

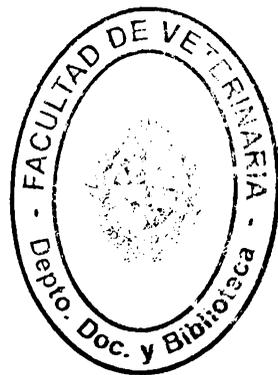
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**“Efecto del tratamiento térmico en la separación de grasa de la leche de diferentes razas  
(Holando y Jersey) por gravedad en la calidad de las fracciones obtenidas”**

**por**

**ADLER Andrés  
GALVÁN Miguel  
GONZÁLEZ Danilo**



TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias (Orientación Medicina Veterinaria y Producción Animal)

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2008**

121 TG  
Efecto del trat  
Adler, Andrés



FV28120

**TESIS DE GRADO APROBADA POR:**

**Presidente de mesa:**

\_\_\_\_\_

Dra. Silvana Carro

**Segundo miembro (Tutor):**

\_\_\_\_\_

Ing. Agr. Jorge Bermúdez

**Tercer miembro:**

\_\_\_\_\_

Dr. Juan Pablo Damian

**Fecha: 30 de Diciembre de 2008.**

**Autores:**

\_\_\_\_\_

Br. Andrés Ariel Adler Burgos

\_\_\_\_\_

Br. Miguel Eduardo Galván García

\_\_\_\_\_

Br. Danilo Raúl González Cabrera

## **AGRADECIMIENTOS**

**Se agradece la colaboración del Ingeniero Químico Antonio Malanga, por el procesamiento de las muestras de tamaño de partículas grasas, que se realizó en el Polo Tecnológico de Pando de la Facultad de Química.**

**Se agradece a la cátedra de Tecnologías de los alimentos de la Facultad de Agronomía, por la ayuda en la recopilación y procesamiento de los datos.**

## **ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO**

**AGV:** Ácidos Grasos Volátiles.

**CV:** Coeficiente de Variación.

**DAG:** Diacilglicéridos.

**ETA:** Enfermedades transmitidas por los alimentos.

**GB:** Grasa Bruta.

**GG:** Glóbulo Graso

**HTST:** Corto tiempo a alta temperatura.

**LTLT:** Largo tiempo a baja temperatura.

**LPL:** Lipasa Lipoproteína.

**MAG:** Monoacilglicéridos.

**PB:** Proteína Bruta.

**TAG:** Triacilglicéridos.

**UHT:** Tratamiento térmico de ultra temperatura.

**SNG:** Sólidos no Grasos.

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

<b>Cuadro 1:</b> Características que debe tener la leche para el consumo humano.....	5
<b>Cuadro 2:</b> Composición de la leche de las razas Jersey y Holando.....	5
<b>Cuadro 3:</b> Composición de lípidos de la leche.....	7
<b>Cuadro 4:</b> Composición de la membrana del glóbulo graso.....	8
<b>Cuadro 5:</b> Concentraciones minerales y vitamínicas en la leche (mg/100ml).....	11
<b>Cuadro 6:</b> Porcentaje de leucocitos en leche normal.....	15
<b>Cuadro 7:</b> Diagnóstico de un cuarto según el conteo de células somáticas.....	16
<b>Cuadro 8:</b> Medias de cuadrados mínimos ( $\mu \pm \text{EEM}^*$ ) para el contenido de células somáticas (x 1000) en las razas Holando y Jersey en los diferentes estratos de separación.....	26
<b>Cuadro 9:</b> Medias de cuadrados mínimos para el contenido de grasa ( $\mu \pm \text{EEM}$ ) de la leche (%) en las razas Holando y Jersey en los diferentes estratos de separación.....	27
<b>Cuadro 10:</b> Medias de cuadrados mínimos para el contenido de grasa ( $\mu \pm \text{EEM}$ ) de la leche (%) por el efecto de la activación en los diferentes estratos de separación.....	28
<b>Cuadro 11:</b> Medias de cuadrados mínimos ( $\mu \pm \text{EEM}$ ) para el contenido de proteína de la leche (%) en las razas Holando y Jersey en los diferentes estratos de separación.....	28
<b>Cuadro 12:</b> Medias de cuadrados mínimos para el contenido de lactosa ( $\mu \pm \text{EEM}$ ) de la leche (%) en las razas Holando y Jersey en los diferentes estratos de separación.....	29
<b>Cuadro 13:</b> Medias de cuadrados mínimos para el contenido de lactosa ( $\mu \pm \text{EEM}$ ) de la leche (%) por el efecto de la activación en los diferentes estratos de separación.....	29
<b>Cuadro 14:</b> Medias de cuadrados mínimos para el tamaño ( $\mu\text{m}$ ) de partículas ( $\mu \pm \text{EEM}$ ) de la leche (%) en las razas Holando y Jersey en los diferentes estratos de separación.....	33
<b>Figura 1.</b> Descripción gráfica de los balones de separación utilizados en el experimento.....	24
<b>Figura 2</b> Distribución del tamaño de los glóbulos grasos en la leche producida por vacas de la raza Holando y Jersey.....	31
<b>Figura 3</b> Distribución de tamaño de glóbulos grasos de la leche proveniente de la raza Holando (a) y Jersey (b), separadas naturalmente por gravedad.....	32

De Pr.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	IV
1. <u>RESUMEN</u> .....	1
2. <u>SUMMARY</u> .....	3
3. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	4
4. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	5
4.1. <u>LECHE Y SU MECANISMO DE SÍNTESIS</u> .....	5
4.2. <u>GLÁNDULA MAMARIA</u> .....	6
4.3. <u>COMPOSICIÓN DE LA LECHE</u> .....	6
4.3.1. <u>Grasa de la leche</u> .....	6
4.3.1.1. <u>Separación natural de la grasa de la leche</u> .....	8
4.3.2. <u>Proteínas de la leche</u> .....	10
4.3.3. <u>Carbohidratos de la leche</u> .....	11
4.3.4. <u>Minerales y vitaminas</u> .....	11
4.4. <u>CALIDAD DE LA LECHE</u> .....	12
4.4.1. <u>Importancia de la calidad de la leche cruda en la fabricación de productos lácteos</u> .....	12
4.4.2. <u>Células somáticas de la leche</u> .....	15
4.4.3. <u>Microorganismos de la leche</u> .....	16
4.5. <u>CADENA PRODUCTIVA LÁCTEA (desde la vaca hasta la industria)</u> .....	19
4.5.1. <u>Ordeño</u> .....	20
4.5.2. <u>Tanque de frío</u> .....	20
4.5.3. <u>Transporte de la leche</u> .....	22
4.5.4. <u>Industria</u> .....	22
5. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	23
6. <u>RESULTADOS y DISCUSIÓN</u> .....	26
7. <u>CONCLUSIONES</u> .....	34
8. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	35

## **1. RESUMEN**

El objetivo del trabajo fue evaluar la separación natural por gravedad de la grasa de la leche de dos razas (Holando y Jersey) sobre la concentración de células somáticas, proteína, grasa y lactosa, los conteos de diferentes grupos microbianos y el tamaño de partículas grasas de las fracciones utilizadas en la elaboración de quesos. La fase experimental se realizó en la Unidad de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Agronomía y la leche utilizada de las razas Jersey y Holando fue obtenida en el establecimiento "Diez Taperas" ubicado en km 93,5 de la Ruta 11, en el Departamento de Canelones. En el experimento 1 se evaluó el efecto de la activación térmica (40°C) previa a la separación natural de la leche bajo refrigeración (4°C) en un período de 4 horas, sobre la composición de la leche y el conteo de células somáticas de las diferentes fracciones obtenidas, utilizando un modelo completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos. El análisis de la información obtenida en esta fase demostró la existencia de diferencias entre las razas ( $P < 0,0003$ ), el estrato de separación ( $P < 0,0001$ ) y el momento de muestreo ( $P < 0,05$ ), mientras que no se encontraron diferencias significativas ( $P = 0,9124$ ) para la activación térmica de la leche previa a la separación por gravedad sobre los recuentos de células somáticas. Se encontraron efectos altamente significativos ( $P < 0,0001$ ) de la interacción entre raza y estrato cuyo análisis muestra que las diferencias existentes entre la leche de diferentes razas se manifiesta en la capa superior grasa. Las medias de los cuadrados mínimos para los contenidos de células somáticas por ml para los diferentes estratos luego de su separación fueron de  $46,1 \pm 9,4$ ,  $12,5 \pm 2,0$ ,  $10,9 \pm 2,0$  y  $1.426,3 \pm 207,1$  células somáticas ( $\times 1000$ ) para el estrato inferior, medio inferior, medio superior y superior, respectivamente. El análisis del contenido de grasa en la leche luego de la separación natural, muestra diferencias entre razas ( $P < 0,0001$ ), activación térmica de la leche ( $P < 0,006$ ), estrato de separación ( $P < 0,0001$ ) y momento de muestreo ( $P < 0,01$ ), siendo significativas las interacciones entre raza y estrato ( $P < 0,0001$ ) y entre activación y estrato ( $P < 0,0001$ ). El contenido promedio de grasa de las muestras procesadas en la leche Holando fue de  $4,69 \pm 1,08$  % mientras que en la raza Jersey fue de  $6,66 \pm 1,75$  %. La interacción entre raza y estrato indica que las diferencias entre razas se manifiestan en la capa superior y en la misma forma la interacción entre activación y estrato indica que la leche activada térmicamente concentra la grasa en la fase de separación superior. Las media mínimas cuadradas para los diferentes fases separadas fue de  $0,72 \pm 0,07$ ,  $1,27 \pm 0,11$ ,  $1,52 \pm 0,17$  y  $19,2 \pm 1,21$  % para los estratos inferior, medio inferior, medio superior y superior, respectivamente. El análisis del contenido de proteína mostró diferencias altamente significativas ( $P < 0,0001$ ) entre razas, estratos de separación y momentos de muestreo. Las medias promedio de contenido de proteína fueron de  $3,02 \pm 0,03$  % y  $3,52 \pm 0,06$  % para las razas Holando y Jersey, respectivamente. Los promedios de proteína para los estratos fueron de  $3,42 \pm 0,08$ ,  $3,42 \pm 0,08$ ,  $3,41 \pm 0,08$  y  $2,83 \pm 0,03$  % para el inferior, medio inferior, medio superior y superior, respectivamente, y las diferencias se presentaron entre la capa superior con las restantes, no existiendo diferencias entre ellas. No existieron diferencias ( $P = 0,073$ ) en el contenido de proteína con la activación térmica de la leche. La interacción entre raza y estrato fue altamente significativa ( $P < 0,0001$ ) mostrando que las diferencias entre razas se manifiesta en la capa superior. La lactosa presentó diferencias entre razas, estrato de separación y la interacción entre raza y estrato de separación ( $P < 0,0001$ ), mientras que la interacción entre activación y estrato de separación fue significativa ( $P < 0,05$ ). El estudio de las interacciones indica que las diferencias en el contenido de lactosa entre razas se manifestaron en el estrato superior y que la activación redujo la concentración de lactosa en la capa superior. Las medias para los diferentes estratos fueron de  $5,0 \pm 0,05$ ,  $4,98 \pm 0,05$ ,  $4,96 \pm 0,05$  y  $4,20 \pm 0,09$  % para la inferior, media inferior, media superior y superior, respectivamente. El color de la grasa de la capa superior fue más intenso en la raza Jersey y se manifiesta en las diferencias encontradas en los parámetros de color *a* y *b*, mientras no se encontraron diferencias en el parámetro *L*. El contenido de microorganismos totales, psicrótrofos, *E. coli* y termodúricos presentó diferencias altamente significativas ( $P < 0,003$ ) entre estratos, concentrando los microorganismos en la fase superior, mientras que no se encontraron diferencias ( $P > 0,05$ ) entre las

razas estudiadas. El tamaño de los glóbulos grasos de la raza Holando fue de  $3,40 \pm 1,16 \mu\text{m}$ , mientras en la raza Jersey fue de  $3,86 \pm 1,55 \mu\text{m}$ . El análisis de la información obtenida muestra la existencia de diferencias en el tamaño de partículas entre los estratos de separación ( $P < 0,0008$ ), mientras no fueron significativas las diferencias entre razas ( $P = 0,1407$ ) y la interacción raza y estrato de separación ( $P = 0,9785$ ). La separación natural de la grasa produce fracciones con glóbulos grasos que difieren en tamaño siendo menores en las fases inferiores, pero también los patrones de distribución de tamaño de las dos razas son diferentes en cuanto a que en la raza Jersey las fracciones superiores o grasas, presentan una mayor proporción de glóbulos grasos de mayor tamaño que la misma fracción de la raza Holando. La separación natural de la grasa de la leche es un proceso que ocasiona cambios significativos en la leche que se utiliza en la elaboración de quesos que se manifiestan en una reducción en el contenido graso e incremento en el contenido de proteína y lactosa, una reducción sensible de grupos microbianos no deseados y de células somáticas, así como una reducción del tamaño de los glóbulos grasos incorporados al queso. Al comparar los resultados obtenidos con las bibliografías citadas en este trabajo, reafirmamos lo concluido por los diferentes autores, que han llevado a cabo estudios similares al nuestro como por ejemplo: Dellaglio y col., (1969); Ma y col., (2000); O'Mahony y col., (2004).

## 2. SUMMARY

The experimental trials were done at the Food Science and Technology laboratory of the Agricultural college and the milk from Holstein and Jersey cows was obtained from the "10 Taperas" farm (Canelones, Uruguay). Three experimental trials were done to evaluate the effects of gravity separation on milk composition, somatic cell counts and bacterial colony forming units at the different separated layers under refrigerated milk storage (4°C) during 4 hours. Trial 1 was designed to study the effect of thermal milk activation (40°C) on somatic cell counts and milk components (fat, protein, lactose) at the different separated layers. Somatic cell counts information analysis indicated significantly differences between breeds ( $P < 0.0003$ ), separated layer ( $P < 0.0001$ ), sampling period ( $P < 0.05$ ) and the breed\*separated layer interaction ( $P < 0.0001$ ). The interaction analysis indicated that the somatic cell count differences between breeds were found at the upper fat layer. The averages of the minimal squares for the contents of somatic cells for ml for the different strata after his separation were  $46.1 \pm 9.4$ ,  $12.5 \pm 2.0$ ,  $10.9 \pm 2.0$  y  $1426.3 \pm 207,1$  somatic cell (x 1000) for the bottom, bottom, middle, upper middle and upper layer, respectively. Fat content analysis indicated between breeds ( $P < 0.0001$ ), milk thermal treatment ( $P < 0.006$ ), separation layer ( $P < 0.0001$ ), sampling period ( $P < 0.01$ ), and the breed\*separation layer and thermal activation\*separation layer interactions. Mean fat content of the milk was  $4.69 \pm 1.08$  % and  $6.66 \pm 1.75$  % for Holstein and Jersey, respectively, which were high values because the drought weather conditions. The interaction between race and stratum indicates that the differences between races demonstrate in the upper layer, the interaction between activation and stratum indicates that the activated milk térmicamente concentrates the fat in the upper layer. Them average minimis squared for different separated phases it was of  $0.72 \pm 0.07$ ,  $1.27 \pm 0.11$ ,  $1.52 \pm 0.17$  and  $19.2 \pm 1.21$  % for the bottom, bottom, middle, upper middle and upper layer, respectively. Protein content analysis have shown significantly differences ( $P < 0.0001$ ) between breeds, separation layer and sampling period. Milk protein content was  $3.02 \pm 0.03$  % and  $3.52 \pm 0.06$  % in Holstein and Jersey cows, respectively. The averages of protein for the strata were of  $3.42 \pm 0.08$ ,  $3.42 \pm 0.08$ ,  $3.41 \pm 0.08$  y  $2.83 \pm 0.03$  % for the bottom, bottom middle, upper middle and upper layer, respectively. Milk thermal activation did not affect ( $P = 0.073$ ) protein content of the separated layers. Breed\*separation layer interaction was highly significant ( $P < 0.0001$ ) indicating that the differences between breeds are found in the upper layer. Lactose content (%) was different between breeds, separation layer and the breed\*separation layer interaction ( $P < 0.0001$ ), meanwhile it was significantly different ( $P < 0.05$ ) for the activation\*separation layer interaction. Differences between breeds were found at the upper layer and the milk thermal activation decrease the upper layer lactose content. The averages for the different strata were  $5.0 \pm 0.05$ ,  $4.98 \pm 0.05$ ,  $4.96 \pm 0.05$  y  $4.20 \pm 0.09$  % for the bottom, bottom middle, upper middle and upper layer, respectively. The separated fat layer from Jersey cows had a greater *a* and *b* colour intensity than Holstein cows, but parameter *L* was similar for both breeds. Total, psychrotrophs, *E. coli* and thermoduric colony forming units (CFU/ml) were significantly higher ( $P < 0.003$ ) in the upper layer, and no differences ( $P > 0.05$ ) were found between breeds. The mean fat globule size was  $3.40 \pm 1.16$   $\mu\text{m}$  for Holstein cows and  $3.86 \pm 1.55$   $\mu\text{m}$  for Jersey cows. The gravity separation of fat for about 4 hour resulted in a greater fat globule size in the upper layers and both breed had differences in the proportion of the different separate layers. Our results shown that the gravity separation of milk can be a technological tool for artisanal cheesemakers, because the milk used in the process had advantages in composition, spoilage microorganisms and somatic cell counts.

### **3. INTRODUCCIÓN**

Uruguay dispone de una superficie de territorio de 177.508 km<sup>2</sup> que se ubica entre los paralelos 30° y 35°, correspondiendo a la zona templada-subtropical del hemisferio sur. La temperatura en los meses de verano (enero-febrero) alcanza un promedio de 25°C, y durante el mes más frío (junio) se sitúa en 12°C. Las lluvias se distribuyen a lo largo del año, con períodos cortos de sequía, y el promedio anual de precipitaciones es de 1300 mm. El clima moderado, con pocas variaciones locales de temperatura, y la distribución homogénea de las lluvias, permiten la crianza de ganado durante todo el año. (Uruguay. Ministerio de Defensa, Dirección Nacional de Meteorología, 2008).

La producción ganadera es la principal actividad agropecuaria del Uruguay y el pilar de su economía, ya que constituye más del 40% de las exportaciones anuales que incluyen entre sus productos a la carne, lana y lácteos. La producción de leche se concentra en dos cuencas principales ubicadas en el sur hacia el oeste y en el litoral oeste del país, ubicándose en los departamentos de San José, Colonia, Florida, Soriano y Flores. El número de establecimientos dedicados a la producción láctea es de 4.546, los que ocupan una superficie de 852.000ha que corresponde al 4,5% de la superficie total del Uruguay. Los productores que se dedican a la lechería como único rubro totalizan 3.410 establecimientos, de los cuales el 32,3% tienen menos de 50ha, 61,9% corresponden a predios entre 50 y 500ha, y solo el 5,8% corresponden a superficies mayores a 500ha. El número total de vacunos en el país en el 2006 era de 11,7 millones de cabezas, de las cuales 877 mil están destinados a la producción de leche (Uruguay. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, DIEA, 2006).

La producción de leche en el periodo 2005/06 fue de 1.620 millones de litros, de los cuales 1.417 millones (88,2%) fueron remitidos a planta, 112 millones (6,9%) se utilizaron para la elaboración de productos en el predio, 10,1 millones fueron utilizados para consumo humano en el propio establecimiento y el restante 69,2 millones fue destinado para consumo animal en el predio productor. En la remisión a plantas durante 2006 participaron 3.345 establecimientos con un volumen promedio de 1.161 litros/día (Uruguay. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, DIEA, 2006).

En lo que respecta al destino de los productos lácteos luego de su elaboración existe una marcada tendencia a la exportación, tomando en cuenta nuevamente el año 2006 como referencia tenemos que 1,023 millones de litros se exportaron en forma elaborada y 417 millones de litros se consumieron en el país. Las exportaciones más grandes correspondieron a la leche en polvo con 515 millones de litros equivalentes y los quesos con 378 millones de litros equivalentes. El consumo de leche fluida con 226,9 millones de litros es la forma mayoritaria de consumo de leche interno (Uruguay. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, DIEA, 2006).

En los últimos diez años la producción de leche ha aumentado en aproximadamente unos 300 millones de litros. En dicho periodo hubo un detrimento de la superficie destinada a la actividad lechera; con una reducción equivalente a 264.000ha. Respecto a los predios remitentes registrados, existen actualmente 800 establecimientos menos que hace una década atrás. El análisis de la información oficial disponible este proceso afectó principalmente a los productores pequeños (Uruguay. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, DIEA, 2006).

## 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 4. 1. LECHE Y SU MECANISMO DE SÍNTESIS

La leche es definida como el producto íntegro obtenido del ordeño total de una hembra lactante con buena salud, buena alimentación y no agotada. Para su obtención debe ser extraída en condiciones higiénicas y posteriormente al período de producción de calostro. La leche está constituida por cuatro componentes principales:

- Lípidos, componentes esenciales de las grasas ordinarias (triacilglicéridos).
- Proteínas (caseínas, albúminas y globulinas).
- Glúcidos, esencialmente la lactosa.
- Minerales.

A ellos se añaden otros componentes numerosos, presentes en cantidades mínimas: lecitinas, vitaminas, enzimas, nucleótidos, gases disueltos. Algunos de los cuales tienen una gran importancia debido a su actividad biológica Alais, (1985).

Estos componentes son secretados como una mezcla compleja de varias fases, una emulsión de glóbulos grasos y una suspensión de micelas de caseína, todos los componentes están suspendidos en una fase acuosa. También se encuentran leucocitos los cuales representan la mayor parte de las células somáticas (Grustetti, 2001; Luquet y col., 1991).

**Cuadro 1:** Características que debe tener la leche para el consumo humano.

Punto de fusión	28/36 °C
Densidad	1,028/1,035 g/cm <sup>3</sup>
pH	6,6/6,8
Materia grasa mínima	3g/cm <sup>3</sup>
Extracto seco no graso mínimo	8,2g/100g
Punto de congelación	-5,5

Tomado de Grustetti, (2001).

**Cuadro 2:** Composición de la leche de las razas Jersey y Holando.

	Jersey	Holando	Media y D.S. del rodeo
Producción de leche (l/v/d)	16,33a	23,85b	20,09±2,84
GB (%)	5,48 <sup>a</sup>	3,77b	4,62±0,59
PB (%)	3,94 <sup>a</sup>	3,20b	3,57±0,30
Kg GB/v/d	0,885	0,896	0,890±0,156
Kg PB/v/d	0,631a	0,764b	0,697±0,078
SNG (%)	9,87 <sup>a</sup>	9,07b	9,47±0,39

a,b : letras diferentes dentro de filas indican diferencias significativas (P<0,01) Tomado de Grustetti (2001).

## 4.2. GLÁNDULA MAMARIA

La glándula mamaria o ubre, consiste en cuatro compartimientos independientes desde el punto de vista productivo cada uno con un pezón. La leche sintetizada en un cuarto glandular no puede pasar a los otros cuartos. Dentro de la ubre, la unidad funcional es el alvéolo que contiene una capa simple de células epiteliales secretorias rodeando al área central de almacenamiento denominada lumen, el cual está conectado con un sistema de ductos. Las células están rodeadas por una capa de células mioepiteliales y capilares sanguíneos. La leche es sintetizada en las células secretoras las cuales están ordenadas como una capa simple sobre una estructura esférica llamada alvéolo y varios alvéolos juntos forman lo que se conoce como lóbulo. Las células secretoras están orientadas de forma que el extremo apical, que tiene una membrana sencilla, está situado adyacente al lumen mientras que el extremo basal está separado por la membrana de la sangre y la linfa Varnam y Sutherland, (1994).

La teta está compuesta por una cisterna de la teta y el canal de la teta, donde ambos se encuentran se origina la llamada roseta de Fürstenbergs. El canal de la teta está rodeado por fibras musculares lisas. La función de estas fibras musculares es mantener el orificio cerrado entre dos ordeños sucesivos. El canal de la teta también está provisto de queratina y de otras sustancias de composición similar (Hogan, 1988; Paulrud, 2005).

La resistencia del cuarto mamario a la invasión bacteriana es en parte determinada por la estructura y función del canal de la teta. El canal de la teta normal tiene ciertas características anatómicas que impiden la penetración de bacterias. Las células que recubren el canal de la teta por ejemplo, producen queratina, fibroproteínas con componentes lipídicos que actúan barriendo los microorganismos involucrados en la mastitis. Probablemente el principal rol de este tapón ceroso es formar una barrera física que previene la penetración de bacterias. Adicionalmente algunos componentes de la queratina, como los lípidos, tienen propiedades antimicrobianas (Craven y col., 1985; Hogan, 1988; Senft y col., 1990; Zecconi y col., 2000).

La leche es sintetizada continuamente en las células secretorias y almacenada en los alvéolos, ductos lácteos y cisterna de la teta entre ordeños sucesivos. Entre 60% y 80% del volumen total de leche es almacenada en los alvéolos y los pequeños conductos lácteos, mientras que la cisterna contiene entre 20% y 40% del mismo (Knight, 1994; Pfeilsticker, 1996; Ayadi y col., 2003).

## 4. 3. COMPONENTES DE LA LECHE

### 4. 3. 1. Grasa de la leche

De acuerdo a los objetivos de este trabajo, profundizaremos en el análisis de la grasa que compone la leche. La grasa de la leche tiene una composición compleja y entre sus componentes predominan los triacilglicéridos (tres moléculas de ácidos grasos y una molécula de glicerol unidas por enlaces ésteres) que constituyen el 99% de la grasa láctea, y se encuentran pequeñas cantidades de diacilglicéridos, monoacilgliceridos y ácidos grasos libres (Cuadro 3). Estos son los encargados de los olores y sabores característicos de la leche Owen, (1996).

Los ácidos grasos que componen la leche son:

- Saturados: 60-70% (ej. palmítico, esteárico y mirístico).
- Insaturados: 25-30% (ej. oleico).
- Poliinsaturados: 4% (ej. linoleico, linolénico) Wiking, (2005).

Los ácidos grasos de la grasa se dividen en tres grupos según su origen.

- 1) Ácidos grasos obtenidos sólo a través de la síntesis “*de novo*” en la glándula mamaria bovina. (4:0, 6:0, 8:0, 10:0, 12:0, 14:0, 14:1).
- 2) Ácidos grasos obtenidos tanto de la síntesis “*de novo*” en la glándula mamaria como a partir de la sangre (16:0 y 16:1).
- 3) Ácidos grasos obtenidos solo a partir del aporte sanguíneo (18:0, 18:1, 18:2, 18:3). La conversión de 18:0 a 18:1 se produce en la glándula mamaria Wiking, (2005).

Por otra parte se encuentran cantidades pequeñas de fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol y cerebrosidos. En la leche las moléculas lipídicas se asocian para formar grandes glóbulos esféricos, denominados glóbulos grasos, que están rodeados por una capa rica en fosfolípidos. La membrana del glóbulo graso deriva de la membrana plasmática apical de las células secretoras que se incorpora a su estructura durante la secreción de la leche (Jensen y col., 1991; Varnam y col., 1994).

**Cuadro 3:** Composición de lípidos de la leche.

Lípidos	% de peso
Triacilglicéridos	95,80
1,2 Diacilglicéridos	2,25
Monoacilglicéridos	0,08
Ácidos Grasos Volátiles	0,28
Fosfolípidos	1,11
Colesterol	0,46
Esteres de colesterol	0,02

Tomado de Owen, R (1996).

El glóbulo graso de la leche se forma en las células secretoras de la glándula mamaria. Los precursores de dichos glóbulos son formados en el retículo endoplásmico y son transportados a través del citosol como pequeñas gotas de triglicéridos cubiertos por fosfolípidos polares y proteínas. En el transporte las gotas de grasa crecen de tamaño, debido a la coalescencia entre las mismas. Durante la secreción las gotas son cubiertas con la membrana plasmática y finalmente salen hacia la luz de los alvéolos Wiking, (2005). La composición de la membrana se presenta en el Cuadro 4.

Existen dos teorías diferentes para explicar la forma de secreción de las gotas de grasa. Una de ellas, considera que las gotas de lípidos alcanzan la región apical de la célula donde ellas se secretan y son cubiertas por la membrana celular. Las gotas de lípidos son gradualmente cubiertas con la membrana plasmática hasta formar un cuello estrecho de membrana y citoplasma. En este punto, ambas membranas se fusionan en el cuello y el glóbulo graso se secreta hacia el lumen alveolar. Otra teoría sugiere que las gotas lipídicas se asocian con vesículas secretorias en el citoplasma apical recubriendo el glóbulo graso, en igual forma que la caseína que debe rodearse por una vesícula secretoria y el contenido puede

ser liberado de la superficie apical por exocitosis. El primer mecanismo descrito es el que cuenta con mayor aceptación. (Wooding, 1971, 1973; Mather y Keenan, 1998).

**Cuadro 4:** Composición de la membrana del glóbulo graso.

Carotenos	0,45
Escualeno	0,61
Esteres de colesterol	0,79
TAG	53,41
AGV	6,30
Colesterol	5,20
DAG	8,14
MAG	4,70
Fosfolípidos	20,40

Tomado de Owen, R (1996).

El tamaño de los glóbulos grasos varía desde 1  $\mu\text{m}$  hasta 12  $\mu\text{m}$ , con un diámetro promedio de aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ . El diámetro medio está relacionado con el contenido graso de la leche y es mayor en la leche rica en grasas. La membrana de los glóbulos grasos estabiliza los lípidos hidrófugos en el plasma acuoso de la leche. Aproximadamente el 60% de los fosfolípidos y el 85% del colesterol de la leche se localizan en la membrana, que también contiene cantidades elevadas de algunas enzimas lácteas como la fosfatasa alcalina y la xantinoxidasa. La composición lipídica de la membrana del glóbulo graso es similar a la de la membrana plasmática de la cual proviene O'Mahony y col., (2005).

La materia grasa es uno de los componentes más variables de la leche ya que se modifica con estado de lactancia, edad, alimentación, estado nutricional, raza, etc. Puede observarse que la leche de la raza Jersey tiene 5,3% de materia grasa y mientras que la de Holando 3,6%. Este amplio grado de variación se aprovecha con el cruzamiento entre estas dos razas con la obtención de un biotipo medio para esa característica Hazard, (1997).

La alimentación es muy importante en cuanto a la incidencia del porcentaje graso de la leche, dietas con alto suministro de concentrados conducen a una reducción en el contenido graso. Por el contrario, dietas ricas en forraje permiten obtener una leche con mayor contenido graso. Las modificaciones en la relación forraje/concentrado se manifiestan en cambios en la concentración de grasa butirosa en un amplio rango de 2,0% a 4,0% Hazard, (1997).

Independientemente del sistema de alimentación, la leche producida por la raza Jersey presenta, en promedio, un 9% más de AG saturados totales y menores valores de AG insaturados totales, CLA y Omega 3, con reducciones de 4%, 26% y 5%, respectivamente, cuando se compara con la proveniente de vacas de la raza Holando Grustetti, (2001).

#### 4.3.1.1. Separación natural de la grasa de la leche.

La leche puede separarse de forma natural aprovechando sus características físico-químicas propias y en el caso de la leche bovina la separación se ve favorecida por la presencia de crioglobulinas. Este proceso de separación es utilizado en la elaboración de algunos tipos de queso Europeos como el Parmigiano-Reggiano y el Grana-Padano en forma artesanal o industrial. Esta forma de separación por gravedad tiene efecto no solamente sobre

el contenido de grasa de la leche utilizada para el proceso, sino que también permite una selección por tamaño de glóbulo graso reduciendo el tamaño promedio de la grasa remanente para la elaboración del queso. Este resultado es consecuencia de las diferencias en densidad de la grasa en relación con los otros componentes de la leche, de los glóbulos grasos de acuerdo a su tamaño y de la acción de las crioglobulinas que permiten la unión entre glóbulos acelerando de esta forma la separación por gravedad O'Mahony, (2005).

Las investigaciones realizadas por O'Mahony, (2005) donde comprobó que al dejar la leche bajo la influencia de la gravedad, los glóbulos grasos se distribuyen de acuerdo a su tamaño de la siguiente manera: en un período de 2 horas los glóbulos grasos más grandes se encuentran en el estrato superior pasando a ser el diámetro promedio de 3,13  $\mu\text{m}$  a 3,48  $\mu\text{m}$  y 3,64  $\mu\text{m}$  según se trabaje a 4°C o a 15°C, respectivamente. Luego de este tiempo no hubo cambios significativos en el diámetro promedio de los glóbulos grasos del estrato superior pero sí se detectaron cambios en el porcentaje de grasa pasando de un 26,6% a un 58,8% luego de 24 hs a 4°C.

En las fracciones situadas por debajo de la capa superior, a mayor tiempo de separación existen mayores cambios en el diámetro de los glóbulos grasos, siendo los mismos cada vez menores. También se producen mayores cambios en el porcentaje de grasa (este valor decrece con el tiempo); principalmente en la fracción inferior. Después de 48 horas a 4°C el diámetro de los glóbulos grasos en dicha fracción paso de 3,23  $\mu\text{m}$  a 1,16  $\mu\text{m}$  y el porcentaje de grasa paso de 3,75% a 0,20% O'Mahony, (2005).

Se ha descrito que al emplear el método de separación por gravedad no solo se remueve la grasa de la leche sino además se remueve una proporción de los microorganismos presentes en la leche cruda, debido a que en la fracción descremada se detectó un descenso de entre un 5% a un 10% de microorganismos los cuales se encontrarían en el sobrenadante (Rossi, 1964; Dellaglio y col., 1969).

En lo que respecta al comportamiento de las células somáticas se observó en el estudio realizado por Fossa y col., (2004) que el mayor porcentaje de las mismas se encuentran en la superficie junto con los glóbulos grasos, lo cual permitiría disponer de una fase parcialmente descremada con menor conteo de células somáticas. Este cambio redundará posteriormente en las modificaciones de la composición del producto por los efectos enzimáticos asociados a los altos conteos de células somáticas que afectan el proceso quesero. Esta disminución de dichas células en la fase parcialmente descremada se debe a que tanto el glóbulo graso como las células somáticas presentan afinidad entre sus membranas, y dado que el glóbulo graso tiende a dirigirse a la capa superior por presentar menos densidad, éste llevaría consigo a las células somáticas Ma y col., (2000).

Bottazi, (1968) ha indicado que el remplazar la separación por gravedad con el método de centrifugación y tratamiento térmico puede influir en la calidad de la coagulación de leche para la producción de quesos. La separación por gravedad además produce una leche semi descremada que posee una mayor proporción de glóbulos grasos de menor tamaño que la producida por el método de centrifugación y tratamiento térmico.

Los glóbulos grasos pequeños tienen mayor proporción de membrana por unidad de masa que aquellos de mayor tamaño. La mayor superficie de membrana por unidad de peso de grasa y la mayor proporción de membrana del glóbulo graso puede modificar el proceso de lipólisis que es crucial para el desarrollo del sabor en algunos quesos italianos. Además, el

mayor porcentaje de volumen de grasa contenido en el glóbulo graso de tamaño pequeño y la mayor área específica de superficie en la leche separada por el método gravitacional en relación con la separada por centrifugación pueden producir un mayor desarrollo de sabor específico en los quesos italianos que la utilizan en el proceso Walstra, (1995).

En este trabajo se pretende estudiar el proceso de separación gravitacional de la grasa de la leche en dos razas lecheras (Holando y Jersey) utilizando activación térmica como tratamiento y evaluar los cambios en la calidad de leche durante el período de almacenaje.

#### 4. 3. 2. Proteínas de la leche

Las proteínas de la leche son de dos tipos, proteínas del suero lácteo y caseínas. La concentración proteica de la leche varía entre el 3% y el 4%, dependiendo del nivel de producción y de la genética del animal. Las caseínas constituyen más del 80% de las proteínas totales de la leche aunque la proporción relativa de proteínas del lactosuero frente a caseínas varía según el estado de lactación. La leche producida en los primeros días después del parto y hacia el final de la lactación tiene un contenido de proteínas del suero mucho mayor que la leche de mitad de lactación, este incremento está acompañado de niveles elevados de proteínas del suero sanguíneo Luquet, (1991).

Las caseínas de la leche se pueden subdividir básicamente en cuatro tipos, caseínas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ . Todas ellas se sintetizan en la glándula mamaria. La caseína  $\gamma$  se origina en la proteólisis post-traslacional de la caseína  $\beta$  por la acción de las proteinasas nativas de la leche, principalmente la plasmina o de la actividad proteolítica de las bacterias Amiot, (1991).

El carácter anfifílico (propiedad de las proteínas que les confiere una afinidad ambivalente hacia el agua y los lípidos, permitiendo que estos últimos se mantengan en suspensión en medio acuoso) de las caseínas y su fosforilación facilitan las interacciones entre ellas y con el calcio para formar complejos esféricos altamente hidratados conocidos como micelas. Su tamaño es variable, oscilando su diámetro entre 30 y 300 nm. El 92% del contenido proteico de las micelas está constituido por caseínas  $\alpha_{s1}$  y  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$  con una relación media de 3:1:3:1 Amiot, (1991).

Se han propuesto varios modelos para la micela de caseína, Varman, (1994) supone a la micela de caseína constituida por un agregado de sub-micelas casi esféricas que a su vez están formadas por agregados de moléculas de caseína. El fosfato de calcio y las caseínas  $\alpha$  y  $\beta$  se unen al participar los grupos fosfoserina en la estructura del fosfato cálcico. La caseína  $\kappa$  se localiza en la superficie de la micela o muy cerca de ella. La zona hidrofóbica de la molécula de caseína  $\kappa$  se une hacia el interior de la micela, mientras el macropéptido hidrofílico forma una capa de filamentos "pilosos" altamente hidratados, que se proyectan en la fase acuosa de la leche. Los filamentos de caseína  $\kappa$  son responsables de la estabilización esférica de las micelas de caseína.

El contenido de proteína de la leche también presenta variación dentro de la misma raza y entre las razas lecheras. A modo de ejemplo, la raza Holando tiene un promedio de 3,2% de proteína cruda y la raza Jersey un 3,9%. Para mejorar esta característica se realizan cruzamientos selectivos y en menor grado la alimentación, debido a que alimentaciones con mayores niveles energéticos llevan a un aumento del porcentaje de proteína en leche. Sin embargo, el mejoramiento genético para esta característica es más lento que para el caso de la grasa Hazard, (1997).

Cabe destacar que el 60% de la variación de los componentes de la leche es hereditaria y el resto es debido al medio ambiente. Esto explica la importancia que tiene la selección de reproductores o los cruzamientos para mejorar, en las futuras generaciones, la composición de la leche del rodeo Kruze, (2002).

#### 4. 3. 3. Carbohidratos de la leche

La lactosa es el carbohidrato mayoritario en la leche. Este azúcar se encuentra en la leche de todos los mamíferos y es característico de este alimento. La leche contiene trazas de otros carbohidratos, principalmente en la forma de monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos. Además, en la leche se encuentran algunos compuestos glucídicos como las hexosaminas y el ácido N-acetilneurámico, que fundamentalmente están unidos a proteínas y cerebrosidos. Su principal origen está en la glucosa de la sangre, el tejido mamario la isomeriza en galactosa y la liga a un resto de glucosa para formar la molécula de lactosa. La isomerización se hace mediante el paso por dos formas intermedias: glucosa-fosfato y UDP.-glucosa Walstra y col., (1999).

#### 4. 3. 4. Minerales y Vitaminas

En el Cuadro 5 se presentan las concentraciones de las principales vitaminas y minerales presentes en la leche.

**Cuadro 5.** Concentraciones minerales y vitamínicas en la leche (mg/100ml).

Potasio	138	Vit. A	30,0
Calcio	125	Vit. D	0,06
Cloro	103	Vit. E	88,0
Fósforo	96	Vit. K	17,0
Sodio	8	Vit. B1	37,0
Azufre	3	Vit. B2	180,0
Magnesio	12	Vit. B6	46,0
Minerales trazas <sup>2</sup>	<0,1	Vit. B12	0,42
		Vit. C	1,7

<sup>1</sup> ug = 0,001 gramo.

<sup>2</sup> Incluye cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc, selenio, yodo y otros.  
Tomado de Walstra y col., (1999).

La leche es una excelente fuente de minerales requeridos para el crecimiento del lactante. La absorción del calcio y fósforo es generalmente alta, en parte debido a que se encuentran en asociación con la caseína de la leche. Como resultado, la leche es la mejor fuente de calcio para el crecimiento del esqueleto del lactante y el mantenimiento de la integridad de los huesos en el adulto. Otro mineral de interés en la leche es el hierro. Las bajas concentraciones de hierro en la leche no alcanzan a satisfacer las necesidades del lactante, pero este bajo nivel pasa a tener un aspecto positivo debido a que limita el crecimiento bacteriano en la leche, dado que el hierro es esencial para el crecimiento de muchas bacterias Walstra y col., (1999).

#### 4. 4. CALIDAD DE LECHE

En relación a los requisitos específicos de la leche, se establece que "la leche es el producto de la secreción mamaria normal de vacas sanas, bien alimentadas y en reposo, exenta de calostro", y deberá cumplir con los siguientes requisitos: caracteres organolépticos normales, exenta de sustancias extrañas, sangre, pus, antisépticos, antibióticos y sustancias alcalinas; peso específico de 1,028 – 1,034 a 20°C, índice crioscópico de -0,512 a -0,560, acidez de 16 a 21 ml de hidróxido de sodio N/10 por 100 ml de leche, y contenido mínimo de sólidos no grasos de 82,5 g/litro. pH medio de 6,6 variando entre 6,5 y 6,8, siendo acentuadamente ácida en el calostro (menor a 6,4) y menos ácido al final de la lactación (6,8 o mayor). El recuento bacteriano en placa de la leche cruda no deberá ser superior a 1.000.000 ufc/ml, en tanto que para la leche pasteurizada el recuento bacteriano en placa no deberá exceder de 10.000 ufc/ml, no contener más de 10 coliformes/ml y estar exenta de *E.coli*, *Salmonella* y *Staphylococcus Kruze*, (2002).

##### 4.4.1. Importancia de la calidad de la leche cruda en la fabricación de productos lácteos

Debemos precisar primeramente que cuando hablamos de calidad debe considerarse el tema en el más amplio sentido de la palabra, como ser: autenticidad que implica el ordeño completo de vacas lecheras sin adulteración ni conservadores, seguridad, es decir, exenta de productos tóxicos, plaguicidas, radiactividad, y finalmente composición e higiene. Esto está determinando la aptitud para el uso de la leche según el producto a que sea destinada Ibarra, (2002).

Desde el punto de vista tecnológico la calidad se define como "El conjunto de propiedades y características de un producto o servicio que le confieren la aptitud para satisfacer necesidades explícitas e implícitas" Normas de la International Organization for Standardization (ISO), (2002). Se trata de un complejo heterogéneo de factores de calidad con influencia sobre las propiedades nutritivas, tecnológicas, higiénicas y de utilización de la leche cruda y de los productos lácteos preparados a partir de ella.

El término de calidad aplicado a la leche puede tener diferentes significados para los diferentes consumidores del producto, dependiendo de si están interesados en una sola propiedad o en varias propiedades de la leche. Todos los diferentes consumidores (industria, microbiólogos, inmunólogos, etc.) ponen énfasis en diferentes propiedades de la leche y rechazan otras Cersovsky y col., (1980).

Para exponer los puntos más importantes de la calidad de la leche cruda es necesario partir de las exigencias que el consumidor tiene con respecto a la calidad de los productos lácteos. Sobre todo en la leche fluida y productos lácteos las exigencias son máximas en lo concerniente a una nutrición sana, por lo que, junto con los aspectos nutritivos los parámetros referentes a higiene y análisis de residuos juegan un papel decisivo en la determinación de la calidad de la materia prima Cersovsky y col., (1980).

Los criterios aplicables a la leche cruda que determinan su aptitud para el tratamiento industrial y la calidad de los productos obtenidos son:

- 1- Ausencia absoluta de sustancias que puedan actuar perjudicialmente sobre la salud del consumidor, como sustancias extrañas y residuos de productos nocivos, ejemplos: pesticidas, medicamentos, toxinas microbianas, etc.

- 2- Capacidad normal de acidificación, es decir ausencia de sustancias inhibidoras de acción antibióticas que puedan afectar al consumidor o los procesos de fermentación de algunos productos (yogurt, quesos).
- 3- Escaso contenido de gérmenes como requisito fundamental para obtener productos con capacidad prolongada de conservación (vida útil).
- 4- Escaso contenido celular, como expresión de una composición normal de la leche sin alterar por mastitis ni trastornos secretorios.
- 5- Caracteres organolépticos adecuados.
- 6- Escaso o nulo número de gérmenes tecnológicamente indeseables, especialmente coliformes y esporulados.
- 7- Composición bioquímica normal como requisito previo para una deseable aptitud para la transformación (estabilidad proteica, capacidad de coagular, aptitud para la fabricación de mantequilla, etc.).

Entre las características que determinan la calidad de la leche cruda, la presencia de sustancias extrañas e inhibidoras, constituyen en la actualidad un problema importante a la hora de la elaboración y la calidad de los productos terminados Cersovsky y col., (1980).

Las características organolépticas del producto como el olor, sabor, y aspecto de los alimentos son particularmente considerados por el consumidor. En la producción del olor y sabor de la leche cruda de buena calidad participan un gran número de compuestos químicos. De los 200 componentes que aproximadamente constituyen la leche solo generan olor y sabor los ácidos grasos libres, aminos, sulfuros, lactonas y cetonas Cersovsky y col., (1980).

En los productos ricos en grasas (manteca, leche condensada y crema) se produce con frecuencia un llamado efecto de adición, ya que ciertas sustancias aromáticas se unen mediante absorción como compuestos orgánicos sobre todo a los glóbulos de grasa y se disuelven menos en la fase acuosa. A estos efectos, debe considerarse la superficie "activa" de los glóbulos de la leche debido a su fina fragmentación, de esta manera queda claro con que extraordinaria facilidad pueden verse influidos el olor de la leche por sustancias aromáticas extrañas a través del aparato circulatorio del animal y de su entorno una vez efectuado su ordeño Cersovsky y col., (1980).

La importancia de la cantidad de microorganismos como factor higiénico y tecnológico obedece a dos circunstancias:

1- influir sobre la calidad de los productos terminados a través de la actividad metabólica de los microorganismos que resisten la acción del proceso industrial.

2- cargar la leche cruda de productos metabólicos microbianos que no son destruidos en el transcurso del proceso tecnológico normal y que influyen decisivamente sobre la capacidad de la elaboración y calidad de los productos terminados Jay, (2000).

Sobre la primera circunstancia, cabe destacar que los procedimientos habituales de calentamiento (pasteurización y termización) no eliminan por completo los microorganismos. La pasteurización, uno de los métodos más comunes de conservación de los alimentos, es mediante un calentamiento que destruye los microorganismos y las enzimas que los dañan. El tratamiento térmico requerido no es único ya que se pueden emplear varias condiciones de tiempo y temperatura para lograr el objetivo: L.T.L.T. corresponde a un tratamiento a 65°C por un lapso de 30 minutos; H.T.S.T. corresponde a un tratamiento a 75°C por 15 segundos y U.H.T. lo sería a 140°C por 3 segundos. En lo que a termización respecta es un tratamiento

térmico que consiste en llevar la leche a una temperatura entre 63 a 65°C por un lapso de 15 segundos Jay, (2000).

Particularmente en el calentamiento de la leche cruda se produce una selección de gérmenes termo-resistentes. Entre ellos se encuentran esporulados aerobios que en ocasiones resisten incluso temperaturas muy elevadas (UHT), provocando luego el deterioro de productos lácteos conservados durante su vida útil. Por ser los gérmenes esporulados aerobios (*Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*) generalmente muy sensibles a los ácidos, su importancia higiénica afecta sobre todo a la leche reconstituida, con tratamientos térmicos severos, hervida o esterilizada cuando falta la acción inhibitoria de microorganismos productores de ácido láctico. También tiene importancia la presencia de especies esporuladas del género *Clostridium*, por lo general presentes en menor número. Uno de los bacilos provenientes del medio se denomina *Clostridium tyrobutiricum* que se multiplica en forma abundante en los ensilados de mala calidad, y puede ser causa de pérdidas económicas elevadas en la producción de quesos duros como consecuencia de la aparición del defecto denominado hinchazón tardía. También reviste importancia médica la presencia de *Clostridium sporogenes*, microorganismo proteolítico que además de plantear dificultades tecnológicas en la industria elaboradora de quesos duros (putrefacción del queso), es capaz de originar trastornos digestivos Cersovsky y col., (1980).

El segundo aspecto citado se refiere a la producción y acumulación de sustancias metabólicas microbianas en la leche cruda antes de su transformación, cuyas consecuencias son el deterioro de la materia prima y la calidad de los productos obtenidos. Resulta importante el hecho de que los productos metabólicos de los microorganismos no sean destruidos por la pasteurización y sean causa inmediata de la descomposición microbiana. Las acciones sobre la calidad de los productos pueden ser de naturaleza sensorial, tecnológica y toxicológica. También pueden existir sustancias inhibitorias antibióticas y microbianas Cersovsky y col., (1980).

Al modificarse el equilibrio en que se hallan los componentes de la leche se alteran sensiblemente los procesos tecnológicos lo que se puede evidenciar con posterioridad en la calidad de los productos elaborados. De estas alteraciones podemos enumerar muchas, por ejemplo: errores de alimentación, enfermedades metabólicas del animal, inflamaciones mamarias, fase de la lactación y edad de las vacas. Entre las citadas la causa mejor estudiada actualmente son las inflamaciones mamarias. La leche de vacas con inflamación mamaria se caracteriza en términos generales por un elevado número de leucocitos y por modificaciones marcadas en su composición Cersovsky y col., (1980).

Estas modificaciones pueden afectar la aptitud de la leche para la elaboración de quesos, la estabilidad ante la acción del calor particularmente cuando se elaboran productos de larga vida, la actividad acidificante y formación de aroma por los cultivos de acidificación y maduración, la capacidad de almacenaje de la manteca, así como las características del sabor en especial de la leche fluida Cersovsky y col., (1980).

La presencia de residuos de antibióticos en la leche crea numerosos problemas, ya sea a nivel tecnológico como de salud pública. Para propósitos de pago de leche, la presencia de antibióticos se sanciona frecuentemente con la reducción o penalización al productor, mientras que para propósitos de salud pública, la leche conteniendo antibióticos está prohibida. Se realizan rutinariamente su detección en los laboratorios de las industrias lácteas, especialmente en aquellas que van a utilizar la leche para la elaboración de queso y yogurt. El

uso regular del control de antibióticos disminuye la incidencia de muestras positivas. Castañeda (2002) estima que en la actualidad esa incidencia es del 1 al 5% en Argentina.

#### 4. 4. 2. Células Somáticas de la leche

Una reacción inflamatoria causada por la infección del tejido mamario está siempre asociada con un aumento del conteo de células somáticas en la leche. El aumento de células somáticas es un indicador directo de la calidad de la leche y de la salud de la glándula mamaria (Kitchen, 1981; Kehrlí y col., 1994; O'Brien y col., 1999).

El término somático alude al hecho de que son células provenientes del cuerpo. Las células somáticas es un término que refiere a los linfocitos, neutrófilos, leucocitos y macrófagos que son atraídos hacia el interior de la glándula mamaria por la actividad de microorganismos a fin de combatir a estos, aumentando de esta manera el recuento de células somáticas. Coldevella (2003) también hace referencia a una pequeña proporción de células epiteliales contenidas en este conjunto celular. La leche de una ubre sana tendría menos de 100.000 células por mililitro. De todas las células de la leche de un cuarto con una mastitis clínica, aproximadamente el 99% serán leucocitos, mientras que el resto serán células secretoras que se originan de los tejidos de la glándula mamaria. Conjuntamente, esos dos tipos de células constituyen la cuenta de células somáticas de la leche que comúnmente es expresada por mililitro (Hillerton, 1999; Philpot, 2001).

**Cuadro 6. Porcentaje de leucocitos en leche normal.**

Tipos	Porcentaje
Macrófagos	60
Linfocitos	20
Neutrófilos	20

Tomado de Philpot, W. 2001; Wolter y col., 2004.

Una elevación en el conteo de células somáticas puede resultar en cambios composicionales de la leche y en una reducción de la producción de esta. En nuestro país podemos estimar que las pérdidas por mastitis son de un 8% a 10% de leche producida. Tomando como referencia el trabajo hecho por Giannechini y col (2002) en el cual estudian las pérdidas de leche causadas por mastitis y haciendo una proyección con los datos del año 2006 podemos suponer que las pérdidas de leche en nuestro país alcanzaron los 160 millones de litros en dicho año. El aumento del recuento de células somáticas no se debe exclusivamente a la infección intramamaria, otros factores no infecciosos como la edad del animal, tiempo de lactación, alimentación, ciclo reproductivo también pueden llevar al aumento del número de estas células (McDonald y col., 1981; Laevens y col., 1997).

El contenido de células somáticas es un indicador de la salud de la glándula mamaria ampliamente utilizado para detectar la presencia de mastitis subclínica, siendo también una medida para determinar la calidad de la leche Harmon, (1994).

Un cuarto de la glándula mamaria sano no muestra ninguna alteración patológica externa, su leche no contiene microorganismos patógenos y mantiene un nivel de células somáticas menor de 100 mil por mililitro Wolter y col., (2004).

**Cuadro 7.** Diagnóstico de un cuarto según el conteo de células somáticas.

Conteo de células somáticas	Diagnóstico
Hasta 100.000	Sana, leche normal
De 100.000 a 200.000	Sospechoso, nivel superior fisiológico
Más de 200.000	Mastitis, leche anormal

Tomado de Wolter y col., (2004).

El recuento celular se ha usado como indicador de mastitis durante casi un siglo. Prescott y Breed en 1910 fueron los primeros en utilizar el microscopio para el recuento directo de células somáticas. En la actualidad, el recuento directo utilizando el microscopio se mantiene como método de referencia, ya que la mayoría de los conteos se realizan por métodos electrónicos James y Booth, (1995).

La leche con recuento elevado de células tiene un nivel elevado de las enzimas indeseables como la lipasa y la plasmina. La lipasa hidroliza la grasa, produce un sabor rancio en presencia de oxígeno, inhibe los cultivos iniciadores del yogurt y disminuye la vida útil de la leche. La plasmina reduce la cantidad de caseína en la leche y reducirá el rendimiento quesero de la misma. La plasmina mantiene su actividad en la leche aún en condiciones de almacenamiento bajo refrigeración y después de la pasteurización (Schalm y col., 1971; Blowey y Edmondson, 1995).

Un número elevado de células somáticas tiene un efecto marcado en los productos terminados, ya que conduce a la modificación de la composición de los sólidos no grasos y de la grasa butírica, logrando en la leche que sea susceptible al desarrollo de sabores desagradables. Los productos procesados de leche con alto número de células somáticas no van a ser de alta calidad, teniendo efecto sobre los parámetros tecnológicos del proceso quesero. Además de que los quesos van a tener un tiempo de producción largo, más grasa y proteína se pierde en el suero y el rendimiento es menor. La vida útil de almacenamiento de estos productos es menor, y es frecuente la mayor presencia de defectos García, (2003).

#### 4. 4. 3. Microorganismos de la leche

Los microorganismos de la leche pueden agruparse en cuatro tipos: bacterias no patógenas; bacterias formadoras de ácido láctico que se asocian a los procesos de fermentación; bacterias de deterioro, y bacterias patógenas. Estas últimas son peligrosas para la salud del consumidor, porque provocan enfermedades o procesos infecciosos, los más importantes a destacar son la salmonelosis, brucelosis, listeriosis, tuberculosis entre otras. (Ministerio de Agricultura, Instituto de Investigación y Extensión Agraria de Perú). Estos grupos pueden tener diferente respuesta ante las temperaturas a que están sometidos una vez culminado el ordeño y hasta su procesamiento industrial, agrupándose en:

1) Microorganismos mesófilos. Los mesófilos constituyen un grupo importante por incluir a los microorganismos acidificantes (bacterias ácido lácticas), y crecen a temperatura entre 20 y 45 °C, con temperatura óptima alrededor de 30-40 °C. Silveira y col., (1998).

2) Microorganismos termófilos. Su punto óptimo de crecimiento se encuentra entre los 55 a 65 °C y pueden llegar a crecer dentro de un rango que va desde 35 a 75-90 °C. Silveira y col., (1998).

3) **Microorganismos psicrótrofos.** Los psicrótrofos son definidos por Collins (1981) citado por Silveira (1998) de acuerdo a las normas de la International Dairy Federation, como aquellos microorganismos capaces de crecer a temperaturas menores a 7°C independientemente de cual fuere su temperatura óptima de crecimiento.

Los diferentes microorganismos alcanzan la leche por dos vías principales: la vía mamaria y el medio externo. Los microorganismos que alcanzan la glándula mamaria, lo pueden hacer por vía ascendente o descendente y a su vez pueden llegar a la leche andes o después del ordeño. Por vía ascendente, lo hacen bacterias que se adhieren a la piel de la ubre y posterior al ordeño entran a través del esfínter del pezón, es por ello que cualquier lesión que afecte la integridad del mismo facilitará un aumento en la contaminación (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, y microorganismos coliformes). La vía descendente o hematógena, la utilizan los microorganismos que producen enfermedad sistémica, llegando por la sangre a la mama, infectando la ubre a través de los capilares mamaros. (*Salmonella*, *Brucella*, *Mycobacterium tuberculosis*) Blowey y col., (1995).

Los contaminantes provenientes del medio externo, se incorporan a la leche una vez que ésta ha sido extraída de la glándula mamaria. Las principales fuentes de contaminación de la leche cruda son: el animal, el aire, el agua, el suelo, el ordeñador, la presencia de estiércol, los utensilios utilizados en el proceso y el transporte de la leche. En forma teórica, la leche al salir del pezón debería ser estéril, pero normalmente contiene entre 100 y 10.000 bacterias/ml; una carga microbiana baja que puede no llegar a multiplicarse si la leche es manipulada adecuadamente Blowey y col., (1995).

Una vaca enferma de mastitis clínica, puede producir leche con  $10^7$  bacterias/ml y con mastitis subclínica, de  $10^5$  a  $10^6$  bacterias/ml. *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Streptococcus uberis* son bacterias comúnmente asociadas a cuadros de mastitis. Igualmente, aunque poco frecuente, pueden causar mastitis *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Serratia*. Uno de los microorganismos más frecuentemente causante de mastitis es el *Staphylococcus aureus*, resistente al tratamiento antibiótico común y es capaz de producir una enterotoxina, que por su termo-resistencia no es destruida en la pasteurización, pudiendo llegar a causar enfermedad en el consumidor. Blowey y col., (1995).

El aire representa uno de los medios más hostiles para la supervivencia de los microorganismos, debido a la constante exposición al oxígeno, cambios de temperatura y humedad relativa y a la radiación solar. Es por ello que solo aquellos microorganismos resistentes podrán ser capaces de permanecer en el aire y llegar a contaminar los alimentos. Los microorganismos Gram negativos mueren rápidamente mientras que los Gram positivos y aquellos esporulados pueden persistir por largo tiempo. En el aire se pueden encontrar *Micrococcus*, *Streptomyces* y esporas de hongos como *Penicillium* y *Aspergillus*. Las levaduras raramente se encuentran en suspensiones aéreas. Blowey y col., (1995).

El agua utilizada para la limpieza de los equipos y utensilios de ordeño, la higiene del animal y del personal, puede incidir en la presencia de microorganismos en leche. El agua puede ser una fuente importante de microorganismos psicrófilos (*Pseudomonas*) y por contaminación de ésta, de bacterias coliformes. Además del agua, el suelo es la principal fuente de microorganismos termodúricos y termófilos. La leche nunca entra en contacto con el suelo, pero sí los animales, utensilios y personal, de manera que es a través de ellos que los microorganismos como *Clostridium* pueden alcanzar a contaminar la leche. Amiot, (1991).

El ordeñador puede llegar a jugar un papel importante en la contaminación de la leche, sobre todo cuando el ordeño es manual. Se ha señalado al ordeñador como responsable de la contaminación de la leche con microorganismos patógenos (*S. Aureus*, *Leptospiras*, *E. coli*, *M. tuberculosis*, *Streptococcus*, etc.). Las heridas infectadas en manos y brazos pueden ser fuentes de algunos de estos microorganismos Amiot, (1991).

El estiércol es la fuente principal de microorganismos coliformes. Estos pueden alcanzar la leche a través del animal o del ordeñador así como también por medio de los utensilios mal higienizados Jay, (2000).

El contacto de la leche con el material de ordeño y su permanencia en los tanques y transporte, puede multiplicar por un factor de 2 a 50 la flora microbiana presente. De allí que la higiene adecuada de estos, por medio de agentes desinfectantes, afecta significativamente la calidad sanitaria de la leche. La flora microbiana proveniente de esta fuente puede ser diversa, pero la más frecuente es flora termorresistente, razón más que suficiente para exigir al máximo la higiene. Una vez que los microorganismos han alcanzado la leche, comienza un periodo de adaptación de éstos al medio circundante. La duración de este periodo así como la capacidad para multiplicarse, esta condicionada al efecto de varios factores intrínsecos, extrínsecos e implícitos Jay, (2000).

Un factor que afecta a la grasa de la leche, se asocia a las modificaciones biológicas que se presentan durante la refrigeración. Los métodos de refrigeración de la leche de granja en tanques refrigerados y la colecta por parte de los camiones cisterna, influyen considerablemente en la naturaleza de la flora microbiana de la leche cruda. Antes de la implantación de dichos métodos, la flora predominante estaba constituida por bacterias lácticas. Con el advenimiento de nuevas técnicas de conservación, se produjo indirectamente la selección de la flora cuya temperatura de crecimiento permite propagarse a temperaturas bajas (psicrótrofos) comparándolas con el resto de los microorganismos Luquet y col., (1991).

A pesar de la presencia de sistemas antimicrobianos en la leche y la temperatura de almacenamiento, igualmente se observa el crecimiento de un amplio rango de microorganismos en la leche durante el periodo comprendido entre el ordeño y su industrialización en planta Capra, (2000).

La leche se almacena en los establecimientos, en tanques refrigerados por diferentes tiempos de acuerdo al sistema de recolección, manteniendo la temperatura por debajo de 4°C. Un número relativamente elevado de géneros microbianos, pueden crecer entre 5 y 7° C; dentro de los cuales son más frecuentes las especies psicrótrofas Gram negativas principalmente *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Microbacterium* y *Alcaligenes*. Los psicrótrofos se multiplican en todas las condiciones de mantenimiento, pero su número aumenta considerablemente cuando se añade la leche recién ordeñada, por que ésta incrementa la temperatura de la leche que se encuentra en el tanque del ordeño anterior y ello conduce a un mayor crecimiento bacteriano, hasta el momento que la leche alcanza nuevamente los 4°C, temperatura en la cual cesa el crecimiento de los psicrótrofos. Si el crecimiento continúa durante el almacenamiento, las propiedades de la leche procesada pueden verse afectadas negativamente por las enzimas proteolíticas y lipolíticas que secretan los psicrótrofos durante su crecimiento. Un problema más grave aún, es la resistencia térmica de las enzimas producidas por los psicrótrofos que pueden originar cambios perjudiciales en

la leche y los productos lácteos, durante el almacenamiento posterior al tratamiento térmico (Revelli, y col., 2004; Jay, 2000).

La pasteurización de la leche, es un tratamiento térmico efectivo para la destrucción de los microorganismos patógenos. Sin embargo, el hábito de consumir leche cruda y la elaboración de quesos con leches no tratadas, han causado la presentación de cuadros de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) a nivel mundial. Los brotes de ETA hasta la década de los 70', eran atribuidos principalmente a patógenos clásicos, tales como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. y *Bacillus cereus*. Durante los últimos 10 a 15 años se han aislado además, como agentes responsables, los denominados "patógenos emergentes", que incluyen bacterias tales como *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* O157:H7 Ryster, (1998).

De todos estos microorganismos, la detección de *L. monocytogenes* ha alertado a las autoridades sanitarias, por la gravedad con que se presenta el cuadro de ETA, que en un 30% de los casos causan la muerte del individuo y en la mayoría de los mismos el alimento involucrado ha sido de origen lácteo. La listeriosis, puede ocurrir en adultos y niños en buen estado de salud, siendo las mujeres embarazadas un grupo de alto riesgo, en las cuales esta bacteria puede inducir abortos o nacimientos prematuros, que tienen como secuelas la hidrocefalia y deficiencia mental. Otro grupo altamente susceptible son las personas inmunocomprometidas y de la tercera edad. Entre las diferentes especies incluidas en el género, *Listeria monocytogenes* es la única implicada en patología humana. (Beltrán, y col., 1991; Scott y Bernard, 1999).

El patógeno tiene como característica su capacidad para desarrollarse a temperaturas de refrigeración, en presencia de altas concentraciones de cloruro de sodio. Presenta además, mayor resistencia térmica en comparación a otras bacterias patógenas no esporuladas. "Su resistencia a altas temperaturas, llevó a considerar la necesidad de aumentar los estándares de pasteurización de la leche. Ello debido a un brote de listeriosis ocurrido en Estados Unidos en 1983, asociado al consumo de leche pasteurizada" Bradshaw y col., (1985). Sin embargo, numerosos estudios posteriores demostraron que la pasteurización a 75 °C durante 15 o más segundos, son suficientes para destruir el bajo número de células de *L. monocytogenes* habitualmente presentes en leche cruda. El aislamiento de la bacteria en productos lácteos pasteurizados obedecería por lo tanto a un proceso deficiente o a una recontaminación post tratamiento térmico. (Fleming y col., 1985; Farber y col., 1988; Fedio y Jackson, 1989; Vivas, 1999).

#### 4.5. CADENA PRODUCTIVA LÁCTEA (desde la vaca hasta la industria).

El sistema productivo lácteo del país, tiene una base pastoril y por estar junto a uno de los graneros del mundo (Argentina), tienen la posibilidad de disponer del uso estratégico de granos en los momentos en que su precio internacional lo permite. Por otra parte, se debe tener en cuenta siempre que el productor lechero debe obtener de su actividad la mayor rentabilidad posible, por lo que su objetivo principal debe ser el aumento de su rentabilidad y no el aumento de la producción individual de sus vacas López de Matos, (2002).

Para un aumento de la rentabilidad del negocio, un camino es la disminución de los costos, dentro de éstos la producción de alimentos y la alimentación de un rodeo es responsable de la

mayor proporción (50 a 60%) de los costos variables. Los costos de producción de leche, son inversamente proporcionales a la participación de pasto en la dieta. La maximización de la utilización de pasturas, puede reducir los costos de producción de leche, principalmente por la reducción de los gastos y suministro de los alimentos concentrados, así como en los combustibles y la mano de obra López de Matos, (2002).

Sin embargo, el peso creciente de la calidad de la materia prima para la elaboración de productos de exportación, requiere en forma creciente de una mejora continua y por tanto, deben considerarse todos los aspectos de la cadena que inciden en el logro de productos de calidad López de Matos, (2002).

#### 4. 5. 1. Ordeño

La leche es un alimento muy delicado cuya calidad sólo puede mantenerse, si se conserva en un medio favorable y en las mejores condiciones. Las vacas lecheras deben de estar sanas, limpias y alojadas en locales adecuados. El ordeño y la refrigeración de la leche, deben efectuarse utilizando los equipos apropiados y limpios. El éxito de estas operaciones depende principalmente de las precauciones tomadas por el productor. Laborde M, (2002).

En suma, se espera que un ordeño eficaz permita extraer la leche de la ubre del modo más completo, higiénico, rápido y delicado. Completo, para garantizar la obtención de la mayor producción de leche en términos de cantidad y calidad. Higiénico, para obtener la leche con la más baja carga microbiana, controlar el contagio entre pezones y animales eventualmente enfermos y mantener un ambiente que no actúe como difusor de enfermedades. Rápido, para asegurar la máxima productividad del trabajo y delicado, para prevenir daños a los sensibles tejidos del pezón y la ubre, a los que se pueden asociar problemas sanitarios. (Larrañaga y col., 1999; Laborde M, 2002).

Todas las operaciones relacionadas con el ordeño tienen una gran importancia, estas protegen a la vaca contra la mastitis y al mismo tiempo contribuyen a reducir la carga bacteriana de la leche fresca. Laborde M, (2002).

#### 4. 5. 2. Tanque de frío

Los locales donde se recoge y se conserva la leche deben estar limpios e higiénicos. Su construcción y disposición, tienen que permitir el mantenimiento y la realización de las operaciones necesarias durante la producción de leche. El establo, la sala de ordeño, sala de almacenamiento y los equipos, son piezas claves en la mantención de las características de la leche Laborde M, (2002).

Como la leche es un excelente medio de cultivo para las bacterias, es imprescindible refrigerarla a baja temperatura y lo más rápido posible, para detener o al menos disminuir el desarrollo microbiano. Esta operación es determinante de la calidad bacteriológica de la leche. La regla básica es bajar su temperatura a 4°C en un tiempo máximo de 90 minutos y después mantenerla entre 1° y 4°C. Cuando la leche de nuevos ordeños se añade a la que ya está refrigerada, la temperatura de la mezcla no debe sobrepasar los 10°C. La velocidad de refrigeración debe regularse para evitar el batido parcial de la materia grasa. Se puede mejorar la conservación de la leche sometiéndola a una refrigeración previa a la llegada al tanque, o incluso a una refrigeración instantánea; de esta manera, el tiempo de refrigeración final se

reduce considerablemente, en comparación al necesario cuando la leche llega al tanque a 32°C (Amiot, 1991; Luquet y col., 1991).

La refrigeración rápida de la leche, a una temperatura inferior a 4°C prácticamente detiene el desarrollo de la flora acidificante. Hay que controlar la flora psicrótrofa, en primer lugar evitando su llegada a la leche y después manteniéndola a una temperatura cercana al punto de congelación. Las bacterias psicrótrofas tienen su principal origen en el agua y por esta razón es muy importante su calidad bacteriológica y la correcta higienización del equipo lechero. Las alteraciones causadas por dichos microorganismos, pueden ser muy graves ya que sus actividades lipolíticas y proteolíticas modifican de forma más o menos sensible el sabor y aroma de la leche y los productos lácteos (Larrañaga y col., 1999; Jay, 2000).

Durante el período de almacenamiento y antes de la industrialización, la leche puede manifestar algunas alteraciones bioquímicas. Los cambios químicos que afectan la materia grasa durante el almacenamiento son: la oxidación y la lipólisis. En la oxidación, ingresa oxígeno en el carbono de los dobles enlaces destruyéndose los mismos, esto tiene gran influencia sobre la vida útil de casi todos los productos lácteos. La grasa láctea es relativamente estable frente a la oxidación, debido al elevado nivel de ácidos grasos saturados y la presencia de antioxidantes naturales como los tocoferoles. La lipólisis de la grasa de la leche, requiere de la ruptura de la membrana de los glóbulos grasos y posteriormente las lipasas actúan sobre los enlaces entre el glicerol y los ácidos grasos. La lipasa lipoproteína (LPL) es la principal enzima responsable de la lipólisis en la leche cruda; se origina en la glándula mamaria y es activa en la interfase lípido-agua. La temperatura óptima para su acción es de 33° C y el pH óptimo de 8,5. Esta enzima es relativamente lábil a la acción del calor, pudiendo ser inactivada por temperaturas de pasteurización en corto tiempo. A pesar de la gran cantidad de LPL, la lipólisis es limitada mientras la grasa de la leche es protegida por la membrana. La leche cruda normalmente se almacena a temperaturas muy por debajo de las óptimas para acción enzimática. En la hidrólisis enzimática de los triacilglicéridos, se liberan ácidos grasos libres que darán lugar a di y monoacilglicéridos y muy raramente glicerol libre. Por lo tanto, se podrá observar la actividad lipolítica cuantificando los ácidos grasos libres encontrados en la leche o los productos lácteos. Luego de la lipólisis, la liberación de estos ácidos grasos de los triacilglicéridos aumenta la acidez de la leche y también aumenta la tensoactividad, pero la alteración más reconocida de la hidrólisis enzimática de las grasas, es la alteración de las propiedades organolépticas (rancidez o enranciamiento). (Varnam y col., 1994; Wiking, 2005).

Una multitud de factores predisponen a la lipólisis de la leche, entre ellos se distinguen:

1- Lipólisis inducida. Los factores que intervienen en su presencia son: agitación mecánica, turbulencia de la leche, cambios térmicos bruscos, entre otros Cartier y col. (1990).

2- Lipólisis espontánea. Es aquella que se produce por la acción de la lipasa lipoproteica sobre leche o grasa almacenada en frío. Cartier y col. (1990). La presencia de lipólisis espontánea, se asocia al fin de la lactación, mala alimentación, bajo rendimiento lechero, mastitis, alto contenido celular, celo y constituyentes provenientes de la sangre Luquet y col., (1991).

### 4. 5. 3. Transporte de la leche

Para salvaguardar la calidad de la leche, su recogida en la los tambos y su transporte a las plantas procesadoras de leche, deben realizarse en condiciones determinadas. El conductor del camión cisterna que colecta la leche tiene muchas responsabilidades: clasificar y juzgar la calidad sensorial; tomar siguiendo las normas legales, las muestras representativas necesarias para los análisis químicos y microbiológicos, y determinar el volumen de leche que hay en el tanque. También debe mantener la higiene del camión cisterna Rimoldi, (2002).

Se debe transportar la leche por debajo de 9°C, debido a que por encima de esta temperatura la capacidad de multiplicación de los gérmenes es elevada, ocasionando pérdidas de la calidad de la leche Rimoldi, (2002).

En el momento de la recolección, se realiza la prueba del alcohol que determina la aceptación o rechazo de la leche por parte del chofer para ser cargada en la cisterna de recolección. Dicha prueba es usada en nuestro país como prueba presuntiva preliminar para establecer la estabilidad de la leche a los tratamientos térmicos. La técnica consiste en mezclar 2 ml de alcohol etílico al 70% con 2 ml de leche, observando la presencia o ausencia de floculación, en caso positivo la leche es rechazada Alais, (1985).

### 4. 5. 4. Industria

Alteraciones durante la industrialización: algunos mecanismos utilizados en la fase industrial, como la homogenización del glóbulo graso conducen a la destrucción de la membrana. Esta ruptura expone a la grasa a la acción de la LPL y por lo tanto su utilización industrial va siempre acompañada de pasteurización inmediata para inactivar la acción enzimática. Cuando la grasa de la leche es homogenizada, la membrana nativa de la leche es sustituida por proteínas séricas, caseína y restos de la membrana original, que rodean a los glóbulos originados en el proceso, para mantenerlos en una emulsión estable. A nivel industrial, la separación de la grasa se realiza por medios mecánicos utilizando descremadoras de diferentes capacidades de proceso. Luquet y col., (1991).

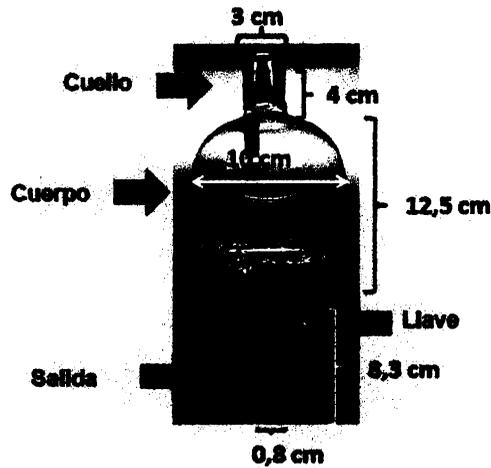
## 1. MATERIALES Y METODOS

La fase experimental se realizó en la Unidad de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Agronomía. La leche requerida de animales de la raza Jersey y Holando, fue obtenida en el establecimiento “Diez Taperas” ubicado en Km. 93,5 de la Ruta 11, en el Departamento de Canelones. La leche necesaria para la fase experimental fue extraída durante el verano y trasladada por separado en recipientes térmicos aislados provistos de refrigerantes, que en un lapso de 45 minutos se disponían en el laboratorio para su utilización en las fases experimentales.

### *Experimento 1. Evaluación de la separación natural con o sin activación térmica.*

Para la realización de esta etapa, la leche de ambas razas fue obtenida en dos períodos (diciembre y febrero) y una vez transportada al laboratorio fue colocada en balones de separación, con dispensador en la parte inferior de acuerdo a la descripción que se presenta en la Figura 1, utilizando 500 ml de leche en cada recipiente. La leche proveniente de ambas razas, fue sometida a dos tratamientos previos a la separación: 1) control (C) de leche refrigerada a 4°C y 2) tratamiento térmico (TT) consistente en una termización a 40°C, durante 5 segundos e inmediato enfriamiento en recipiente con agua helada hasta llegar a 4°C. Una vez finalizado el tratamiento, las muestras fueron colocadas en los recipientes de separación y se mantuvieron por un lapso de 4 horas en condiciones de refrigeración (4°C), sin agitación, de forma de permitir la separación. Una vez separada, las diferentes capas fueron fraccionadas por medio de un dispensador del recipiente situado en su parte inferior y una muestra de la fase separada se colocó en recipientes plásticos para muestras de leche con Lactopol® (200 µl de una solución al 25% de 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol, R.Benzo, Montevideo). Las muestras correspondientes a las diferentes fases extraídas fueron enviadas para el análisis de grasa, proteína, lactosa (método: IDF141C:2000), sólidos totales y células somáticas (1000cel/ml, IDF148A:1995C), que se realizaron en el laboratorio COLAVECO (Nueva Helvecia, Colonia).

Finalizado el período de refrigeración de las muestras, se procedió a la medición de color ( $L^*a^*b$ ) de la fase grasa superior y para ello se separaron los estratos en el siguiente orden: 50 ml inferior, 200 ml media inferior, 200 ml media superior y 50 ml superior. Esta última fase, fue sometida a la medición de color que se realizó con un equipo manual Minolta® 400 (Color Reader, Modelo CR-10, Japón) para obtener los parámetros  $L^*a^*b$  y cada muestra fue medida por triplicado de acuerdo a la técnica sugerida por Nozière y col. (2006) en la cual se transfieren 15 ml de la muestra a un vidrio óptico convexo de 5 cm de diámetro para realizar la medición.



**Figura 1.** Descripción gráfica de los balones de separación utilizados en el experimento.

***Experimento 2. Evaluación del tamaño de glóbulo graso en las diferentes fases de separación.***

El trabajo se realizó con un diseño similar al experimento 1, manejando la separación en forma similar y utilizando la leche del segundo período del experimento 1. Las muestras obtenidas de las diferentes fases, fueron colocadas en recipientes plásticos de 80 ml de capacidad con cierre hermético a los cuales se adicionó Lactopol® (200 µl de una solución al 25% de 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol, R.Benzo, Montevideo) y se colocaron en recipientes isotérmicos con refrigerantes para su transporte hasta el Polo Tecnológico de Pando de la Facultad de Química para la medición del diámetro de partículas grasas.

La distribución de tamaño de los glóbulos de grasa fue medida por el método de dispersión de rayos láser en un equipo Mastersizer (Malvern, UK), que permite la caracterización de las poblaciones micrónicas y sub-micrónicas, de acuerdo al método descrito por Michalski y col., (2001). Para evitar los artefactos de las poblaciones sub-micrónicas de las micelas de caseína, las muestras fueron tratadas por dilución en una solución 35 mM de EDTA a pH=7.0 previo a la realización de las mediciones. Por otra parte, las muestras fueron tratadas con SDS al 0,1% para mejorar la dispersión de los glóbulos grasos y evitar la coalescencia de los glóbulos que incrementen su tamaño.

***Experimento 3. Evaluación de los grupos microbianos presentes en las diferentes fases de separación.***

Para la evaluación de la concentración de grupos microbianos, el diseño del trabajo utilizó la separación natural sin activación térmica de la leche, con muestras de leche obtenidas en el mes de febrero. En el procedimiento de trabajo se utilizó en todos los casos, recipientes de separación estériles que fueron manejados para la separación de la leche en igual forma que en los experimentos anteriores, realizando los procedimientos en ambiente estéril para evitar contaminaciones no provenientes de la misma leche utilizada. Finalizado el período de separación de 4 horas, los recipientes fueron nuevamente manejados en campana de flujo laminar para realizar las separaciones de fases hacia recipientes estériles con cierre hermético, para la evaluación posterior de grupos microbianos.

Las determinaciones de grupos microbianos se realizaron en el Laboratorio de Lácteos de la Unidad de Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Agronomía. Las muestras fueron procesadas para la determinación de conteos de mesófilos totales en PCA-caseína. Para el análisis de microorganismos termodúricos, una alícuota de las muestras de cada fase fueron tratadas previamente a la siembra a 80°C por 10 minutos y posteriormente cultivadas en PCA-caseína e incubadas a 37°C. Los conteos de microorganismos psicrótrofos se realizaron en PCA-caseína incubando las muestras a 4°C por 10 días. En todos los casos los procedimientos utilizados correspondieron a los recomendados por la norma americana APHA, (1978). La determinación de microorganismos coliformes y *Escherichia coli* se realizó mediante el uso de Petrifilm™ laboratorio 3M™, España (sistema de recuento microbiológico rápido, exacto, fiable, de manejo sencillo y de un solo uso que elimina la necesidad de preparación de medios de cultivo).

### ***Análisis estadístico.***

El análisis estadístico del experimento 1, fue realizado utilizando un modelo completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos (2 períodos x 2 razas x 2 tratamientos térmicos x 4 fracciones), utilizando dos repeticiones por tratamiento. Las variables de respuesta del modelo fueron células somáticas, contenido de grasa, proteína y lactosa. El análisis fue realizado utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS y las medias de los diferentes efectos e interacciones se probaron mediante comparación múltiple (Lsd) del mismo paquete. Mendenhall y col., (1994). En este experimento la medición de color (L\*a\*b) de la fase grasa se realizó en el primer período por dificultades de disponibilidad del equipo utilizando un modelo completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos (2 razas x 2 tratamientos térmicos) y las comparaciones múltiples de medias por el mismo procedimiento señalado anteriormente.

El análisis de la información obtenida en el experimento 2 para las medias poblacionales de tamaño de partícula se realizó de acuerdo a un modelo completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos (2 razas x 4 fracciones de separación) utilizando el paquete estadístico SAS y las comparaciones múltiples de media (Lsd).

La información correspondiente al experimento 3, fue analizada de acuerdo a un modelo completamente al azar, con arreglo factorial de tratamientos (2 razas x 4 fracciones de separación) utilizando transformación logarítmica de los datos correspondientes a las variables de respuesta (conteos totales, psicrótrofos, *Escherichia coli* y termodúricos). El análisis de los efectos y sus interacciones fue realizado por el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS y las comparaciones múltiples de medias por Lsd.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 1) Efecto de la activación térmica de la leche sobre la separación por gravedad de las células somáticas y los componentes de la leche.

El análisis de la información obtenida para el recuento de células somáticas en la primera fase del experimento, muestra los efectos de la raza ( $P < 0,0003$ ), el estrato de separación ( $P < 0,0001$ ) y el momento de muestreo ( $P < 0,05$ ), mientras que no se encontraron diferencias significativas ( $P = 0,9124$ ) para la activación térmica de la leche previa a la separación por gravedad. Las medias de cuadrados mínimos para el contenido de células somáticas (x 1000) fueron  $521,6 \pm 168,2$  y  $226,2 \pm 67,8$  ( $\mu \pm EEM^*$ ) para las razas Holando y Jersey, respectivamente. Las medias para los diferentes estratos luego de su separación fueron de  $46,1 \pm 9,4$ ,  $12,5 \pm 2,0$ ,  $10,9 \pm 2,0$  y  $1.426,3 \pm 207,1$  células somáticas (x 1000) para el estrato inferior, medio inferior, medio superior y superior, respectivamente. Se encontraron efectos altamente significativos ( $P < 0,0001$ ) de la interacción raza y estrato que se presenta en el Cuadro 8 para profundizar en su análisis.

**Cuadro 8.** Medias de cuadrados mínimos ( $\mu \pm EEM^*$ ) para el contenido de células somáticas (x 1000) en las razas Holando y Jersey en los diferentes estratos de separación.

Raza	Estrato inferior	Estrato medio inferior	Estrato medio superior	Estrato superior
Holando	$55,9^a \pm 16,1$	$16,3^a \pm 3,3$	$14,5^a \pm 3,1$	$1999,9^c \pm 287,3$
Jersey	$36,3^a \pm 9,7$	$8,8^a \pm 1,8$	$7,3^a \pm 1,9$	$852,6^b \pm 80,1$

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes en filas y columnas indican diferencias significativas ( $P < 0,01$ ).

\*EEM = error estándar de la media.

Como se aprecia en el Cuadro 8, las diferencias existentes entre las razas para el contenido de células somáticas, se manifiesta en el estrato superior luego de la separación por gravedad y este estrato difiere significativamente ( $P < 0,0001$ ) entre razas y con los otros estratos situados inmediatamente por debajo de la fase grasa superior. No fueron significativas ( $P > 0,05$ ) las diferencias entre razas dentro de los estratos medio superior, medio inferior e inferior. La información obtenida en este trabajo, confirma los resultados presentados por investigadores italianos que han estudiado el proceso de separación grasa que se realiza en algunos quesos tradicionales con denominación de origen, como el Parmigiano Reggiano y Grana Padano. Formaggioni y col., (2004) estudiaron el efecto de la época del año en la separación por gravedad sobre diferentes variables. En este estudio, encontraron que las células somáticas presentan una reducción altamente significativa ( $P < 0,0001$ ) en las capas inferiores a la fase grasa, en el rango de 81% a 93% de disminución, en los meses de mayo y junio. En el trabajo que se presenta, la reducción del promedio de células somáticas alcanzó proporciones entre 89% y 92%, similares a las presentadas por Formaggioni y col., (2004). Por otra parte, la información proveniente de CRPA (2007) señala que la colocación de la leche en recipientes de afloramiento grasa, permite la separación de la grasa y con ello una significativa reducción en el conteo de células somáticas y bacterias de la leche utilizada para la producción de quesos.

El análisis de la información de contenido de grasa en la leche luego de la separación natural, indicó diferencias entre razas ( $P < 0,0001$ ), activación térmica de la leche ( $P < 0,006$ ), estrato de separación ( $P < 0,0001$ ) y momento de muestreo ( $P < 0,01$ ), siendo significativas las interacciones raza y estrato ( $P < 0,0001$ ) y activación y estrato ( $P < 0,0001$ ). Las medias

mínimas cuadradas para las dos razas utilizadas fueron de  $4,69\% \pm 1,08\%$  y  $6,66\% \pm 1,75\%$  para Holando y Jersey, respectivamente. La concentración promedio de grasa para ambas razas es superior a los promedios habituales y esto puede deberse a que durante el período de trabajo (verano) la calidad de la pastura y la producción de leche descienden. Los porcentajes promedio en los diferentes estratos de separación fueron de  $0,72\% \pm 0,07\%$ ,  $1,27\% \pm 0,11\%$ ,  $1,52\% \pm 0,17\%$  y  $19,2\% \pm 1,21\%$  para las fases inferior, media inferior, media superior y superior, respectivamente.

En el Cuadro 9 se presentan las medias mínimas cuadradas ( $\mu \pm EEM$ ) del contenido graso para las dos razas estudiadas y los diferentes estratos de separación. El análisis de la interacción raza y estrato de separación, muestra que no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre razas en los estratos inferior, medio inferior y medio superior, mientras que el estrato superior difirió entre razas y con los estratos de separación medio superior, medio inferior e inferior. La información obtenida muestra también que la separación grasa del estrato superior, fue de 54 y 68%, de la grasa disponible en leche, para las razas Holando y Jersey, respectivamente. Estas diferencias pueden asociarse a la presencia de glóbulos de mayor tamaño promedio en la raza Jersey, que pueden contribuir a una mayor separación en esta raza y también debe tenerse en cuenta su mayor contenido graso. El trabajo de Carrol y col., (2006) establece que la raza Jersey presenta glóbulos más grandes que la Holando y la Pardo Suizo y a su vez en la medida que se aportan suplementos grasos a la dieta del animal, los glóbulos de la raza Jersey son aún más grandes. La interacción activación y estrato, indica que cuando la leche es activada térmicamente la fase grasa superior logra mayor concentración, formando una capa de menor tamaño, respecto a su contraparte no tratada. La información obtenida en esta fase tiene importancia práctica en la producción quesera artesanal, puesto que permite manejar en forma más eficaz la estandarización de la relación grasa/proteína o grasa/caseína, de la leche utilizada para la elaboración de quesos y de esta forma mejorar la uniformidad de las partidas elaboradas.

**Cuadro 9.** Medias de cuadrados mínimos para el contenido de grasa ( $\mu \pm EEM$ ) de la leche (%) en las razas Holando y Jersey en los diferentes estratos de separación.

Raza	Inferior	Medio inferior	Medio superior	Superior
Holando	$0,76^a \pm 0,10$	$1,43^a \pm 0,13$	$1,56^a \pm 0,14$	$15,0^b \pm 0,53$
Jersey	$0,69^a \pm 0,10$	$1,10^a \pm 0,15$	$1,47^a \pm 0,32$	$23,4^c \pm 1,01$

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes en filas y columnas indican diferencias significativas ( $P < 0,01$ ).

En el Cuadro 10 se presentan las medias mínimas cuadradas ( $\mu \pm EEM$ ) para el análisis de la interacción activación y estrato de separación. Como se aprecia en el Cuadro 10 no existieron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en los estratos inferior, medio inferior y medio superior con o sin activación, presentándose diferencias significativas ( $P < 0,001$ ) de todos estos estratos con la fase superior. Por otra parte, la activación térmica de la leche incrementó el contenido graso en la fase superior.

**Cuadro 10.** Medias de cuadrados mínimos para el contenido de grasa ( $\mu \pm \text{EEM}$ ) de la leche (%) por el efecto de la activación en los diferentes estratos de separación.

Activada	0,66 <sup>a</sup> ± 0,09	1,17 <sup>a</sup> ± 0,13	1,55 <sup>a</sup> ± 0,29	20,6 <sup>c</sup> ± 1,46
No activada	0,79 <sup>a</sup> ± 0,10	1,37 <sup>a</sup> ± 0,17	1,48 <sup>a</sup> ± 0,19	17,7 <sup>b</sup> ± 1,31

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes en filas y columnas indican diferencias significativas ( $P < 0,01$ ).

La separación grasa por gravedad ha sido bien documentada por Ma y Barbano (2000). Durante este proceso, la detección del descremado es normalmente apreciada a partir de los 40 a 50 minutos de permanencia estática de la leche bajo condiciones de refrigeración (Servello y col., 2004) y de acuerdo a Walstra y col., (1999) el máximo descremado se logra luego de 4 horas bajo estas condiciones. Es importante señalar que bajo condiciones de refrigeración (4°C) como la utilizada en nuestros sistemas productivos, la separación de la grasa se presenta en menores tiempos que a temperatura ambiente como se realiza frecuentemente en los quesos europeos con denominación de origen.

El análisis del contenido de proteína mostró diferencias altamente significativas ( $P < 0,0001$ ) entre razas, estratos de separación, momentos de muestreo y la interacción raza y estrato de separación. Las medias de contenido de proteína fueron de 3,02% ± 0,03% y 3,52% ± 0,06% para las razas Holando y Jersey, respectivamente. Las medias para los estratos, independiente de raza, fueron de 3,42% ± 0,08%, 3,42% ± 0,08%, 3,41% ± 0,08% y 2,83% ± 0,03% para el inferior, medio inferior, medio superior y superior, respectivamente. Las diferencias se manifestaron entre la capa superior con las restantes, no existiendo diferencias entre ellas. No existieron diferencias ( $P = 0,073$ ) en el contenido de proteína con la activación térmica de la leche. En el Cuadro 11 se presentan las medias de mínimos cuadrados para las dos razas utilizadas y los diferentes estratos de separación. Los resultados de la comparación de medias para proteína, muestran que en todas las fases extraídas, la leche de la raza Jersey presenta mayores contenidos de proteína que la leche de la raza Holando. Por otra parte, dentro de razas no existen diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) en el contenido de proteína de los estratos inferior, medio-inferior y medio-superior. Sin embargo, el contenido de proteína de la fase grasa superior fue significativamente menor que el que se obtuvo en las fracciones separadas por debajo de la misma.

**Cuadro 11.** Medias de cuadrados mínimos ( $\mu \pm \text{EEM}$ ) para el contenido de proteína de la leche (%) en las razas Holando y Jersey en los diferentes estratos de separación.

Holando	3,13 <sup>a</sup> ± 0,02	3,12 <sup>a</sup> ± 0,02	3,12 <sup>a</sup> ± 0,02	2,72 <sup>b</sup> ± 0,03
Jersey	3,71 <sup>c</sup> ± 0,02	3,71 <sup>c</sup> ± 0,02	3,71 <sup>c</sup> ± 0,01	2,93 <sup>d</sup> ± 0,02

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes en filas y columnas indican diferencias significativas ( $P < 0,01$ ).

El análisis de información para el contenido de lactosa indica la existencia de diferencias importantes entre razas y estrato de separación ( $P < 0,0001$ ), mientras que la interacción raza y estrato fue altamente significativa ( $P < 0,0001$ ) y la relación entre activación y estrato fue menos significativa ( $P < 0,05$ ). Las medias de contenido de lactosa fueron de 4,73% ± 0,06% y 4,85% ± 0,08 % para las razas Holando y Jersey, respectivamente. Las medias para los diferentes estratos fueron de 5,0% ± 0,05%, 4,98% ± 0,05%, 4,96% ± 0,05% y 4,20% ±

0,09% para la inferior, media inferior, media superior y superior, respectivamente. Las diferencias entre los diferentes estratos se presentan entre el estrato superior y los restantes estratos, mientras que estos últimos no difieren entre sí.

**Cuadro 12.** Medias de cuadrados mínimos para el contenido de lactosa ( $\mu \pm$  EEM) de la leche (%) en las razas Holando y Jersey en los diferentes estratos de separación.

Holando	4,90 <sup>a</sup> $\pm$ 0,07	4,87 <sup>a</sup> $\pm$ 0,07	4,87 <sup>a</sup> $\pm$ 0,07	4,27 <sup>b</sup> $\pm$ 0,10
Jersey	5,10 <sup>c</sup> $\pm$ 0,04	5,09 <sup>c</sup> $\pm$ 0,04	5,06 <sup>c</sup> $\pm$ 0,05	4,14 <sup>d</sup> $\pm$ 0,15

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes en filas y columnas indican diferencias significativas ( $P < 0,01$ ).

**Cuadro 13.** Medias de cuadrados mínimos para el contenido de lactosa ( $\mu \pm$  EEM) de la leche (%) por el efecto de la activación en los diferentes estratos de separación.

Activada	5,02 <sup>a</sup> $\pm$ 0,07	4,99 <sup>a</sup> $\pm$ 0,07	4,97 <sup>a</sup> $\pm$ 0,07	4,13 <sup>c</sup> $\pm$ 0,11
No activada	4,98 <sup>a</sup> $\pm$ 0,07	4,97 <sup>a</sup> $\pm$ 0,07	4,96 <sup>a</sup> $\pm$ 0,19	4,28 <sup>b</sup> $\pm$ 0,14

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes en filas y columnas indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

La información correspondiente a lactosa muestra que la utilización de esta práctica en la elaboración quesera aumenta la concentración de lactosa en la leche en las capas inferiores a la fase grasa. Las consecuencias en el proceso no son significativas ya que normalmente los niveles de lactosa están en exceso de los requerimientos y la mayoría se pierde en el desuerado. Sin embargo, en el caso que este sistema sea utilizado en industrias con mayor infraestructura, donde se reducen las concentraciones de lactosa por ultrafiltración, se deberá considerar el incremento que se produce en la leche que se destina a la producción de quesos.

Los resultados de esta fase experimental, indican con claridad que la separación por gravedad tiene efectos en la reducción de células somáticas en la capa no grasa, produciendo cambios favorables para la actividad quesera, relacionados con un incremento leve de concentración proteica y la reducción en el contenido de grasa que permite manejar la relación proteína/grasa de acuerdo al tipo de producto elaborado. Esta información es coincidente con los reportes de la literatura proveniente de los países que practican este tipo de separación en quesos de pasta dura.

## 2) Efecto de la raza y la activación térmica de la leche en el color de la fracción grasa.

El análisis de la información para la luminosidad ( $L$ ), indica que no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) para la este parámetro en las diferentes razas utilizadas, la activación térmica y la interacción raza y activación. Los valores promedio de luminosidad fueron de  $68,8 \pm 2,5$  y  $71,1 \pm 1,1$  para Holando y Jersey, respectivamente. El análisis de la información correspondiente al parámetro  $a$ , mostró diferencias altamente significativas ( $P < 0,0002$ ) entre las razas estudiadas, mientras que no fueron significativas la activación térmica de la leche ( $P = 0,1709$ ) y la interacción raza y activación ( $P = 0,0781$ ). Por otra parte, en la información correspondiente al parámetro  $b$  se encontraron diferencias altamente significativas ( $P < 0,0001$ ) entre razas, mientras que la activación térmica y la interacción raza

y activación no fue significativa ( $P > 0,05$ ). El parámetro *a* presentó una media de  $0,23 \pm 0,16$  y  $1,62 \pm 0,08$ , mientras que el parámetro *b* presentó medias de  $26,7 \pm 1,1$  y  $31,2 \pm 0,67$  para las razas Holando y Jersey, respectivamente. Estos resultados muestran que en la raza Jersey la tonalidad de la grasa tiene mayor tinte de rojos y amarillos, lo cual está probablemente asociado a una mayor cantidad de carotenos en la grasa de la leche proveniente de animales Jersey que aquella proveniente de vacas Holando (Nozière y col., 2006a, 2006b). Bajo nuestras condiciones de producción la alimentación con forrajes conduce a un aporte importante de estos pigmentos. Los carotenoides en la grasa de animales lecheros corresponden en su mayor proporción (90%) a  $\beta$ -carotenos y en menor proporción luteínas, zeaxantina, retinol,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina. Los resultados indican que la raza Jersey no solamente presenta mayor contenido graso, sino que la grasa es más coloreada y con la visión actual de los consumidores más saludable por la presencia de  $\beta$ -carotenos.

### **3) Microorganismos presentes en los diferentes estratos de separación.**

Los recuentos totales presentaron diferencias altamente significativas ( $P < 0,0027$ ) entre estratos de separación por gravedad, mientras no se encontraron diferencias entre razas ( $P = 0,1746$ ) y la interacción raza y estrato ( $P = 0,5435$ ). Las medias de mínimos cuadrados del logaritmo de los recuentos totales fueron  $4,43 \pm 0,37$ ,  $4,43 \pm 0,33$ ,  $4,94 \pm 0,24$  y  $6,39 \pm 0,08$  para el estrato inferior, media inferior, media superior y superior, respectivamente, indicando que la mayoría de los microorganismos presentes en la leche al momento del ordeño migran con la capa grasa hacia el estrato superior, reduciendo los conteos en la leche magra que puede destinarse a un proceso de quesería.

Los recuentos de psicrótrofos presentaron diferencias altamente significativas ( $P < 0,0001$ ) entre estratos de separación por gravedad, mientras no se encontraron diferencias significativas entre razas ( $P = 0,2513$ ) y en la interacción raza y estrato ( $P = 0,4267$ ). Las medias logarítmicas del recuento de psicrótrofos fueron de  $3,35 \pm 0,20$ ,  $3,46 \pm 0,15$ ,  $3,65 \pm 0,12$  y  $5,02 \pm 0,04$  para el estrato inferior, media inferior, media superior y superior, respectivamente. En la quesería artesanal, el recuento de psicrótrofos pierde significancia puesto que el tiempo entre la recolección de la leche y su procesamiento es escaso y por lo tanto el deterioro de la leche en que normalmente están involucrados es en este caso mínimo, respecto a lo que sucede en industrias mayores.

Los recuentos de *Escherichia coli* presentaron diferencias altamente significativas ( $P < 0,002$ ) entre estratos de separación por gravedad, mientras no se encontraron diferencias entre razas ( $P = 0,8709$ ) o la interacción raza y estrato de separación ( $P = 0,8207$ ). Las medias logarítmicas de los recuentos de *E. coli* fueron de  $1,00 \pm 0,01$ ,  $1,33 \pm 0,33$ ,  $1,92 \pm 0,54$  y  $3,94 \pm 0,09$  para el estrato inferior, medio inferior, medio superior y superior, respectivamente.

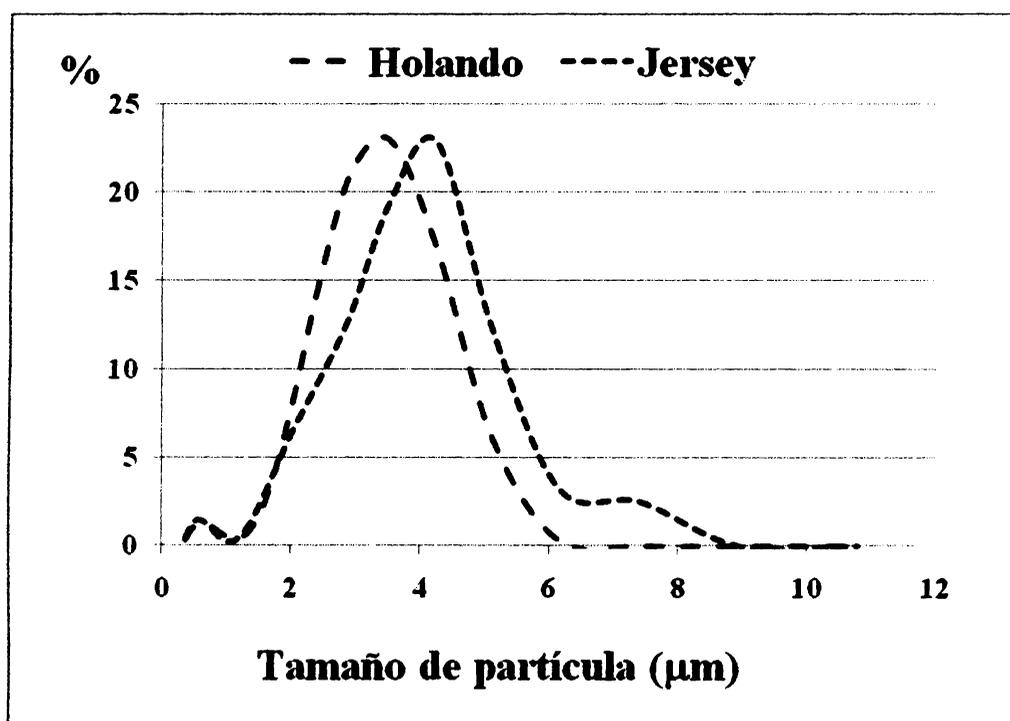
Los recuentos de termodúricos, presentaron diferencias altamente significativas ( $P < 0,0007$ ) entre estratos de separación por gravedad, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre razas ( $P = 0,5223$ ) o la interacción razas y estrato ( $P = 0,3110$ ). Las medias logarítmicas de los recuentos de termodúricos fueron de  $1,23 \pm 0,15$ ,  $1,07 \pm 0,31$ ,  $1,11 \pm 0,28$  y  $2,97 \pm 0,07$  para el estrato inferior, medio inferior, medio superior y superior, respectivamente. Los resultados obtenidos por Formaggioni y col., (2004) son coincidentes con señalar reducciones importantes de microorganismos termodúricos, particularmente en el número de esporulados presentes. Esta reducción en el número de esporulados conduce a ventajas en la elaboración de queso madurados puesto que reduce los problemas de hinchazón tardía ocasionada por *Clostridium tyrobutyricum*. La información de C.R.P.A. (2007) indica

que la separación por gravedad de la fase grasa de la leche que se utiliza en Parmigiano-Reggiano presenta entre sus ventajas una reducción sensible en el contenido de termodúricos que se involucran frecuentemente en los problemas de hinchazón tardía de quesos semiduros y duros.

#### 4) *Tamaño y distribución de los glóbulos grasos.*

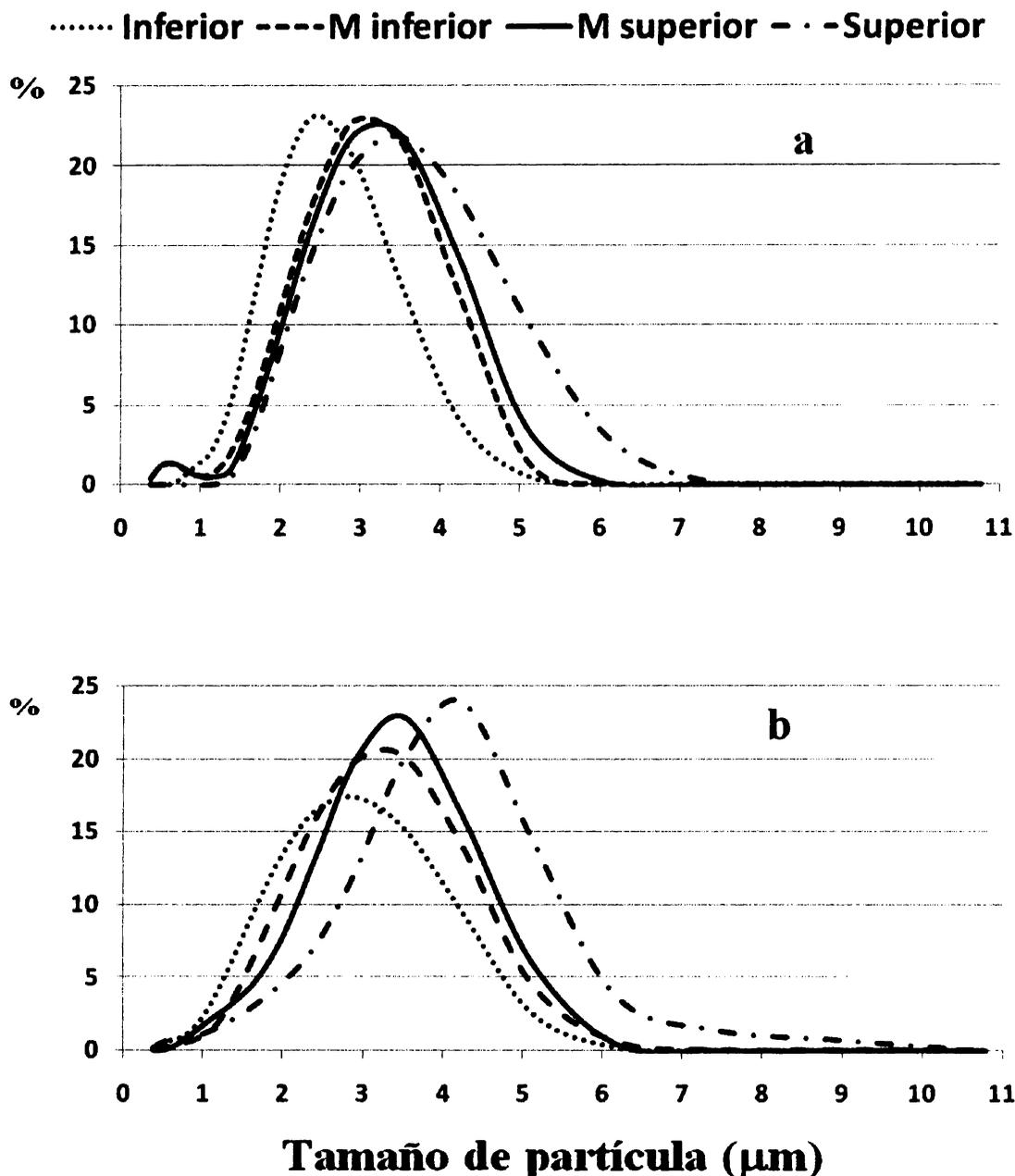
En la Figura 2 se presenta la distribución por tamaño de los glóbulos de grasa de una muestra general de leche proveniente de animales de las razas Holando y Jersey. Las variables descriptivas de las curvas obtenidas muestran que el tamaño promedio de los glóbulos grasos en la raza Holando fue de  $3,40 \pm 1,16 \mu\text{m}$  con un CV de 34%, mientras que para la raza Jersey los valores fueron de  $3,86 \pm 1,55 \mu\text{m}$  con un CV de 40%. La información de la literatura establece que las razas con mayor contenido graso presentan una mayor proporción de glóbulos grasos de mayor tamaño. Asimismo, el mayor tamaño de los glóbulos grasos de la raza Jersey son la causa del menor contenido de esfingomielina por gramo de grasa que presenta en relación a la raza Holando, que actualmente se asocia a un posible control del cáncer de colon, aunque esta limitante es compensada por el mayor contenido graso de la raza Jersey (Graves y col., 2007). Wikings (2005) presenta resultados del tamaño de glóbulos grasos de la raza Jersey y Holando cuya distribución es similar a la obtenida en este estudio.

**Figura 2 .** Distribución del tamaño de los glóbulos grasos en la leche producida por vacas de la raza Holando y Jersey.



En la Figura 2 se presenta la distribución de los glóbulos grasos en las diferentes fracciones separadas por gravedad y el Cuadro 14 se presentan los resultados para las dos razas estudiadas y las fracciones separadas. El análisis de la información obtenida muestra la existencia de diferencias en el tamaño de partículas entre los estratos de separación ( $P < 0,0008$ ), mientras no fueron significativas las diferencias entre razas ( $P = 0,1407$ ) y la interacción raza y estrato de separación ( $P = 0,9785$ ).

**Figura 3.** Distribución de tamaño de glóbulos grasos de la leche proveniente de la raza Holando (a) y Jersey (b), separadas naturalmente por gravedad.



Las medias de mínimos cuadrados del tamaño de glóbulos grasos para las diferentes razas fueron de  $3,18 \pm 0,14$  y  $3,36 \pm 0,17$  µm para Holando y Jersey, respectivamente. Las medias mínimas cuadradas del tamaño de los glóbulos grasos fueron de  $2,78 \pm 0,06$ ,  $3,16 \pm 0,11$ ,  $3,29 \pm 0,15$  y  $3,86 \pm 0,08$  µm para los estratos inferior, medio-inferior, medio-superior y superior, respectivamente.

**Cuadro 14.** Medias de cuadrados mínimos para el tamaño (µm) de partículas ( $\mu \pm$  EEM) de la leche (%) en las razas Holando y Jersey en los diferentes estratos de separación.

Holando	2,71 <sup>a</sup> ± 0,09	3,08 <sup>a</sup> ± 0,01	3,21 <sup>b</sup> ± 0,02	3,73 <sup>c</sup> ± 0,01
Jersey	2,85 <sup>a</sup> ± 0,06	3,24 <sup>a</sup> ± 0,23	3,37 <sup>b</sup> ± 0,35	3,99 <sup>c</sup> ± 0,03

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes en filas y columnas indican diferencias significativas (P<0,05).

La información muestra que la separación por este método, conduce a un cambio en el tamaño promedio de los glóbulos de grasa que quedan disponibles por debajo de la capa grasa superior, que permiten una selección de glóbulos de menor tamaño en la leche utilizada para la elaboración de quesos. Adicionalmente, la capa media superior presenta mayor tamaño que las capas que le siguen por debajo, lo cual permitiría continuar con una segunda fase de separación como lo han sugerido otros autores (O'Mahony y col., 2005).

## **7. CONCLUSIONES.**

En este trabajo se comprobó que la separación natural de la leche bajo condiciones de refrigeración 4°C, permite concentrar las células somáticas en la fase grasa superior, logrando en los ensayos realizados que entre el 89% y el 92% de las células somáticas de la leche, migren al estrato superior y puedan ser eliminadas de la leche destinada a la fabricación de queso.

En el proceso de separación, se producen modificaciones en la composición de la leche que se destina a la industrialización de quesos. Bajo condiciones de refrigeración (4°C) la concentración de grasa en la fase superior involucra entre el 54% (Holando) y el 68% (Jersey) de la grasa total de la leche en un período de 4 horas, y la raza Jersey presenta mayor contenido graso en este estrato. Sin embargo, los estratos que se sitúan por debajo de la fase grasa, presentaron una concentración grasa similar entre estratos y entre razas. Estos cambios ocasionados por la migración de la grasa a la fase superior, tienen como consecuencia una reducción significativa de la concentración de proteína y lactosa en la fase grasa. Cuando la leche es sometida a un proceso de activación térmica, previa a la separación, se obtiene una fase grasa más concentrada respecto a la leche no sometida a tratamiento térmico.

El color de la fase grasa superior presentó diferencias en los parámetros **a** y **b**, indicando que la raza Jersey presenta tonalidades más acentuadas de los tintes rojos y amarillos, lo cual puede estar asociado a la mayor presencia de carotenos en la leche de esta raza.

El proceso de separación natural de la leche provoca adicionalmente cambios en la concentración de grupos microbianos. Los resultados muestran claramente la mayor concentración de microorganismos totales, psicrótrofos, *Escherichia coli* y termodúricos en la fase grasa superior. Por lo tanto, la aplicación de esta forma de separación a nivel de la producción artesanal o incluso industrial puede tener ventajas en relación con la utilización de una leche industrial con menores cargas microbianas.

El proceso de separación natural permite adicionalmente separar la grasa de acuerdo al tamaño de los glóbulos grasos reduciendo significativamente su tamaño en la leche que se utiliza para la elaboración de quesos. Esta capacidad de selección de tamaño de glóbulo por esta forma de separación puede utilizarse más de una vez, de continuar con el proceso de reducción de tamaño de glóbulos grasos que pueden ser sustento de creación de perfiles de sabor propio y diferente a las formas clásicas de separación de la grasa por centrifugación.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Alais, Ch. (1985). Ciencia de la leche. Zaragoza, Acribia, 883 p.
- 2) Amiot, J. (1991). Ciencia y Tecnología de la Leche. Zaragoza, Acribia, 547 p.
- 3) APHA, (1978). American Public Health Association in Standard Methods for the Examination of Dairy Products. Washington DC, Elmer.H.Marsh, 235p.
- 4) Ayadi, M.; Caja, G.; Such, X.; Knight, CH. (2003). Effect of omitting one milking weekly on lactational performances and morphological udder changes in Dairy cows. J Dairy Sci 86:2352-2358.
- 5) Beltran, C.; Gil, R.; Castillo, A.; Valdes, S. (1991). Meningoencefalitis bacterémica por *L. monocytogenes* en un adulto inmunocompetente. Rev. Méd. Chile, 119:436-439.
- 6) Blowey, R.; Edmondson, P. (1995). Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche. Zaragoza, Acribia. 208 p.
- 7) Bottazi, V.; Delaglio, F.; Montescani, G. (1968). The creaming of milk and microorganisms agglutination. Part I: Creaming properties determination and milk globulin concentration and purification. Sci. Tecn. Latt. Cas; 19:391-410.
- 8) Bradshaw, J.; Peeler, J.; Corwin, J.; Hunt, J. (1985). Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. J. Food Prot; 48:743-745.
- 9) Capra, A. (2002). Chequeo de equipos de ordeño. Seminario Regional de Calidad de Leche N°2, Montevideo, Uruguay, pp 75-120.
- 10) Carroll, S.; DePeters, J.; Taylor, S.; Rosenberg, M.; Perez-Monti, H. (2006). Milk composition of Holstein, Jersey, and Brown Swiss cows in response to increasing levels of dietary fat. Anim. Feed Sci. Technol., 131: 451-473.
- 11) Cartier, P.; Chilliard, Y. (1990). Laboratoire de la lactation. Institut National de la Recherche Agronomique. France. J. Dairy Sci; 73:1178-1186.
- 12) Castañeda, R. (2002). Situación Calidad de la Leche en Argentina. Seminario Regional de Calidad de Leche. N° 33. Montevideo, Uruguay, 248p.
- 13) Cersovsky, H.; Sonntag, S.; Johst, F. (1980). Fabricación de Productos Lácteos. Zaragoza, Acribia, 343 p.
- 14) Coldevella, A. (2003). Contagem da Células e Produção de Leite em Vacas Holandesas Confinadas. Tesis de la Escuela Superior de Agricultura. Universidad de San Pablo. 124p.
- 15) Craven, N.; Williams, MR. (1985). Defenses of the bovine mammary gland against infection and prospects for their enhancement. Vet Immunol Immunopathol;10:71-127.

- 16) C.R.P.A. (2007). Consevazione e maturazione del latte per Parmigiano-Reggiano. Bol Centro Riser Prod Anim. N°6, 1-6.
- 17) Dellaglio, F.; Stadhouders, J.; Hup, G. (1969). Distribution of bacteria between the bottom, middle, and cream layers of creamed raw milk. Neth. Milk Dairy J; 23:140-145.
- 18) Farber, J.; Sanders, G.; Speirs, J.; D'Aoust, J.; Emmons, D.; Mckellar, R. (1988). Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in inoculated and naturally contaminated raw milk. Int. J. Food Microbiol; 7:277-286.
- 19) Fedio, W.; Jackson, H. (1989). Effect of tempering on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. Letters Microbiol; 9:157-160.
- 20) Fleming, D.; Cochi, S.; Mac Donald, K.; Brondum, J.; Hayes, P.; Plikaytis, B.; Holmes, M.; Auduier, A.; Broome, C.; Reingold, A. (1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. N. Eng. J. Med; 312:404-407.
- 21) Formaggioni, P.; Fossa, E.; Malacarne, M.; Summer, A.; Mariani, P. (2004). Variazioni mensili della capacità di affioramento del grasso nella produzione del Parmigiano-Reggiano: effetti sui contenuti di cellule somatiche e di spore del latte magro. Atti Soc Italiana Sci Vet. 58 p. 503-504.
- 22) Fossa, E.; Sandra, S.; Scotti, C. (2004). La maturazione del latte durante L'affioramento in differenti condizioni operative. L'attitudine tecnologia del latte e la reologia del cuagulo. Parma. Centro lattiero Caseario. 325p.
- 23) García, SR. (2003). Células somáticas, una advertencia sin darnos cuenta. Holstein, México; 34:27-28
- 24) Giannechini, RE.; Parietti, I.; De María, P. (2002). Evaluación de las Perdidas Económicas Relacionadas a Mastitis para Establecimientos Lecheros en Uruguay. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, La Estanzuela. Serie Actividades de Difusión N°287; pp. 30-34.
- 25) Graves, E.; Beaulieu, A.; Drackley, J. (2007). Factors affecting the concentration of sphingomyelin in bovine milk. J. Dairy Sci., 90: 706-715 .
- 26) Grustetti, P. (2001). Comparación de la producción y composición de leche entre las razas Jersey y Holando. Fac. de Ciencias Agrarias. Universidad de Belgrano, Córdoba. 173p.
- 27) Harmon, R. (1994). Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. Symposium: Mastitis and Genetic Evaluation for Somatic Cell Count. J. Dairy Sci; 77:2103-2112.
- 28) Hazard, S. (1997). Variación de la composición de la Leche. Calidad de Leche e interpretación de Resultados de Laboratorio. Seguridad y Calidad de los Productos Animales. Serie Carillanca; 62:33-44.
- 29) Hillerton, JE. (1999). Redefining mastitis based on somatic cell count. Int. Dairy Fed. Bull; 345:4-6.

- 30) Hogan, JS. (1988). Growth responses of environmental mastitis pathogens to long-chain fatty acids. *J. Dairy Sci*;71:245-249.
- 31) Ibarra, A. (2002). Sistema de pago de leche. Seminario regional de Calidad de Leche. N° 33. Montevideo, Uruguay, 248p.
- 32) International Organization for Standardization, ISO, (2002). Disponible en: [www.iso.org](http://www.iso.org) Fecha de consulta: 12/12/2008
- 33) Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria. Ministerio de Agricultura de Perú. Disponible en: [www.inia.gob.pe/boletin/boletin0023.htm](http://www.inia.gob.pe/boletin/boletin0023.htm). Fecha de consulta: 04/12/2008
- 34) James, A.; Booth J. (1995). Mastitis Control. *Int. Dairy Fed. Bull*; 305:29-50.
- 35) Jay, J. (2000). *Modern Food Microbiology*. 6° ed. Gaithersburg, Aspen Publication, 243p.
- 36) Jensen, R.; Ferris, AM.; Lammi-Keefe, CJ. (1991). The Composition of Milk Fat. *J Dairy Sci*; 74:3228-3243.
- 37) Kehrli, ME.; Shuster, DE. (1994). Factors affecting milk somatic cells and their role in health of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci* 77:619-627.
- 38) Kitchen, BJ. (1981). Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *J. Dairy Res*; 48:167-188.
- 39) Knight, CH. (1994). Milk accumulation and distribution in the bovine udder during the interval between milking. *J. Dairy Res* 61:167-177.
- 40) Kruze, J. (2002). Producción y parámetros de calidad de leche en Chile. Valdivia, Chile. Instituto de Microbiología, Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. 135p.
- 41) Laborde, M. (2002). La máquina de ordeño y la calidad de leche. Seminario regional de calidad de leche. N° 33. Montevideo, Uruguay, 248p.
- 42) Laevens, H.; Deluyker, H.; Schukken, H.; Meulemeester, L.; Vandermeerch, R.; Muelenare, A. (1997). Influence of parity and stage of lactation on the somatic cell count in bacteriologically negative dairy cows. *J. Dairy Sci*; 80:3219-3226.
- 43) Larrañaga, I.; Carballo, J.; Rodríguez, M.; Fernández, J. (1999). Control e Higiene de los Alimentos. Grado Superior. Madrid. McGraw Hill / Interamericana. 98p.
- 44) López de Matos, L. (2002). Estratégias para Redução do Custo de Produção de Leite e Garantia de Sustentabilidade da Atividade Leiteira. Simposio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil – NUPEL, Maringá. Publicación N° 2121; pp. 156 - 183
- 45) Luquet, F.; Keilling, M.; Wide, JR. (1991). Leche y Productos Lácteos. Vaca, Oveja, Cabra. Zaragoza, Acribia, 914 p.

- 46) Ma, Y.; Barbano, DM. (2000). Gravity separation of raw bovine milk: fat globule size distribution and fat content of milk fractions. *J. Dairy Sci*; 83:1719-1727.
- 47) Mather, I.; Keenan, T. (1998). Origin and secretion of milk lipids. *Mamm. Gland Biol Neopl*;3:259-273.
- 48) McDonald, J.; Anderson, A.J. (1981). Total and differential somatic cell counts in secretions from noninfected bovine mammary glands: the peripartum period. *Am J. Vet Res* 42:1366-1368.
- 49) Mendenhall, W.; Wackerly, D.; Scheaffer, R. (1994). *Estadística Matemática con Aplicaciones*. Ciudad de México, 772p.
- 50) Michalski, M.; Briard, V.; Michel F. (2001) Optical parameters of milk fat globules for laser light scattering measurements. *Le Lait* 81:787–796.
- 51) Ministerio de Defensa. Dirección Nacional de Meteorología, Características climáticas del Uruguay, Disponible en: [www.meteorología.com.uy](http://www.meteorología.com.uy). Fecha de consulta: 06/4/08.
- 52) Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Dirección de Información de Estadísticas Agropecuarias. Disponible en: [www.mgap.diea.gub.uy](http://www.mgap.diea.gub.uy). Fecha de consulta: 15/03/08
- 53) Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. OPYPA. Base de Datos. Oficina de Planeamiento y Políticas Agropecuarias. 2001; Montevideo-Uruguay. Disponible en: [www.presidencia.gub.uy](http://www.presidencia.gub.uy). Fecha de consulta 18/06/08.
- 54) Nozière, P.; Graulet, B.; Lucas, A.; Martin, A.; Grolier, P.; Doreau, M. (2006) Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131: 418-450.
- 55) Nozière, P.; Grolier, D.; Durand, A. (2006). Variations in carotenoids, fat-soluble micronutrients, and color in cow's plasma and milk following changes in forage and feeding level. *J. Dairy Sci.* 89: 2634-2648.
- 56) O'Brien, B.; Fitzpatrick, C.; Meaney, J.; Joyce, P. (1999). Relationship between somatic cell count and neutrophils in milk. *Irish J. Agric. Food Res*; 38:288-296.
- 57) O'Mahony, JA; Auty, MA; McSweeney, PL. (2005). The manufacture of miniature cheddar-type cheeses from milk with different fat globule size distributions. *J. Dairy Res*; 72:338-348.
- 58) Owen, RF. (1996). *Food Chemistry*, 3a. ed. New York. Marcel Dekker, 1067 p.
- 59) Paulrud, C. (2005). Basic concepts of the bovine teat canal. *Vet Res Commun*; 29:215-245.
- 60) Pfeilsticker, HU. (1996). Cisternal milk in the dairy cow during lactation and after preceding teat simulation. *J. Dairy Res* 63:509-515.

- 61) Philpot, WN. (2001). Importancia de la cuenta de células somáticas y los factores que la afectan. III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. Guanajuato, Méjico. 26-35 pp.
- 62) Revelli, GR.; Sbodio, OA.; Tercero, EJ. (2004). Recuentos de bacterias totales en leche cruda de tambos que caracterizan la zona noroeste de Santa Fe y sur de Santiago del Estero. Argentina. Revista Argentina de Microbiología; 36:145-149.
- 63) Rimoldi, AH. (2002). Recolección de la leche. Seminario regional de calidad de leche N°2 Montevideo, Uruguay. 35-48pp.
- 64) Rossi, J. (1964). Sul processo di caseificazione del formaggio grana. Parte II – Sosta del latte in bacinella e distribuzione dei microrganismi Latte; 38:301-305.
- 65) Ryster, ET. (1998). Public health concerns. En: Marth y J. Steele: Applied dairy microbiology, New York, Marcel Dekker, 404 p.
- 66) Scott, J.; Bernard, D. (1999). Principios para el control de *Listeria monocytogenes*. Perspectivas de la industria de alimentos. Alim Latinoamer; 230:17-22.
- 67) Schalm, O.; Carroll, E.; Jain, NC. (1971). Bovine mastitis. Philadelphia: Lea Febiger. 13-21 pp.
- 68) Senft, B.; Meyer, P.; Hartmann, L. (1990). The importance of proteins of teat canal keratin in the defense mechanism of the bovine mammary gland Milchwissenschaft 45:295-298.
- 69) Servello, V.; Hill, A.; Lencki, R. (2004). Towards an Optimum Mixing Protocol for On-Farm Bulk Milk Sampling. J. Dairy Sci. 87:2846-2853.
- 70) Silveira, I.; Pinheiro, E.; Teixeira, D. (1998). Influencia de microorganismos sobre la cualidade do leite refrigedrado. Hig. Alim.; 12:21-27.
- 71) Varnam, AH.; Sutherland, JP. (1994). Leche y Productos Lácteos; Tecnología, Química, Microbiología. Zaragoza. Acribia, 476 p.
- 72) Vivas, L. (1999). Listeriosis: problema en desarrollo. Invest. List. Anim.; 24:86-90.
- 73) Walstra, P. (1995). Physical Chemistry of milk fat globules. Adv Dairy Chem.; 2:131-178.
- 74) Walstra, P.; Geurts, P.; Noomen, A.; Jellema, A.; Van Boekel, M. (1999). Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes. , New York, Marcel Dekker, 26:120–187.
- 75) Wiking, L. (2005). Lipolysis with special Reference to Automatic Milking Systems. Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala. 216p.
- 76) Wikings, L. (2005). Milk Fat Globule Stability. Lipolysis with special reference to automatic milking systems. PhD thesis. Wageningen, Holanda. 39 pp.

- 77) Wolter, W.; Kloppert, B. (2004). Interpretación de los resultados del conteo celular y de la aplicación de la terapia. Avances en el Diagnóstico y Control de la Mastitis Bovina. Guadalajara, Conexión Gráfica, 5 pp.
- 78) Wooding, FB. (1971). The mechanism of secretion of the milk fat globule. Cell Sci; 9:805-821.
- 79) Wooding, FB. (1973). Formation of the milk fat globule membrane without participation of the plasmalemma. Cell Sci;13:221-235.
- 80) Zecconi, A.; Hamann, J.; Bronzo, V.; Moroni, P.; Giovannini, R.; Piccinini, R. (2000). Relationship between teat tissue immune defences and intramammary infections. Adv Exp Med Biol; 480:287-93.