342401117	1	85.39	85.39	abr-24
	API WEB. Software para visualización de resultados API Web	840107	51290.00.2	1	1000	1000	abr-24
	Lente de inmersión seco para microscopio	840104	48265.02.2	1	759	759	abr-24
	Cubetas de espectrofotómetro (Caja de 2 unidades)	840104	48265.02.2	2	159.5	319	abr-24
3. Identificación de bacterias deteriorativas durante el tiempo de vida útil de los quesos amasados por métodos moleculares.	kits de PCR Real Time Tecnología Multiplex para bacterias deteriorativas (Envase de 96 pruebas).	530829	35290.08.2	1	2406.03	2406.03	abr-24
	Solución de Proteinasa K (20mg/mL) (Envase de 1 mL)	530829	35290.08.2	2	233.01	466.02	abr-24
	Solución de RNAasa (Envase de 1 mL)	530829	35290.08.2	2	145.27	290.54	abr-24
	Kit de extracción de ADN (Envaque para 100 extracciones)	530829	35290.08.2	2	733.08	1466.16	abr-24
	Buffer TBE (Tris. borato y EDTA) (Envase de 1000 mL)	530829	35290.08.2	1	409.11	409.11	abr-24
	Master Mix de 500 reacciones (Envase de 4 x 1.25 mL)	530829	35290.08.2	2	137.64	275.28	abr-24
	Primer 8F (5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´) (Envase de 100 nmoles)	530829	35290.08.2	1	27.03	27.03	abr-24

	Primer 1492R (5´-CGGTTACCTT GTTACGACTT-3´) (Envase de 100 nmoles)	530829	35290.08.2	1	27.03	27.03	abr-24
	Primer ERIC1R (5′-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3′) (Envase de 100 nmoles)	530829	35290.08.2	1	29.73	29.73	abr-24
	Primer ERIC2 (5′-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3′) (Envase de 100 nmoles)	530829	35290.08.2	1	29.73	29.73	abr-24
	Sybr Green (Envase de 1000 uL)	530829	35290.08.2	2	96.04	192.08	abr-24
	Marcador de Peso Molecular 1 Kb (Envase de 1000 uL)	530829	35290.08.2	2	125.87	251.74	abr-24
	Marcador de Peso Molecular 100 bp (Envase de 1000 uL)	530829	35290.08.2	2	125.87	251.74	abr-24
	Primers P1V1 (5′-GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC-3′) (Envase de 100 nmoles)	530829	35290.08.2	1	27.03	27.03	abr-24
	Primer P4V3 (5′-ATC TCA GCA TTT CAC CGC TAC-3′) (Envase de 100 nmoles)	530829	35290.08.2	1	28.38	28.38	abr-24
	Camara de bioseguridad para extracción Clase II Tipo A2	840104	482650225	1	8415	8415	abr-24
	Minicentrifuga de alta velocidad	840104	439311011	2	2286.92	4573.84	abr-24
	Vortex velocidad variable	840104	48265.02.2	2	490.13	980.26	abr-24
	Micropipetas de 100 a 1000 uL	840104	482530511	3	337.65	1012.95	abr-24
	Micropipeta 10 a 100 uL	840104	482530511	3	337.65	1012.95	abr-24
	Micropipeta de 20 a 200 uL	840104	482530511	3	337.65	1012.95	abr-24
	Micropipeta de 0.5 a 10	840104	482530511	3	337.65	1012.95	abr-24

	Soporte horizontal para 4 micropipetas	530829	482530511	3	66	198	abr-24
	Regulador de corriente UPS 3 KVA	530813	462120615	2	1141.8	2283.6	abr-24
	Congelador/refrigerador	840104	448110014	1	5940	5940	abr-24
	Sistema de lisis y trituradora de batido de gránulos	840104	48265.02.2	1	21284.34	21284.34	abr-24
	Jarra de anaerobiosis	840104	48265.02.2	5	765	3825	abr-24
	Sobre de anaerobiosis	530829	35440.01.1	7	85	595	abr-24
	Minicamaras de flujo laminar Vertical	840104	482650225	2	4683.42	9366.84	abr-24
	Microcentrífuga para 8 tubos eppendorf y tiras PCR	840104	439311011	2	2286.9	4573.8	abr-24
	Termociclador punto final	840104	48265.02.2	1	13200	13200	abr-24
	Termociclador tiempo real	840104	48265.02.2	1	44687.5	44687.5	abr-24
	Termobloques con bloque calentador digital para temperaturas desde –3°C a +150°C	840104	48265.02.2	2	2287.25	4574.5	abr-24
	Computador de escritorio para termociclador tiempo real	840107	45230.00.8	1	500	500	abr-24
	Gradillas para tubos eppendorf	530829	48265.02.2	20	4.62	92.4	abr-24
	Gradillas para tubos de pcr	530829	48265.02.2	20	4.7	94	abr-24
	Nanodrop para cuantificar ADN	840104	48265.02.2	1	11825	11825	abr-24
	Balanza análitica	840104	482310011	1	2729.1	2729.1	abr-24
	Plancha de calentamiento	840104	43932.00.1	1	871.33	871.33	abr-24

	Equipo de electroforesis horizontal (con tanque. electrodos. peines y fuente poder	840104	48265.02.2	2	1487.49	2974.98	abr-24
	Fotodocumentador	840104	48265.02.2	1	20211.66	20211.66	abr-24
	Puntas de micropipetas de 1000 uL con filtro (Empaque con 10 rack de 100 puntas con filtros esteriles)	530829	35290.10.7	8	146.51	1172.08	abr-24
	Puntas de micropipetas de 100 uL con filtro (Empaque con 10 rack de 100 puntas con filtros esteriles)	530829	35290.10.7	12	110.99	1331.88	abr-24
	Puntas de micropipetas de 200 uL con filtro (Empaque con 10 rack de 100 puntas con filtros esteriles).	530829	35290.10.7	8	117.11	936.88	abr-24
	Puntas de micropipetas de 10 uL con filtro (Empaque con 10 rack de 100 puntas con filtros esteriles)	530829	35290.10.7	12	102.44	1229.28	abr-24
	División de Laboratorio de Microbiología Molecular de 7X7 m	530811	38122.00.50	1	10000	10000	abr-24
	Servicio de Secuencias Metagenoma por 16S RNA	530212	81300.00.1	150	75.00	11250.00	oct-24
	Servicio de Secuencias Metagenomas por Shotgun	530212	81300.00.1	50	400	20000.00	oct-24

	Servicio de Secuencias de BAL presuntiva por Sanger (100 muestras)	530212	81300.00.1	200	20	4000	oct-24
	Servicio de secuencias de Enterobacterias presuntivas por Sanger (100 muestras)	530212	81300.00.1	200	20	4000	oct-24
	Capacitación de análisis de metagenomas	530612	92900.00.1	1	3200	3200	oct-24
	Publicaciones de artículos científicos	530204	324000018	4	3500	14000	oct-25
					Total	**270392.11**	

20. Referencias bibliográficas

Abdel, A. & Soliman, N. (2019). Prevalence of some deteriorating microorganisms in some varieties of cheese. *Open Journal of Applied Sciences*, *9*(07), 620. http://www.scirp.org/journal/ojapps

Altieri, C., Scrocco, C., Sinigaglia, M., & Del Nobile, M. A. (2005). Use of chitosan to prolong mozzarella cheese shelf life. *Journal of dairy science*, *88*(8), 2683-2688. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72946-5

Anchundia, M., Jacome, J., Dominguez.,F y Torres, F. (2019). Evaluación nutricional y fisicoquímica del queso amasado fabricado en la provincia del Carchi, Ecuador. *Revista Bases de la Ciencia*, *4*(3), 55-66. https://doi.org/10.33936/rev_bas_de_la_ciencia.v4i3.1857

Barukčić I, Ščetar M, Marasović I, Lisak Jakopović K, Galić K, Božanić R. Evaluation of quality parameters and shelf life of fresh cheese packed under modified atmosphere. J Food Sci Technol. 2020 Jul;57(7):2722-2731. doi: 10.1007/s13197-020-04308-6. Epub 2020 Mar 3. PMID: 32549622; PMCID: PMC7270376. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7270376/

Barukčić, I., Ščetar, M., Marasović, I., Lisak Jakopović, K., Galić, K., & Božanić, R. (2020). Evaluation of quality parameters and shelf life of fresh cheese packed under modified atmosphere. *Journal of food science and technology*, *57*, 2722-2731. https://doi.org/10.1007/s13197-020-04308-6

Bassi, D., Gazzola, S., Sattin, E., Dal Bello, F., Simionati, B., & Cocconcelli, P. S. (2020). Lactic acid bacteria adjunct cultures exert a mitigation effect against spoilage microbiota in fresh cheese. *Microorganisms*, *8*(8), 1199. https://doi.org/10.3390/microorganisms8081199

Burtscher, J., Küller, F., Dreier, M., Arias-Roth, E., Drissner, D., & Domig, K. J. (2020). Characterization of Clostridium tyrobutyricum strains using three different typing techniques. *microorganisms*, *8*(7), 1057. https://doi.org/10.1007/s00253-021-11201-5

Dal Bello, B., Rantsiou, K., Bellio, A., Zeppa, G., Ambrosoli, R., Civera, T., & Cocolin, L. (2010). Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. *LWT-Food Science and Technology*, *43*(7), 1151-1159. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.03.008.

Diario La Hora (2019). El queso amasado, un producto con sabor a historia y tradición. Recuperado de https://www.lahora.com.ec/noticias/el-queso-amasado-un-producto-con-sabor-a-historia-y-tradicion/

Dimov, S. G., Gyurova, A., Zagorchev, L., Dimitrov, T., Georgieva-Miteva, D., & Peykov, S. (2021). NGS-based metagenomic study of four traditional Bulgarian green cheeses from Tcherni Vit. *Lwt*, *152*, 112278. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112278

El Productor (2019). Ecuador: El queso amasado, un producto con sabor a historia y tradición. Recuperado https://elproductor.com/2019/07/ecuador-el-queso-amasado-un-producto-con-sabor-a-historia-y-tradicion/#:~:text=%E2%80%9CSe%20busca%20que%20el%20queso,el%20pa%C3%ADs%E2%80%9D%2C%20acot%C3%B3%20Enr%C3%ADquez.

El-Sayed, H. S., & El-Sayed, S. M. (2021). A modern trend to preserve white soft cheese using nano-emulsified solutions containing cumin essential oil. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, *16*, 100499. https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100499

Ercolini, D. (2020). Secrets of the cheese microbiome. *Nature Food*, *1*(8), 466-467. https://doi.org/10.1038/s43016-020-0131-9

Hassan, G., MS Meshref, A., Zeihom, M., & Abdel-Halem, M. (2019). Impact of spoilage microorganisms on some dairy products. *Assiut Veterinary Medical Journal*, *65*(161); 133-141. https://doi.org/10.21608/AVMJ.2019.168769

Ho, T. M., Howes, T., & Bhandari, B. R. (2018). An innovative approach to extend the shelf life of cottage cheese curds using food grade CO2-α-cyclodextrin complex powder: A preliminary study. *Journal of Food Processing and Preservation*, *42*(2), e13514. https://doi.org/10.1111/jfpp.13514

INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos). (2023). Viasualizador de Resultados Censo 2022. Recuperado de https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoiNWUzMjQwOWMtZjFhOS00NjczLTk0YTItNjcwZmRmY2YxMjkyIiwidCI6ImYxNThhMmU4LWNhZWMtNDQwNi1iMGFiLWY1ZTI1OWJkYTExMiJ9

ISO22935-1. (2023). Milk and milk products — Sensory analysis — Part 1: Recruitment, selection, training and monitoring of assessors. Ginebra, Suiza

Kačániová, M., Kunová, S., Horská, E., Nagyová, Ľ., Puchalski, C., Haščík, P., & Terentjeva, M. (2019). DIVERSITY OF MICROORGANISMS IN THE TRADITIONAL SLOVAK CHEESE. Potravinarstvo, 13(1). https://doi.org/10.5219/1061

Kačániová, M., Terentjeva, M., Kunová, S., Borotová, P., Haščík, P., & Štefániková, J. (2020). Microbiota of non-smoked Slovak cheese "Parenica". *Advanced Research in Life Sciences*, *4*(1), 41-47. https://doi.org/10.5219/1061

Kamilari, E., Tsaltas, D., Stanton, C., & Ross, R. P. (2022). Metataxonomic mapping of the microbial diversity of Irish and eastern Mediterranean cheeses. *Foods*, *11*(16), 2483. https://doi.org/10.3390/foods11162483

Kõrge, K., Šeme, H., Bajić, M., Likozar, B., & Novak, U. (2020). Reduction in spoilage microbiota and cyclopiazonic acid mycotoxin with chestnut extract enriched chitosan packaging: Stability of inoculated gouda cheese. *Foods*, *9*(11), 1645. https://doi.org/10.3390/foods911164

Maifreni, M., Frigo, F., Bartolomeoli, I., Innocente, N., Biasutti, M., & Marino, M. (2013). Identification of the Enterobacteriaceae in Montasio cheese and assessment of their amino acid decarboxylase activity. *Journal of dairy research*, *80*(1), 122-127. doi:10.1017/S002202991200074X

Marino, M., de Wittenau, G. D., Saccà, E., Cattonaro, F., Spadotto, A., Innocente, N., ... & Marroni, F. (2019). Metagenomic profiles of different types of Italian high-moisture Mozzarella cheese. *Food microbiology*, *79*, 123-131. https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.007

Martin, N. H., Torres-Frenzel, P., & Wiedmann, M. (2021). Invited review: Controlling dairy product spoilage to reduce food loss and waste. *Journal of Dairy Science*, *104*(2), 1251-1261. https://doi.org/10.3168/jds.2020-19130

Mastromatteo, M., Lucera, A., Esposto, D., Conte, A., Faccia, M., Zambrini, A. V., & Del Nobile, M. A. (2015). Packaging optimisation to prolong the shelf life of fiordilatte cheese. *Journal of Dairy Research*, *82*(2), 143-151. https://doi:10.1017/S0022029914000740

Mohamed, I.Hegazy, & Mahgoub, S. A. (2013). Microbiological characterization of the Egyptian soft white cheese and identification of its dominant yeasts. *Afr J Microbiol Res*, *7*(20), 2205-2212. DOI: 10.5897/AJMR2013.5368

Nam, J. H., Cho, Y. S., Rackerby, B., Goddik, L., & Park, S. H. (2021). Shifts of microbiota during cheese production: Impact on production and quality. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *105*, 2307-2318. https://doi.org/10.1007/s00253-021-11201-5

Natrella, G., Gambacorta, G., & Faccia, M. (2022). Use of dry ice as innovative technology to preserve the chemical and microbial characteristics of burrata cheese. *Journal of Food Processing and Preservation*, *46*(10), e16908. https://doi.org/10.1111/jfpp.16908

Normativa Técnica Ecuatoriana INEN 1528 (2012). Norma General para Quesos Frescos no Madurados Requisitos. Quito, Ecuador.

Odeyemi, O. A., Alegbeleye, O. O., Strateva, M., & Stratev, D. (2020). Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *19*(2), 311-331. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12526

Podrzaj, L., Burtscher, J., & Domig, K. J. (2021). Draft Genome Sequences of 12 Clostridium tyrobutyricum Strains Isolated from Raw Milk and Cheese. *Microbiology Resource Announcements*, *10*(39), e00735-21. https://doi.org/10.1128/MRA.00735-21

Quintieri, L., Bugatti, V., Caputo, L., Vertuccio, L., & Gorrasi, G. (2021). A food-grade resin with LDH–salicylate to extend mozzarella cheese shelf life. *Processes*, *9*(5), 884. https://doi.org/10.3390/pr9050884

Ricciardi, E. F., Lacivita, V., Conte, A., Chiaravalle, E., Zambrini, A. V., & Del Nobile, M. A. (2019). X-ray irradiation as a valid technique to prolong food shelf life: The case of ricotta cheese. *International Dairy Journal*, *99*, 104547. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.104547

Salazar, J. K., Carstens, C. K., Ramachandran, P., Shazer, A. G., Narula, S. S., Reed, E., ... & Schill, K. M. (2018). Metagenomics of pasteurized and unpasteurized gouda cheese using targeted 16S rDNA sequencing. *BMC microbiology*, *18*, 1-13. https://doi.org/10.1186/s12866-018-1323-4

Sameli, N., Sioziou, E., Bosnea, L., Kakouri, A., & Samelis, J. (2021). Assessment of the spoilage microbiota during refrigerated (4 C) vacuum-packed storage of fresh Greek Anthotyros whey cheese without or with a crude enterocin ABP-containing extract. *Foods*, *10*(12), 2946. https://doi.org/10.3390/foods10122946

Samelis, J., Doulgeraki, A. I., Bikouli, V., Pappas, D., & Kakouri, A. (2021). Microbiological and metagenomic characterization of a retail delicatessen Galotyri-like fresh acid-curd cheese product. *Fermentation*, *7*(2), 67. https://doi.org/10.3390/fermentation7020067

Song, X., Zheng, Y., Zhou, X., & Deng, Y. (2022). Quark Cheese processed by dense-phase carbon dioxide: Shelf-life evaluation and physiochemical, rheological, microstructural and volatile properties assessment. *Foods*, *11*(15), 2340. https://doi.org/10.3390/foods11152340

Teider, P. I., Ribeiro, J. C., Ossugui, E. H., Tamanini, R., Ribeiro, J., Santos, G. A., ... & Beloti, V. (2019). Pseudomonas spp. and other psychrotrophic microorganisms in inspected and non-inspected Brazilian Minas Frescal cheese: Proteolytic, lipolytic and

AprX production potential. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, *39*, 807-815. https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6037

Tulcán OnLine. (2023). Mapas del Carchi. Recuperado de https://www.tulcanonline.com/index.php/mapas-del-carchi.html

Xue, Z., Brooks, J. T., Quart, Z., Stevens, E. T., Kable, M. E., Heidenreich, J., ... & Marco, M. L. (2021). Microbiota assessments for the identification and confirmation of slit defect-causing bacteria in milk and Cheddar cheese. *Msystems*, *6*(1), 10-1128. https://doi.org/10.1128/mSystems.01114-20.

Atentamente;

Firmado electrónicamente por:
GUALBERTO GERARDO LEON REVELO

PhD Gualberto León Revelo
DIRECTOR PROYECTO – *DOCENTE - UPEC*
"EDUCAMOS PARA TRANSFORMAR EL MUNDO"