

UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA

URUGUAY

ACUERDO DE TRABAJO
UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA (FACULTAD DE AGRONOMIA) /
COOPERATIVA NACIONAL DE PRODUCTORES DE LECHE

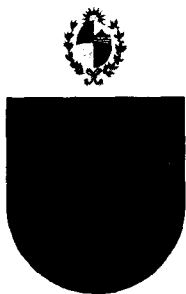
En la ciudad de Montevideo el día 31 del mes de Agosto del año 2006 por una parte la Universidad de la República (Facultad de Agronomía) representada por su Rector Dr. Rodrigo Arocena, con sede en Avda. 18 de Julio 1968 y por otra parte, la Cooperativa Nacional de Productores de Leche representada por su Presidente, Jorge Eduardo Panizza y por su Gerente General, Ruben Ramón Núñez, con sede en Magallanes 1871, se reúnen a efectos de suscribir el presente Acuerdo de Trabajo.

PRIMERO: Las partes acuerdan la realización del proyecto de investigación denominado **Caracterización y Dinámica de Microorganismos Termodúricos en las Líneas de Producción de Polvos** de acuerdo a las especificaciones que lucen en el anexo de este convenio que se considera parte integrante del mismo.

SEGUNDO: La dirección y responsabilidad técnica de los trabajos que se desarrollen en la ejecución del proyecto objeto de este Acuerdo estará a cargo de la Unidad de Tecnología de Alimentos.

TERCERO: La Cooperativa Nacional de Productores de Leche se hará cargo de proveer los recursos económicos y materiales que constan en el plan de trabajo y el presupuesto respectivo que se presenta en el anexo de este acuerdo.

CUARTO: La Universidad de la República -Facultad de Agronomía se hará



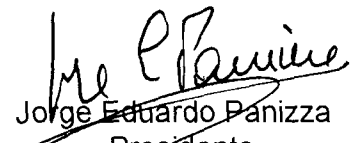
UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA

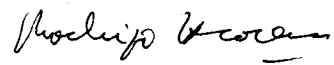
URUGUAY
cargo de la organización y ejecución de los trabajos emergentes a este
Acuerdo que constan en el anexo referido.

QUINTO: Los derechos de propiedad intelectual que pudieran derivarse de la ejecución de los trabajos comprometidos en este Acuerdo se registrará en atención a lo previsto por las leyes y reglamentos nacionales y por la Ordenanza de Propiedad Intelectual de la Universidad de la República del 8/03/94.

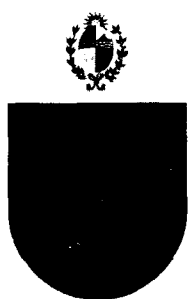
SEXTO: Este Acuerdo tendrá una duración de 2 años y podrá ser rescindido por cualquiera de las partes con un plazo de antelación de dos meses.

Para constancia se firman dos ejemplares de un mismo tenor en el lugar y fecha indicados.


Jorge Eduardo Panizza
Presidente
CONAPROLE


Dr. Rodrigo Arocena
Rector
Universidad de la República


Ruben Ramón Núñez
Gerente General
CONAPROLE



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA

URUGUAY

CARACTERIZACIÓN Y DINÁMICA DE MICROORGANISMOS TERMODÚRICOS EN LAS LÍNEAS DE PRODUCCIÓN DE POLVOS LÁCTEOS.

Stella Reginensi y Jorge Bermúdez

1. INTRODUCCIÓN.

La leche es un medio altamente favorable para el crecimiento de microorganismos y las condiciones de manejo y su procesamiento pueden ejercer presiones selectivas sobre el tipo de contaminantes presentes en el producto final. La leche en polvo es generalmente considerada como un producto de buena calidad microbiológica, sin embargo diferentes factores pueden contribuir a cambios físicos y químicos que reducen su vida útil y por lo tanto su valor comercial. El enfoque del trabajo está dirigido al aislamiento e identificación de las cepas predominantes de microorganismos termodúricos del proceso, particularmente esporulados del género *Bacillus*, su potencial de producción de enzimas lipolíticas y proteolíticas, su capacidad de adhesión a las superficies de la línea y su evolución cuantitativa durante el ciclo de producción diaria.

2. OBJETIVOS.

- 1.1. Determinar los principales contaminantes de las líneas de producción de leche en polvo, particularmente esporulados, en las diferentes épocas del año.
- 1.2. Evaluar el potencial de lipólisis y proteólisis de las principales cepas contaminantes.
- 1.3. Determinar las propiedades de adhesión y la resistencia de diferentes cepas a las rutinas de limpieza de los equipos.
- 1.4. Cuantificar la dinámica de contaminación en las líneas de proceso a lo largo del ciclo productivo diario en las diferentes épocas de muestreo y el grado de deterioro de la leche (lipólisis y proteólisis) en los diferentes momentos.



3. MATERIALES Y MÉTODOS.

Se definieron 7 puntos críticos del proceso para la evaluación de microorganismos contaminantes en la línea de producción desde el silo hasta el producto final. Para los muestreos en los sitios definidos se deberán hacer adecuaciones en la línea para la toma de muestras en el período de trabajo. Las muestras serán obtenidas en las dos líneas que funcionan en la planta.

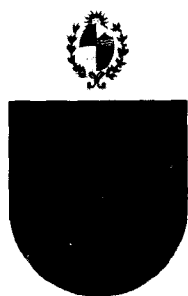
3.1. Evaluación de los géneros y especies contaminantes en las líneas.

El cronograma de muestreo se realizará de acuerdo al siguiente esquema, que incorpora los períodos considerados problemáticos sobre el fin de la lactación en el ciclo productivo anual.

Períodos de muestreo

En cada uno de estos períodos se obtendrán muestras cada 15 días en las dos líneas, hacia el final del ciclo productivo diario de forma de evaluar el potencial contaminante en cada una de las épocas. En esta forma se obtendrán 56 muestras en cada uno de los períodos de muestreo.

Las muestras obtenidas en cada uno de los muestreos serán trasladadas al laboratorio en conservadoras bajo refrigeración, y serán sembradas a diferentes diluciones en PCA y TGE a temperaturas de incubación de 37 y 55 °C para proceder posteriormente a los aislamientos. Finalizado el período de incubación se realizarán entre 5 y 10 aislamientos por caja de acuerdo a la morfología de las colonias y la predominancia de las mismas en las cajas sembradas. Las colonias aisladas serán identificadas y transferidas a caldo nutritivo para su posterior identificación, utilizando las técnicas sugeridas por Buchanan y Gibbons (1986), Gordon et al. (1973) y Harrigan y McCance (1965).



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA

URUGUAY

Los aislamientos obtenidos en el período de trabajo serán conservados bajo congelación utilizando un preservador en base a glicerol. Las cepas congeladas podrán ser utilizadas para estudios analíticos posteriores.

3.2. Evaluación de la capacidad enzimática proteolítica y lipolítica de las principales cepas aisladas.

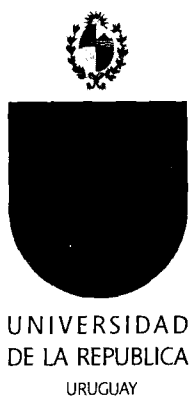
Los aislamientos predominantes en la planta serán evaluados en su capacidad de producir enzimas que deterioren el producto final. Las cepas que fueron congeladas serán sometidas a crecimiento en caldos específicos de acuerdo a su especie y el tipo de enzimas de interés (lipasas, proteasas).

De acuerdo a las cepas utilizadas en la siembra en caldo, los cultivos crecerán por un período de 24 h a 37 o 55 °C bajo agitación a 110 rpm. Concluido el período de crecimiento, los cultivos serán centrifugados a 4500 g y el sobrenadante será utilizado para las pruebas de evaluación de capacidad enzimática. La determinación de proteólisis se realizará de acuerdo a la técnica de OPA y la lipólisis por medición de ácidos grasos libres y/o hidrólisis de nitrofenilcaprilato.

3.3. Cuantificación de la dinámica de contaminación de las líneas a lo largo del proceso y deterioro del producto (proteólisis y lipólisis).

En cada uno de los períodos se cuantificará la evolución de presencia de contaminantes en las líneas a lo largo de una corrida, obteniendo muestras en 8 puntos críticos de la líneas a las 0, 5, 10 y 15 horas del inicio del ciclo (no incluye el silo de recibo). Las muestras serán obtenidas de las dos líneas de trabajo de forma de obtener 96 muestras para cada uno de los períodos para cada uno de los períodos del año bajo estudio. Las muestras serán utilizadas para el conteo de microorganismos totales utilizando PCA procesándolas en la planta y una fracción se utilizará en las pruebas de lipólisis y proteólisis. En este último caso, las muestras serán enfriadas rápidamente en baño de hielo y acondicionadas para su transporte al laboratorio.

La lipólisis y proteólisis de las muestras serán evaluadas por las mismas técnicas señaladas anteriormente, realizando coordinadamente una evaluación de panel de la empresa a efectos de establecer los límites de estos procesos para constituir un defecto detectable.



3.4. Determinación de la capacidad de adhesión en acero inoxidable de las principales cepas presentes.

Las principales cepas termodúricas aisladas durante el proceso de estudio serán analizadas en relación con su capacidad de adhesión a las superficies de las líneas a nivel de laboratorio. Para el estudio se utilizarán placas de forma rectangular de 45 x 15 mm de las especificaciones del tipo de acero utilizado en las líneas de la planta. Las placas previamente lavadas y desinfectadas, se colocarán en una suspensión de esporas o microorganismos (1×10^7 ufc/ml) por 1 hora a temperatura ambiente. Las placas serán removidas luego del tratamiento y enjuagadas con agua esteril.

El índice de adhesión de los microorganismos será evaluado mediante la ultrasonificación por 3 minutos de las placas en agar nutritivo y conteo de microorganismos desprendidos en el proceso.

En los aislamientos de mayor importancia cuantitativa para la planta se evaluará el efecto de la temperatura y productos de limpieza sobre las cepas. La evaluación de la temperatura se realizará con las placas contaminadas en la forma descrita anteriormente que se colocarán en tubos con agua a 75°C (control) y 90 °C (tratadas). Luego de 1 minutos de tratamiento, los tubos serán enfriados y sometidos a 3 minutos de ultrasonificación. Las bacterias desprendidas serán cultivadas en agar nutritivo por 48 horas a 30 °C. La mortalidad por temperatura será evaluada por la relación $-\log(N^{90}/N^{75})$, donde N^{90} es el número de microorganismos sobrevivientes a 90°C y N^{75} es el número de microorganismos sobrevivientes a 75°C.

En los mismos aislamientos del estudio de efecto de la temperatura se evaluarán los agentes de limpieza utilizados en la planta. El control de tratamiento estará representado por placas contaminadas en la forma descrita inicialmente que serán colocadas en tubos con agua o en los productos de limpieza a igual concentración a la utilizada en la planta. Las placas serán incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente y luego de removidos serán ultrasonificadas. Los microorganismos desprendidos serán cultivados en agar nutritivo y la acción de limpieza será evaluada por la relación $-\log(N^L/N^A)$, donde N^L es el número de microorganismos luego de aplicar el agente de limpieza y N^A el número de microorganismos luego de mantener las placas en agua.

4. BIBLIOGRAFÍA.

Buchanan, R. E. y E. N. Gibbons. 1986. Bergey's Manual of Determinative



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY

Bacteriology. 8th Ed. Williams y Wilkins Co., Baltimore, MD.

Gordon, R. E., W. C. Hagnes y H. Cor-Nay Pang. 1973. The Genus *Bacillus*.
Agricultural Handbook N° 427. ARS-USDA, Washington, DC.

Harrigan, W. R. y E. M. McCance. 1965. Laboratory Methods in Microbiology.
Academia Press, NY.

W
Z



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY

PRESUPUESTO DEL PROYECTO:

**“CARACTERIZACIÓN Y DINÁMICA DE MICROORGANISMOS
TERMODÚRICOS EN LAS LÍNEAS DE PRODUCCIÓN DE POLVOS
LÁCTEOS”**

PRIMER AÑO.

Rubro:	US\$
Materiales fungibles.	
Medios de cultivo para crecimiento y aislamientos	1.700
Reactivos para identificación bioquímica (fenotípica) de cepas aisladas	3.400
Cajas de Petri plásticas estériles	750
Subtotal	5.850
Equipo e inversiones	
Equipo de computación, accesorio y mantenimiento de equipos	1.800
Jarras de anaerobiosis (Gaspak) y reactivos	900
Subtotal	2.700
Contrataciones	
GI 40 horas/semanales	4.800
Subtotal	4.800
Traslados y viáticos	
Visita a planta para muestreos	900
Subtotal	900
Overhead Facultad (15% del monto total)	2.515
TOTAL AÑO 1	16.765

SEGUNDO AÑO.

Rubro:	US\$
Materiales fungibles.	
Medios de cultivo para aislamientos	500
Caracterización lipolítica y proteolítica de las cepas aisladas	1.200
Cajas de Petri plásticas estériles	250
Subtotal	1.950



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA

URUGUAY Contrataciones	
G1 30 horas/semanales	3.000
Subtotal	3.000
Traslados y viáticos	
Visita a planta para muestreos	400
Subtotal	400
Overhead Facultad (15% del monto total)	
	844
TOTAL AÑO 2	
	6.194
TOTAL DEL PROYECTO EN DOS AÑOS	
	22.959

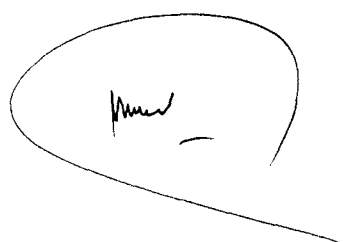
Los montos para cada año serán aportados de acuerdo al siguiente flujo de fondos:

Primer año:

- | | |
|-------------------------------------|------------|
| 1. Inicio del primer cuatrimestre: | US\$ 7.388 |
| 2. Inicio del segundo cuatrimestre: | US\$ 4.690 |
| 3. Inicio tercer cuatrimestre: | US\$ 4.687 |

Segundo año:

- | | |
|-----------------------------|------------|
| 4. Inicio primer semestre: | US\$ 4.000 |
| 5. Inicio segundo semestre: | US\$ 2.194 |

Rodrigo Horacio


Jo Ebanis
