UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE AGRONOMIA

ESTUDIO Y EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN LECHE DE CABRA

por

María MAZONI

TESIS presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Ingeniero Agrónomo.

MONTEVIDEO
URUGUAY
2003

Tesis aprobada por:

Directores:

Dra Stella Reginensi _____

Ing. Agr. Jorge Bermúdez _____

Jurados:

Dra Stella Reginensi _____

Ing. Agr. Jorge Bermúdez _____

Ing. Agr. Andrés Ganzabal _____

Fecha: 10 de diciembre de 2003.

Autor:

María Mazoni _____

TABLA DE CONTENIDOS

Página

PÁGINA DE APROBACIÓN..... I
AGRADECIMIENTOS..... II
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES..... III

1. INTRODUCCIÓN..... 1

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 3

2.1 GENERALIDADES 3

2.2 CARACTERISTICAS GENERALES DE LA LECHE DE CABRA...4
2.2.1 Compuestos nitrogenados.....4
2.2.1.1 Caseínas.....5
2.2.2 Composición lipídica.....7

2.3 FUENTES DE CONTAMINACION MICROBIANA.....8
2.3.1 Contaminación del interior de la glándula mamaria.....8
2.3.2 Contaminación de la leche en el exterior de la mama... 9
2.3.3 Contaminación proveniente de la máquina de ordeñe.....9
2.3.4 Contaminación proveniente del tanque de frío.....10
2.3.5 Contaminación proveniente del ordeñador.....10
2.3.6 Contaminación proveniente del agua.....11
2.3.7 Contaminación ambiental.....12

2.4 MICROFLORA DE LA LECHE CRUDA.....12

2.5 CLASIFICACION DE MICROORGANISMOS DE ACUERDO A LA TEMPERATURA DE CRECIMIENTO 13
2.5.1 Microorganismos psicrótrofos.....13

2.6 DETERIORO DE LA LECHE CRUDA ENFRIADA.....16
2.6.1 Lipólisis.....16
2.6.2 Producción de fosfolipasas por psicrótrofos.....17
2.6.3 Producción de proteólisis por psicrótrofos.....17

2.6.3.1 Producción y caracterización de proteasas.....17
2.6.4 Hidrólisis de las proteínas..... 18

2.7 ENZIMAS INHIBITORIAS EN LECHE DE CABRA.....19
2.7.1 Mecanismos antimicrobianos inespecíficos.....19

2.8 PROPIEDADES PARA LECHE DE CABRA.....20
2.8.1 Características de color y sabor.....20
2.8.2 Propiedades de cuajada.....20

2.9 MICOORGANISMOS VS: ESTACION 21

2.10 ALMACENAJE EN FRIO.....21
2.10.1 Efecto del almacenaje en frío en las propiedades fisicoquímicas.....22
2.10.2 Efecto del almacenaje en frío sobre la flora microbiana.....23

2.11 TECNICAS DE ELECTROFORESIS.....24
2.11.1 Estudios en electroforesis en gel en caseína caprina.....24
2.11.2 Estudios comparativos de SURGE y PAGIF.....25

3. OBJETIVOS. 27
3.1 OBJETIVO GENERAL.....27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....27

4. MATERIALES Y MÉTODOS.....28
4.1 Muestras de leche.....28
4.2 Análisis microbiológico.....28
4.3 Aislamiento e identificación de cepas bacterianas psicrótrofas.....28
4.4 Estudio de proteólisis.....29
4.5 Cinéticas de crecimiento y producción enzimática de las cepas *Pseudomonas fluorescens* 188.2ª y 264.2ª.....29
4.6 Obtención de fracciones enzimáticas..... 29
4.7 Evaluación del deterioro de la leche almacenada por un mes.....30
4.8 Estudio del deterioro enzimático por electroforesis en gel.....30

5. RESULTADOS YDISCUSIÓN.....33
5.1.Identificación de cepas microbianas psicrótrofas.....33

5.2 Estudio de proteólisis.....34
5.3 Cinéticas de crecimiento y producción enzimática de las cepas 188.2ª y 264.2ª.....35

6. CONCLUSIONES.....39

7. RESUMEN.....41

8. BIBLIOGRAFÍA 42

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla Nº Página

1. Composición promedio de leche de oveja, cabra y vaca**¡Error! Marcador no definido.**
2. Tipo de microorganismos mesófilos aerobios. .....**¡Error! Marcador no definido.**
3. Microorganismos termodúricos de la leche cruda fresca..... **¡Error! Marcador no definido.**
4. Bacterias psicrótrofas Gram negativas aisladas de leche y productos lácteos..... **¡Error! Marcador no definido.**
5. Bacterias psicrótrofas Gram positivas aisladas de leche y productos lácteos..... **¡Error! Marcador no definido.**
6. Bacterias productoras de proteinasas termorresistentes.**¡Error! Marcador no definido.**

Figura Nº Página

1. Diagrama del procedimiento para el análisis de las muestras ..... **¡Error! Marcador no definido.**
2. Conteo de mesófilos totales viables en leche ovina almacenada en tanque de frío. ..... **¡Error! Marcador no definido.**
3. Conteo de mesófilos totales viables en leche caprina almacenada en tanque de frío..... **¡Error! Marcador no definido.**
4. Conteo de psicrótrofos en leche ovina almacenada en tanque de frío. ..... **¡Error! Marcador no definido.**
5. Conteo de psicrótrofos en leche caprina almacenada en tanque de frío. ..... **¡Error! Marcador no definido.**
6. Promedio de conteos durante la lactancia de mesófilos totales en leche caprina. ..... **¡Error! Marcador no definido.**
7. Promedio de conteos durante la lactancia de mesófilos totales en leche ovina. ..... **¡Error! Marcador no definido.**
8. Promedio de conteos durante la lactancia de psicrótrofos en leche caprina. ..... **¡Error! Marcador no definido.**
9. Promedio de conteos durante la lactancia de psicrótrofos en leche ovina. ..... **¡Error! Marcador no definido.**

10. Estudio de deterioro de caseínas por electroforesis en leche ovina y caprina durante 4 días de almacenaje en el tanque de frío a lo largo de la lactancia..... **¡Error! Marcador no definido.**

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla Nº Página

1. Bacterias psicrótrofas Gram negativas aisladas de leche y productos lácteos.....14
2. Bacterias psicrótrofas Gram positivas aisladas de leche y productos lácteos.....15
3. Medida de diámetro de halos (mm) de proteólisis en agar caseína por las enzimas de las cepas aisladas psicrótrofas (>5mm).....35

Figura Nº Página

1. Diagrama del procedimiento para el análisis de las muestras.....32
2. Identificación de cepas bacterianas psicrótrofas.....33
3. Porcentaje de géneros bacterianos psicrótrofos en leche caprina con actividad proteolítica.....34
4. Cinética de crecimiento de dos cepas de *Pseudomonas fluorescens*.....36
5. Proteólisis en leche caprina incubada.....37
6. Leche de cabra estéril inoculada.....39

1. INTRODUCCIÓN

La presencia de microorganismos psicrótrofos en leche de cabra a nivel de tambo y la vida útil de la leche pasteurizada y sus subproductos refrigerados están limitados por el crecimiento y la actividad bioquímica de los microorganismos.

En la mayoría de los tambos se procede a refrigerar la leche inmediatamente después de su obtención en los tanques de frío. El uso de tanques de frío en los establecimientos lecheros permite la selección natural de una flora psicrótrofa productora de enzimas con actividad proteolítica y lipolítica capaz de deteriorar la leche a temperaturas menores a 5ºC.

La utilización de tanque de frío conduce a la selección de bacterias psicrotrófas que en condiciones naturales constituyen menos del 10% de la población microbiana mesófila, mientras que bajo condiciones de frío por 48 horas sus niveles pueden alcanzar el 70% de la población total por efectos de selección. A la llegada a la industria, la leche enfriada en el tambo, se transfiere a silos de almacenamiento donde se mantiene hasta su tratamiento térmico y posterior procesado (Cousin, 1982; Cousins y Bramley, 1981; Guamis et al. 1897 a, b; Jaspe, 1996; Mottar, 1989; Mathieu, 1990; Marshall y Mitchell, 1989; Reginensi et al 2000).

El crecimiento de las bacterias psicrótrofas en leche de cabra no produce de por sí problemas serios de deterioro de la leche. La mayoría son bacilos Gram negativos termolábiles que se mueren durante la pasteurización. Sin embargo sus enzimas (proteinasas, lipasas, fosfolipasas), producidas extracelularmente pueden resistir el calor y degradar importantes constituyentes de la leche. Estas enzimas que mantienen su actividad pueden afectar la calidad de los productos lácteos, causando y/o acelerando reacciones fisico-químicas y bioquímicas de deterioro durante el almacenamiento de la leche y sus productos. (Adams et al, 1974; Cousin, 1982; Cousin 1989; Collins et al., 1993; Guamis et al., 1987 a,b; Jaspe, 1996; Malik y Mathur, 1982; Mottar, 1989; Sha, 1994; Viejo et al., 2000; Yan et al., 1985).

El grado de proteólisis y/o lipólisis en la leche va a estar determinado por la o las cepas particularmente involucradas y el estado fisiológico de las mismas. El ambiente también va a afectar la producción de enzimas por parte de las bacterias psicrótrofas, así como la actividad de éstas (Mottar, 1989). La temperatura, el tiempo de permanencia de la leche en tanques de frío en los silos y la composición del sustrato son los factores más importantes al respecto. (Adams et al., 1974; Fox et al., 1989; Guamis et al., 1987; Mottar, 1989).

En la Facultad de Agronomía se han realizado estudios para establecer géneros y niveles predominantes de bacterias psicrótrofas a lo largo de la cadena productiva en las diferentes estaciones del año. Los géneros de psicrótrofos más frecuentes y con mayor actividad proteolítica encontrados son: *Pseudomonas, Flavobacterium, Acinetobacter, Aeromonas y Enterobacter* en leche bovina(Reginensi et al, 2000).

La producción de leche caprina es incipiente en el país y los bajos volúmenes indican la necesidad de conocer el comportamiento del deterioro a lo largo del período de conservación prolongado en el tambo. Por otra parte es necesario disponer de una evaluación de los mejores métodos que eviten el deterioro de la leche y el mantenimiento de la calidad hasta el momento de su procesamiento en la planta industrial.

Los problemas que presentan la industrialización de la leche con alto grado de proteólisis y la presencia de bacterias psicrótrofas se reflejan en la calidad de los productos lácteos. Estos estudios llevan a analizar la importancia del tiempo y temperatura de almacenamiento de la leche para evaluar los cambios indeseables en los productos lácteos causados por enzimas proteolíticas.

Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) aislamiento e identificación de cepas psicrótrofas en muestras de leche de cabra almacenadas por 4 dias obtenidas del tanque de frío. 2) evaluación de actividad proteolítica, y actividad enzimática desarrollada durante el crecimiento de las cepas en estudio

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 GENERALIDADES

La incidencia y desarrollo de microorganismos psicrótrofos en la leche cruda es variable dependiendo, del tipo, número y estado fisiológico, de las condiciones de producción de la leche, del estado sanitario del animal, del contacto con la superficie, y fundamentalmente de la temperatura y duración del almacenamiento refrigerado antes de su procesamiento industrial.

La necesidad de extender el tiempo de permanencia en tanque de frío de la leche de cabra ha llevado al estudio exhaustivo de la actividad de microorganismos psicótrofos.

Al comprobarse que la permanencia en frío aumenta el número de bacterias psicrótrofas, y por ende su actividad enzimática, sería deseable la minimización de la aparición de éstas en leches enfriadas, lo que conlleva al estudio de los géneros bacterianos que más inciden en el deterioro de leches de cabra crudas enfriadas. (Cousin, 1981)

En los estudios realizados para la explicación del crecimiento bacteriano a bajas temperaturas, se ha encontrado que la síntesis proteica puede ser afectada por el control de temperatura. Esta síntesis proteica está relacionada con los ribosomas contenidos a nivel celular. Sin embargo se ha encontrado que ribosomas extraídos de especies de Psceudomonas psicrótrofas se mantienen activos por largos períodos a bajas temperaturas. Muchos microorganismos psicrótrofos mantienen su actividad enzimática proteolítica y lipolítica lo que explicaría el deterioro de la leche enfriada. (Mikolajcik, 1980).

2.2 MICROORGANISMOS PSICRÓTROFOS

2.1.1 Géneros de microorganismos psicótrofos

Dentro de los microorganismos psicrótrofos, los géneros más comunes encontrados y estudiados en el deterioro de leches de cabra crudas son: *Pseudomonas sp., Acinetobacter, Aeromonas, Flavobacterium.*

Los psicrótrofos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, no constituyendo un grupo taxonómico específico de microorganismos. Se incluyen dentro de microorganismos psicrótrofos, bacterias, mohos y levaduras. Los principales géneros de bacterias psicrótrofas aisladas en la leche y sus subproductos incluyen bacterias Gram negativas y/o Gram positivas, cocos o vibrios, esporiformes o no esporiformes, aerobias o anaerobias. (Cousin, 1982).

Los psicrótrofos que con mayor frecuencia se encuentran en leche cruda son bacilos Gram negativos. Pseudomonas spp. Constituye el 50% de los géneros de bacterias Gram negativas y la especie Ps. fluorescensluoresens es la que predomina. Los géneros *Flavobacterium, Acinetobacter, Achromobacter* y *Alcalígenes* junto a coliformes, comprenden la mayoría del 50% restante de bacterias Gram negativas (Juffs, 1973 citado por Cousins y Bramley, 1987).

2.1.3 Incidencia de psicrótrofos en leche de cabra enfriada

La ocurrencia de deterioro por microorganismos psicrótrofos en leche cruda de cabra depende del tipo y número de microorganismos presentes, de las condiciones de ordeñe y las temperaturas y tiempo de almacenamiento en tanques de frío. (Stadhouders,J., E. De Vries 1976).

Se ha comprobado que la producción láctea bajo estrictas condiciones de sanidad contiene menos del 10% de microorganismos psicrótrofos del total de su microflora . Pero leches producidas en condiciones de sanidad

deficiente pueden contener hasta el 75% de microorganismos psicrótrofos, del total de su microflora. (Milliere, J., 1983).

La producción de leche bajo condiciones sanitarias normales no tiene usualmente un aumento importante en cuanto a crecimiento de flora psicrótrofa cuando es mantenida por debajo de 4ºC. El aumento y posterior deterioro de la leche no es el resultado del número inicial de psicrótrofos sino de la presencia de actividad de multiplicación psicrótrofa.(Thomas et al. 1984).

2.1.4 Cambios bioquímicos producidos por psicrótrofos

La importancia del deterioro causado por microorganismos psicrótrofos en leche de cabra cruda, se debe fundamentalmente al cambio bioquímico causado en los componentes de la leche.

Algunos psicrótrofos producen pigmentación durante su multiplicación a bajas temperaturas, también fermentación de azúcares con liberación de ácidos y gases, hidrólisis de proteínas y lípidos, limitando la calidad de la leche.

2.3 CARACTERÍSTICAS DE LA LECHE DE CABRA

La composición química de esta leche presenta un alto rango de variación en cuanto a sus diferentes componentes: grasa de 2,3 a 6,9%, con un promedio de 3.3% (Juárez, 1986 citado por Haenlein, 1996); proteína de 2,2 a 5,1% y como valor promedio 3.4% (Haenlein, 1996).

Además de las diferencias en cuanto a los tenores promedios de los distintos componentes, también existen un polimorfismo genético de las proteínas de la leche, la cual tiene importancias comerciales en la elaboración de los diferentes productos (por ej: rendimiento y sabor en quesos). (Remeuf y Lenoir, 1986 citado por Haenlein, 1996). Dicho polimorfismo tiene un potencial para la nutrición humana el cual aún no se

ha explotado por no conocerse bien todas sus posibles aplicaciones (Haenlein, 1991 citado por Haenlein, 1996).

2.3.1.2 Proteína

El contenido promedio de esta fracción es de 3.56% (USDA, 1990 citado por Haenlein, 1992). Sin embargo Le Mens (1991) cita un valor de 2.82%. En un trabajo realizado en Brasil por Bonassi et al. (1996) en donde se mide los niveles de proteína en la leche de cabra durante 30 meses, encontró un valor medio de 3,11% con un rango de variación que va desde 2,45 a 4,18%.

Del contenido de proteína total, en promedio el 78% esta compuesto por caseínas, con un rango de 55 a 86% (Renner, 1982 citado por Haenlein, 1992). Según Parkash y Jenness (1968) citado por Bonassi et al. (1996) afirman que el contenido de caseína representa cerca de 70 al 74% de la materia nitrogenada de la leche de cabra. Según Bonassi et al. (1996) la caseína representa el 71,8% (61,54 a 80,71%) de la materia nitrogenada total de la leche de cabra.

Existen 4 grupos de caseínas: α_{s1}; α_{s2}; β y κ. Para el primer grupo (α_{s1}) hay tipos genéticos que carecen de dicha fracción, otros presentan niveles bajos o intermedios y otros con altos tenores de α_{s1}. Estas variaciones se observan tanto en animales de distintas razas y también existen diferencias individuales dentro de una misma raza. Estas diferencias en cuanto al contenido de α_{s1} tienen consecuencias nutricionales y en la industrialización de esta leche (Haenlein, 1996). Richardson y Creamer citado por Jenness (1980) aislaron 2 tipos de β-caseína, las cuales tienen idéntica composición de aminoácidos, pero difieren solamente en el número de los grupos fosfato.

El tamaño de las micelas varía desde un diámetro superior a 200 nm hasta más pequeñas con un diámetro inferior a 80 nm. (Le Mens, 1991).

Debido al tamaño de las micelas, la caseína de la leche cabra presenta menor capacidad de sedimentación por centrifugado que otras leches estudiadas, fundamentalmente si la comparamos con leche de vaca. La leche de cabra forma un coágulo más suave y quebradizo cuando se acidifica, que puede ser debido a la deficiencia de α_{s1}. Los coágulos menores y más quebradizos son más rápidamente atacados por las proteasas estomacales facilitando la digestión (Jenness, 1980 citado por Bonassi, 1996).

Según Le Mens (1991) las proteínas del suero de leche de cabra representan el 20,4% del nitrógeno, , con distinta distribución de cada uno de sus fracciones. Esta fracción esta compuesta por: β-lactoglobulina, globulinas, α-lactoalbumina, albúmina sérica, inmunoglobulinas y la fracción proteosa-peptona. (Alichanidis y Polychroniadou, 1996).

La leche caprina presenta niveles más altos de aminoácidos libres comparado con leche bovina (Alichanidis y Polychroniadou, 1996).

2.3.2 Grasa

Según Fahmi et al. (1956) citado por Le Mens (1991) los glóbulos grasos se caracterizan por la abundancia de los de tamaño muy pequeño. Un 65% tienen un diámetro inferior a 3 micras.

Según Furtado y Wolfschoon-Pombo (1978) en la leche de cabra, el 28% de los glóbulos grasos presentan un diámetro igual o inferior a 1,5 micras. Esta característica tiene una importancia nutricional importante ya que diámetros inferiores a 5 micras disminuyen el tiempo de residencia en el estomago y el tránsito intestinal (Le Mens, 1991). Asimismo también tiene importancia en la industria láctea como por ejemplo en la elaboración de yogur con leche caprina, el cual es naturalmente bebible y uno de los componentes que le imparte esa propiedad es el tamaño de los glóbulos grasos de la leche.

La grasa de la leche esta compuesta en casi su totalidad por triglicéridos. Los mono y di-glicéridos son poco frecuentes en este tipo de leche. En cuanto a la cantidad, los ácidos grasos de 4 a 12 átomos de carbono representan un 20%. (Le Mens, 1991). Según Furtado y Wolfschoon-Pombo (1978) la grasa de la leche de cabra presenta desde el punto de vista bioquímico cerca de 18% de ácidos grasos de cadena corta, siendo esos ácidos representados sobre todo por los ácidos caproico, caprilico y caprico. La cantidad y composición de esta fracción depende de la alimentación, estación, etapa de lactación y del origen de estos ácidos. Los ácidos grasos C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 aumentan su proporción en el verano, mientras que los ácidos de C4 a 16 carbonos se reducen significativamente (Haenlein, 1996).

Azucar

2.4 ENZIMAS EN LECHE DE CABRA

La actividad de la xantina oxidasa que se encuentra adsorbida en la membrana de los glóbulos grasos y la lisozima que se encuentra en el suero. La fosfatasa alcalina que se encuentra adsorbida en la membrana de los glóbulos grasos, presenta importantes niveles de actividad.(Alichanidis y Polychroniadou, 1996).

2.4.1 Mecanismos antimicrobianos inespecíficos

La lactoferrina caprina cuya función es inhibir la multiplicación de las bacterias al privarlas del hierro, puede proteger a la ubre "seca" de la infección por *E. Coli* (Reiter y Bramley citado por Cousins y Bramley, 1987).

Los niveles de lactoperoxidasa encontrados en leche de cabra son relevantes, no así el nivel de actividad del sistema lactoperoxidasa (Alichanidis y Polychroniadou, 1996). Este sistema tiene un efecto bacteriostático sobre bacterias Gram positivas y bactericida sobre las bacterias Gram negativas, incluyendo a los psicrótrofos (Alais, 1985). La

activación del sistema depende de la concentración de dos reactivos, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y tiocianato (SCN^-). En particular el sistema lactoperoxidasa tiene la habilidad de catalizar la oxidación del SCN^- con el H_2O_2 produciendo hipotiocianato ($OSCN^-$) y otros productos intermedios. Estos compuestos tienen la habilidad de reducir el crecimiento bacteriano por medio de un daño en la membrana celular e inhibiendo la actividad de algunas enzimas citoplasmáticas (Haddadin et al., 1996).

También se ha demostrado que lisozima tiene capacidad antimicrobiana. Esta provoca la hidrólisis del polisacárido que constituye la pared de ciertas bacterias, conduciéndolas a su destrucción (Alais, 1985).

2.5 PROPIEDADES PARA LECHE DE CABRA

2.5.1 Propiedades organolépticas

El color de la leche de cabra es blanco opaco porque ella tiene muy poco β-caroteno comparado con leche de vaca (Alichanidis y Polychroniadou, 1996).

La leche de cabra, al contrario de la leche de vaca carece en su composición de caroteno. Este pigmento clorofiliano liposoluble y responsable de la coloración amarilla típica de la leche de vaca. Su ausencia en la leche de cabra explica la blancura característica de esta leche (Furtado y Wolfschoon-Pombo, 1978).

El sabor fuerte característico de la leche de cabra es atribuido a los ácidos grasos volátiles libres, especialmente al ácido cáprico, liberado por la acción de la lipasa lipoproteica.

2.5.2 Propiedades de coagulación

La leche de cabra es muy sensible al cuajo, debido a su alta relación entre β/α_s-caseínas, mayor contenido de sólidos totales, caseína y grasa (Alichanidis y Polychroniadou, 1996).

Las propiedades de coagulación de la leche caprina varían ampliamente como consecuencia de la gran variabilidad en su composición, la concentración de α_{s1}-caseína es el componente principal que influye en el tiempo de formación y en la firmeza de la cuajada (Alichanidis y Polychroniadou, 1996). Bajo contenido de α_{s1}-caseína determinan un menor tiempo de coagulación y una débil resistencia a los tratamientos por calor comparados con las leches de alto contenido (Haenlein, 1996).

2.6 MICROFLORA DE LA LECHE CRUDA

Según Cottier (1991) el hecho de que para obtener una misma cantidad de leche con cabras que con vacas, hace falta ordeñar de 10 a 15 veces mas animales, hace que los riesgos de contaminación por los pezones se vean sensiblemente incrementados. Además algunas practicas aplicables para el ordeño de vacas (lavado previo de la ubre) son imposibles de realizar con estos animales. Únicamente por esta razón es más difícil obtener una buena calidad bacteriológica en la leche de cabra.

El número y los tipos de microorganismos presentes en la leche recién ordeñada, reflejan directamente la contaminación microbiana durante su obtención. La microflora de la leche cuando abandona la granja depende de la microflora inicial, del tiempo transcurrido hasta alcanzar la temperatura de conservación, de la temperatura a la que se ha almacenado y del tiempo transcurrido hasta la recolección (Cousins y Bramley, 1987). Por lo que para obtener leche de buena calidad microbiológica es necesario una buena higiene durante el ordeño, un rápido enfriamiento y buenas condiciones durante el almacenaje en el tanque. También es necesario mantener la temperatura en el rango óptimo para una adecuada conservación durante el transporte de la leche desde el tambo hasta la planta procesadora. Cuando la leche se enfría y se mantiene a una temperatura menor o igual a 4 ºC, se previene normalmente la multiplicación de las bacterias al menos en las primeras 24 horas y la microflora es similar a la presente tras el ordeño (Cousins y Bramley, 1987).

La importancia de la microflora presente en la leche no solo va a determinar el estado higiénico y sanitario del tambo sino también la calidad de la leche en relación al grado de deterioro de la misma por la cantidad de enzimas liberadas por microorganismos o células somáticas (aumentado en caso de mastitis).

Según Gounot (1986) y Silva (1991) citado por Silveira et al. (1998) observaron que los microorganismos que normalmente contaminan la leche crecen en un amplio rango de temperatura. Estos se dividen en tres grupos: mesófilos, termófilos y psicrótrofos. Los psicrótrofos serán los analizados en el desarrollo de esta investigación.

2.6.3 Microorganismos psicrótrofos

La incidencia y desarrollo de las bacterias psicrótrofas en la leche cruda son muy variables, dependiendo del tipo, número y estado fisiológico de los microorganismos, las condiciones de producción de la leche y el contacto con la superficie, siendo afectado también por la temperatura y duración del almacenamiento refrigerado antes de ser procesada.

Dentro de los microorganismos psicrótrofos, el genero más común encontrado en la leche son las *Pseudomonas sp.*, más específicamente *Pseudomonas fluorescens*. Otros microorganismos psicrótrofos de importancia para el deterioro de la leche son pertenecientes a los géneros: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Enterobacter* y también *Listeria* como posible contaminante patógeno.

2.6.3.1 Aspectos taxonómicos

Los psicrótrofos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, no constituyen un grupo taxonómico especifico de microorganismos. Los principales géneros de bacterias psicrótrofas aisladas en la leche y sus subproductos incluyen bacterias Gram negativas y/o Gram

positivas; bastones, cocos o vibrios; esporiformes o no esporiformes; y aerobias o anaerobias. También, existen otros microorganismos psicrótrofos (mohos y levaduras) capaces de producir defectos en productos lácteos (Cousin, 1982).

Desde el principio la literatura reporto que los microorganismos causantes del deterioro de la leche a bajas temperaturas son predominantemente Gram negativo (tabla 4), no esporiformes y catalasa positivos (Cousin, 1982).

Tabla 1 Bacterias psicrótrofas Gram negativas aisladas de leche y productos lácteos.

Género	**Fuente**
Achromobacter	Leche cruda y pasteurizada, crema y manteca
Acinetobacter	Leche cruda y pasteurizada y crema
Aeromonas	Leche cruda y pasteurizada y manteca
Alcaligenes	Leche cruda y pasteurizada, crema y manteca
Chromobacterium	Leche cruda
Citrobacter	Leche cruda y pasteurizada
Cytophaga	Leche cruda
Enterobacter	Leche cruda y pasteurizada y crema
Escherichia	Leche cruda
Flavobacterium	Leche cruda y pasteurizada y manteca
Klebsiella	Leche cruda, crema y manteca
Pseudomonas	Leche cruda y pasteurizada, crema y manteca
Serratia	Leche cruda
Vibrio	Manteca

(Cousin, 1982.)

Las bacterias psicrótrofas Gram positivas también han sido aisladas de la leche cruda (tabla 5), a pesar que se encuentran en menor cantidad que las bacterias Gram negativas. Los géneros *Micrococcus*, *Bacillus*, y *Arthrobacter* son los microorganismos Gram positivos psicrótrofos más frecuentemente aislados. La presencia de las bacterias Gram positivas a adquirido más importancia en la leche pasteurizada y productos lácteos porque pueden formar esporas; las cuales pueden resistir a los tratamientos térmicos que se le dan a dichos productos. Esto esta ligado al posible deterioro de estos productos (Cousin, 1982).

Tabla 2 Bacterias psicrótrofas Gram positivas aisladas de leche y productos lácteos

Género	Fuente
Arthrobacter	Leche cruda y manteca
Bacillus	Leche cruda y pasteurizada y crema
Clostridium	Leche cruda
Corynebacterium	Leche cruda y pasteurizada y crema
Lactobacillus	Leche cruda
Microbacterium	Leche pasteurizada
Micrococcus	Leche cruda y pasteurizada
Sarcina	Leche pasteurizada
Staphylococcus	Leche cruda
Streptococcus	Leche cruda y pasteurizada

(Cousin, 1982.)

2.6.3.2 Temperatura de crecimiento

Los psicrótrofos crecen a bajas temperaturas y a pesar de producir un mayor crecimiento a temperaturas más elevadas se caracterizan por tener una fase lag larga y una fase logarítmica corta en condiciones de refrigeración. La fase lag es breve a la temperatura óptima de crecimiento y aumenta a medida que disminuye la temperatura. Por tanto la temperatura óptima puede ser obtenida determinando la temperatura a la cual el tiempo de generación es el más corto (Cousin, 1982). Yano et al. (1974) (estudio el

tiempo de generación de bacterias psicrótrofas en la leche refrigerada y encontró un rango de 6,6 a 12,7 horas a 5 ºC y 12,2 a 26,1 horas para una temperatura de 0 ºC. Debido a esto el periodo en que la leche mantuvo una buena calidad fue de 2 a 5 días a 5ºC y aproximadamente 4 a 13 días a 0 ºC, estos valores fueron obtenidos en un trabajo con leche de vaca.

2.7 FUENTE DE CONTAMINACIÓN MICROBIANA DE LA LECHE EN SU PRODUCCIÓN.

2.7.1 Contaminación del interior de la glándula mamaria

Cuando la leche es ordeñada a partir de un animal sano, casi siempre contiene gérmenes, que contaminan la leche. En el interior de la glándula mamaria existen casi siempre gérmenes innocuos que contaminan la leche en el momento de su obtención (Alais, 1985). Los gérmenes que más predominan son saprófitas pertenecientes principalmente a los géneros *Corynebacterium* y *Micrococcus*. También existen gérmenes patógenos dentro de los cuales se ubican: *Streptococcus* y *Staphylococcus* hemolíticos, pero ocasionalmente pueden intervenir otras numerosas especies (Alais, 1985).

2.7.2 Contaminación de la leche en el exterior de la mama.

Este tipo de contaminación suele ser cuantitativamente más importante en relación con la de origen mamario; su importancia es extremadamente variable según las condiciones de producción y conservación de la leche.

El exterior de los pezones es una fuente de contaminación frecuente y aporta gérmenes y esporas. Sobre todo gérmenes psicrótrofos y microorganismos termorresistentes, pero no coliformes. Según Cousin (1982) el suelo y la vegetación hay gran cantidad de psicrótrofos, los cuales para nuestras condiciones de producción son una fuente importante de contaminación de las ubres junto con la materia fecal.

2.7.2.1 Contaminación proveniente de la máquina de ordeñe

Esta es la fuente de contaminación más importante. Proviene de la paredes del equipo de ordeñe que contactan con la leche. El nivel de incidencia de esta fuente de contaminación va a depender del estado de la maquina en general y del grado de limpieza alcanzado. Las partes de goma en mal estado pueden hacer que esta fuente de contaminación se vea multiplicada. Según Thomas y Thomas (1978) citado por Cousin (1982), concluyeron que el equipo de ordeñe, es el causante de la mayor contaminación microbiana en los tambos que almacenan la leche en tanque de frío. La limpieza de dicho equipo se realiza con el proceso de limpieza agua-ácida-hirviendo (ABW) se pasteuriza, por lo que solo sobreviven los microorganismos termodúricos. La aplicación de soluciones detergentes desinfectantes muy calientes tienen un efecto similar. En la práctica no siempre se llega durante la limpieza a temperaturas de pasteurización pero si estas se alcanzan predominan microorganismos termorresistentes, tales como *Bacillus spp.*, bacilos Gram positivos no esporulados (probablemente *Microbacterium spp.*), micrococos y estafilococos. Los bacilos Gram negativos incluidos los coliformes, que son termolábiles son relativamente poco frecuentes. Si la microflora que se recoge en los lavados es fundamentalmente termolábil, es evidente que una parte del equipo no se ha calentado lo suficiente (Cousins y Bramley, 1987).

2.7.2.2 Contaminación proveniente del tanque de frío

En un estudio realizado por Thomas y Thomas (1976) citado por Cousin (1982), estudiaron la incidencia de la flora bacteriana en tanques de frío y encontraron una alta cantidad de bacterias Gram negativas, especialmente en aquellos tanques que estaban mal lavados y desinfectados. Las especies *Streptococcus*, *Micrococcus* y *Corynebacterium* fueron encontradas en pequeñas cantidades y los bacilos esporiformes constituían alrededor del 10% de la población total. En varios estudios realizados se obtuvieron muestras a nivel de la superficie interior del tanque de frío (hisopado), indican que el biofilm puede ser uno de los principales focos de contaminación a atacar. El biofilm no es detectable a simple vista y esto lleva a que su control durante la limpieza sea deficiente principalmente

durante los meses del invierno (Carballo et al., 1999). El biofilm se forma cuando los microorganismos forman un puente entre la superficie celular con el sustrato, mediante: fimbrias, flagelos o exopolisácaridos. La mayoría de las bacterias son capaces de sobrevivir frente a condiciones adversas ambientales, así como también pueden crecer en medios mal higienizados y desinfectados (Sasahara y Zottola, 1993). Algunos géneros atrapados en el biofilm como es el caso de *Ps. fragi* permite el crecimiento y adhesión de otros microorganismos patógenos para animales y humanos como por ejemplo *Listeria*.

Es importante tener en cuenta que el agua con altas concentraciones de sales de calcio y magnesio interfieren con el funcionamiento de los detergentes y sanitizantes, lo que le infiere una mayor resistencia de los biofilms bacterianos a los tratamientos de limpieza y sanitizados. (Rasbani, 1997).

2.7.2.3 Contaminación proveniente del ordeñador

Cuando el ordeñe se realiza manualmente, es probable que las operaciones del ordeñador destinadas a la limpieza del lugar den lugar a un incremento de la contaminación aérea en el entorno de la ubre. Por otra parte el contacto de las manos puede originar una adicción de microorganismos a la leche. Los riesgos de contaminación de la leche a partir del ordeñador son mucho menores que los de las máquinas ordeñadoras (Cousins y Bramley, 1987). El personal responsable de ordeño no constituye desde el punto de vista cuantitativo una fuente importante de contaminación de la leche. Sin embargo, cualitativamente esta posibilidad de contaminación puede tener importancia. En ciertos casos se ha comprobado la presencia de gérmenes patógenos de origen humano en la leche, como por ejemplo: *Corynebacterium diphteriae* (difteria), *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculosis), *Streptococcus pyogenes* (escarlatina), *Salmonella* (tifus, infecciones intestinales) (Champagne y Goulet, 1991).

2.7.2.4 Contaminación proveniente del agua

El uso de agua contaminada en la limpieza del tanque, maquina e instalaciones, es una fuente muy importante de contaminación. Muchas veces el agua que se utiliza puede contener microorganismos de origen fecal, por ejemplo coliformes, estreptococos fecales y clostridios. Además pueden existir en ella una amplia variedad de organismos saprofitos procedentes del suelo y de la vegetación, entre los que cabe destacar *Pseudomonas spp.,* coliformes y otros bacilos Gram negativos y esporas de *Bacillus*, etc. (Cousins y Bramley, 1987). Según Cousin (1982), el agua es una de las fuentes de psicrótrofos.

También es importante tener en cuenta que la dureza del agua puede disminuir la eficiencia de los detergentes utilizados, lo que provoca que los tratamientos de limpieza del tambo sean menos efectivos.

2.7.2.5 Contaminación proveniente del ambiente

El aire por si solo como fuente de microorganismos tiene escasa importancia con respecto a otras fuentes de contaminación. Pero cuando se suministran alimentos durante el ordeñe, los alimentos pueden ser una fuente de contaminación del ambiente.

El forraje conservado en forma de heno es portador principalmente de gérmenes esporulados: bacilos y clostridios. Los ensilados aportan bacterias butíricas las cuales son perjudiciales para la elaboración que quesos (Alais, 1985). Los concentrados suministrados durante el ordeño también pueden incidir en la contaminación de la sala de ordeñe.

2.8 EFECTO DE LA ESTACIÓN CON RESPECTO AL TIPO DE MICROORGANISMO PRESENTE EN LA LECHE.

Los resultados encontrados en la bibliografía indican que la composición de la flora microbiana presente en la leche puede variar a lo largo del año. Muir et al. (1979) citado por Suhren (1989), observaron que los conteos totales en invierno y en verano eran similares, pero los conteos de psicrótrofos en invierno fueron considerablemente mayores que los de

verano, a pesar de que la temperatura del tanque de frío fue más baja en invierno.

En un trabajo realizado en Canadá, donde se estudio la calidad microbiológica en leche de cabra en 6 tambos, se vio que los conteos totales de microorganismos aeróbicos fueron más altos durante los meses de mayo a octubre y en el mes de julio los conteos totales de microorganismos aeróbicos presentaron un promedio de 6.4 x 10^5 UFC/ml. Este incremento puede ser debido a una mayor temperatura ambiental durante el ordeñe en los meses de verano (Tirard-Collet et al., 1991).

Según Kalogridou-Vassilladou et al. (1991), citado por Anifantakis (1993), los conteos de mesófilos totales viables, *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Streptococcus*, fueron significativamente mayores durante los meses de mayo, junio y julio, mientras que los coliformes y los microorganismos aeróbicos formadores de esporas presentaron niveles mayores durante los meses de marzo y abril (estos datos fueron obtenidos en el hemisferio norte).

En Uruguay los estudios realizados en leche de vaca en diferentes estaciones del año indican un predominio de psicrótrofos desde abril a octubre y en los meses de junio y julio presentaron un mayor porcentaje de del género *Pseudomonas*. En los meses de verano predominan el género termodúrico *Microbacterium* sin incidencia en el deterioro de la leche (Bermúdez et al., 2000). Según Hull et al. (1992) citado por Viejo (2000) la proporción del género *Microbacterium* durante el invierno y verano es baja, y no tiene capacidad para deteriorar la leche por no tener efectos proteolíticos ni lipolíticos. Sin embargo, su importancia radica en sus condiciones de especie termodúrica con 100% de supervivencia respecto a otras especies termodúricas. Normalmente no se multiplican en forma apreciable en la leche cruda, aún a temperatura ambiente, por lo cual su presencia responde a la mala higiene de los equipos utilizados en el ordeñe.

2.9 ALMACENAJE EN FRÍO

La refrigeración es sin duda el sistema de conservación más utilizado en la producción lechera. En los tambos caprinos luego de obtenida la leche, esta puede seguir diferentes caminos. Ser directamente procesada en el propio establecimiento, vendida directamente como leche fluida; o ser vendida a la industria como materia prima. Si la leche no es procesada todos los días o la recolección no es realizada diariamente; es necesario la refrigeración de esta leche. El almacenaje de la leche en tanque de frío presenta ventajas y desventajas. Con respecto a las primeras: desde un punto de vista técnico la aplicación de bajas temperaturas (4 ºC) permite conservar la calidad original de esa leche producida al evitar el deterioro producto de un menor crecimiento de bacterias ácido lácticas y otros patógenos; debido a que en condiciones de refrigeración se reduce el tiempo de generación de los microorganismos.

Debe quedar en claro que la refrigeración no es una técnica que mejora la calidad de la leche, sólo produce una conservación de la calidad original a la entrada del tanque de frío. (Manfredini y Massari, 1989).

Desde el punto de vista económico la refrigeración permite reducir los costos de transporte, debido a que no es necesario una recolección diaria. Es una practica en ciertos países almacenar la leche en el tambo de 1 a 3 días a bajas temperaturas para reducir los costos de recolección.

En cuanto a algunas desventajas podemos citar: este método de conservación produce un crecimiento selectivo de bacterias psicrótrofas. Estas bacterias producen enzimas proteolíticas y lipolíticas (Driessen, 1983 citado por Picard et al., 1994). Este efecto de las proteinasas afecta la vida útil de los productos elaborados a partir de dicha materia prima (Auclair y Lenoir, 1980 citado por Picard et al., 1994). Las lipasas y proteasas, aún a bajas concentraciones son capaces de degradar la grasa y la proteína respectivamente, provocando un sabor rancio y amargo en la leche, y productos lácteos conservados en frío (Collins, 1981 citado por Silveira et al., 1998). Estas proteasas pueden, aún en bajas concentraciones, hidrolizar las proteínas de la leche. (Gómez, 1996 citado por Silveira et al., 1998).

La refrigeración de la leche puede producir un incremento en la forma soluble de las distintas fracciones de caseínas y las hace más susceptibles a la proteólisis (Cousin, 1989).

2.9.1 Efecto del almacenaje en frío en las propiedades fisicoquímicas

El almacenaje en frío provoca cambios en las propiedades fisicoquímicas, éstos incluyen disociación de las caseínas, especialmente β-caseína, de la micela (Creamer et al., 1977 citado por Raynal y Remeuf, 2000), solubilización del fosfato de calcio y una reducción del tamaño de la micela (Lenoir et al., 1974 citado por Raynal y Remeuf, 2000).

De los 4 tipos de caseínas, β-caseína es la que con más facilidad se solubiliza (Lenoir et al., 1974; Puhan, 1989 citados por Raynal y Remeuf, 2000). Ha sido demostrado que la leche de cabra, presenta dos formas de β-caseína, β_1 y β_2. Según O'Connor y Fox (1973), citado por Raynal y Remeuf (2000), las diferentes formas de β-caseína presentaban distinto comportamiento de solubilización a bajas temperaturas.

Raynal y Remeuf (2000), encontraron que las propiedades fisicoquímicas y las propiedades de coagulación de la leche de pequeños rumiantes fueron sólo levemente modificadas por el almacenaje a 4 ºC. En las propiedades de leche de cabra se vio un pequeño incremento de la caseína y el calcio soluble, pero las propiedades reológicas y el desuerado de la cuajada no fueron alteradas. A partir de este resultado se concluyó que el almacenaje en frío de leche de cabra tuvo consecuencias en la elaboración de quesos.

2.9.2 Efecto del almacenaje en frío sobre la flora microbiana

La temperatura y la duración del almacenamiento, la cantidad inicial y el tipo de bacterias presentes y en menor medida, los sistemas naturales de inhibición de la leche influyen en la multiplicación de las bacterias que tiene lugar en la leche almacenada (Cousins y Bramley, 1987). El frío impide por ejemplo la germinación de microorganismos esporulados

(Cromie, 1994). La conservación de la leche a bajas temperaturas provoca una selección de las bacterias psicrotróficas y en particular de algunas de ellas como las *Pseudomonas* (Mahieu, 1991). En un trabajo realizado por Bloquel y Veillet-Poncet (1980), encontraron que en leche de vaca refrigerada a 4ºC durante 4 días, esta tiene una modificación importante en la composición de la flora bacteriana original. Al 4to día de almacenaje, vieron una disminución en la proporción de especies mesófilas Gram positivas y un aumento de manera significativa de la flora psicrótrofa Gram negativas, 73% pertenecían al género *Pseudomonas*. Las especies *P. fluorescens* y *P. putida* son las que se identificaron en una mayor frecuencia.

Según Silveira et al. (1998), los microorganismos psicrótrofos representan menos del 10% de la flora inicial de la leche cruda, pero como son capaces de crecer rápidamente durante el almacenaje en frío de la leche, pasando a constituir un grupo dominante.

La calidad inicial de la leche a los 2-3 días de almacenaje se ve afectada por un aumento considerable de la flora psicrótrofa, si bien esto va a depender de la temperatura, ya que existe un efecto directo de esta sobre la duración de la fase de latencia y el tiempo de generación para cada microorganismo (Pla et al., 1992).

2.9.3 Cambios bioquímicos causados por los psicrótrofos

Estos microorganismos pasaron a ser un problema en la leche con la introducción del almacenaje en frío en la granja. La mayoría son bacilos Gram negativos, termolábiles que mueren durante la pasteurización. Sin embargo sus enzimas extracelularmente pueden resistir el calor y degradar importante constituyentes de la leche. Estas enzimas microbianas pueden afectar la calidad de productos lácteos, causando y/o acelerando reacciones fisicoquímicas y bioquímicas de deterioro durante el almacenamiento de la leche (Cousin, 1989).

Dichas enzimas (proteasas, lipasas y fosfolipasas) son segregadas por estas bacterias al final de la fase exponencial y comienzo de la fase estacionaria de la curva de crecimiento (Driessen, 1983 citado por Picard et

al., 1994). Según Miranda y Grippon, (1986) citado por Picard et al. (1994), esta segregación posiblemente se deba a la lisis celular de dichas bacterias. Por lo tanto el número de psicrótrofos no es un buen indicador de la proteólisis en la leche, ya que esta depende no solo de la cantidad sino también del tiempo y el tipo de cepa actuante (Picard et al., 1994). Según Adams et al. (1975), citado por Cousin (1982), un alto número de psicrótrofos no es necesario para producir una cantidad significativa de enzimas termoestables. Sin embargo Puhan (1989), sostiene que para que exista una actividad proteolítica debido a la acción de los microorganismos psicrótrofos, es necesario conteos en el rango de 5×10^5 a 10^6 para que la degradación de la caseína solubilizada en el suero sea significativa.

El efecto de la temperatura de crecimiento en la síntesis de proteasas y lipasas extracelulares por psicrótrofos en leche depende de la especie (Griffiths, 1990 citado por Silveira et al., 1998).

2.9.3.1 Degradación de proteínas

Los cambios en la proteína de la leche como resultado del crecimiento y/o la acción enzimática de los psicrótrofos son importantes para mantener la calidad de la leche y sus productos conservados a bajas temperaturas. La liberación de varios compuestos nitrogenados o la degradación de fracciones individuales de proteína han sido observadas durante estudios de proteólisis causados por enzimas psicrotróficas. Las proteasas pueden atacar caseínas y proteínas del suero, provocando un sabor amargo y la coagulación de la leche (Cousin, 1982).

Las proteinasas son enzimas que actúan en las proteínas causando su ruptura y transformación en péptidos de menor tamaño. Un claro ejemplo es la producción de la para-κ-caseína a partir de la κ-caseína (Cousin, 1989).

Según McKellar, la producción de proteinasas por *P. fluorescens* es alta a 20 ºC, mientras que Juffs et al. (1968), citado por Mottar (1989); encontró un descenso en la producción de proteinasas cuando la temperatura de incubación bajaba de 20 a 5 ºC. Las proteinasas producidas por *Pseudomonas* son mayormente activadas en rangos de temperatura entre 37 y 45 ºC. Stepaniak et al. (1982), citado por Mottar (1989), encontró

que algunas proteinasas producidas por *P. fluorescens* mantuvieron aproximadamente el 30% de su máxima actividad a 7 ºC y el 16% a 4 ºC. Las proteinasas producidas fueron muy estables y luego de tres meses de almacenamiento de cultivo, leche o productos a temperatura ambiente, se encontró una actividad considerable de proteinasas producidas por *Pseudomonas*. En la tabla 6 se muestran las principales bacterias productoras de proteinasas termorresistentes.

Análisis electroforéticos de caseínas hidrolizadas revelaron que la β y α_s-caseína fueron atacadas preferentemente por las proteasas psicrotróficas (Cousin, 1982). Las fracciones α_s y β-caseína son degradadas por los diferentes microorganismos psicrótrofos, pero la selectividad y el grado de degradación difirió entre estos (Cousin, 1982). En general la β-caseína es degradada en mayor grado que la αs-caseína por los diferentes microorganismos psicrótrofos (Cousin, 1982). La α_s y β-caseína aisladas de la micela fueron más susceptibles a la proteólisis que cuando éstas se encontraban formando parte de la estructura micelar. Cuando la temperatura fue más baja la β-caseína fue más susceptible a la proteólisis y la α_s-caseína fue más susceptible cuando la estructura micelar fue afectada por la remoción del fosfato de calcio coloidal (Fox y Guiney, 1973 citado por Cousin, 1982).

Tabla 3. Bacterias productoras de proteinasas termorresistentes.

P. fluorescens	*Achromobacter spp.*
P. putida	*Flavobacterium spp.*
P. fragi	*Aeromonas spp.*
P. putrefasciens	*Serratia marcescens*

(Mottar, 1989)

También, especies de *Bacillus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Aeromonas*, *Alcaligenes* y *Cytophaga* han sido estudiadas por la producción de enzimas proteolíticas pero menos frecuentemente (Cousin, 1989).

La degradación de las proteínas del suero por psicrótrofos ha sido menos observada.

2.9.3.2 Efecto de la degradación en la micela de caseína

Varias investigaciones sugieren que κ-caseína es preferencialmente hidrolizada por las proteinasas de los distintos tipos de microorganismos psicrótrofos, especialmente aquellas producidas por *Pseudomonas spp*. Esto sería lógico ya que la κ-caseína se encuentra ubicada en la superficie de la micela y estaría más disponible para una degradación inicial. La κ-caseína es degradada por las proteinasas en 2 péptidos, el glucomacropéptido (aa 106-169) que sale de la micela porque es hidrofílico y soluble, y la para-κ-caseína (aa 1-105) que permanecen en la micela porque es hidrofóbica (Cousin, 1989).

La β-caseína y α_s-caseína están protegidas de la proteólisis por la κ-caseína, pero la micela de caseína tiene poros, por los cuales podrían ingresar las proteinasas y degradar preferencialmente α_{s1}, α_{s2}, o β-caseína. Una vez que la κ-caseína fue removida, β-caseína y α_s-caseína quedan expuestas a la acción de las proteinasas (Cousin, 1989).

Los resultados de diversos estudios que se han realizado sobre la degradación de caseína por proteinasas psicrotróficas muestran, que κ, β y α_{s1}-caseínas son preferencialmente degradadas, dependiendo de que microorganismo proviene dicha proteinasa. Mucho de estos estudios indican que κ-caseína es degradada en primera instancia, esto puede deberse a que la κ-caseína se encuentra ubicada en la superficie de la micela, lo cual la hace más susceptible a la acción de las proteinasas psicrotróficas. Esta degradación puede tener implicancias en el uso de esta leche para la elaboración de quesos, donde la κ-caseína es esencial en la formación de la cuajada. La degradación de β y α_{s1}-caseínas también

pueden afectar la elaboración de quesos y otros productos lácteos (Cousin, 1989).

2.10 TÉCNICAS DE ELECTROFORESIS

La electroforesis es el movimiento de moléculas cargadas en un campo magnético. Este método es utilizado para la separación biológica molecular por dos motivos fundamentales: usualmente no afecta la estructura de los biopolímeros y porque es altamente sensible a las pequeñas diferencias tanto en carga como en masa molecular (Chaiken,M. Wilchek et al. , 1984)

2.10.1.Estudio de electroforesis en gel en caseína caprina.

Los componentes de la caseína caprina se logran identificar por SUGE a pH 8-6 en presencia de 6 M-UREA y o.o2%-mercanoethanol en bandas en series (Boulanger et al. 1984).
La degradación enzimática de la proteína ha sido analizada por electroforesis en geles de SDS-PAGE utilizando equipos Miniprotran11 (BIORAD) (Roby y White, 1990).
Las fracciones de caseínas se identifican individualmente por métodos de electroforesis capilar en condiciones ácidas. (G.R.Paterson et al 1995)
Los estados de caseínas α_{s1}-α_{s2}, y algunas variantes genéticas de β -caseína fueron separadas e identificadas claramente. ((J Otte, M. Zakora, 1997)

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente trabajo fue el estudio del deterioro de la leche de cabra causada por agentes microorganismos psicotrofos en condiciones de almacenamiento en frío y la obtención de información sobre la actividad enzimática de cepas psicrótrofas predominantes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar e idenificar cepas psicrótrofas en muestras de leche de cabra obtenidas del tanque de frío.

2. Evaluar por diferentes técnicas la actividad proteoítica de enzimas aisladas de la cepa seleccionada.

3. Determinar la velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación de cepas bacterianas que producen mayor deterioro

4. Evaluar la actividad enzimática desarrollada durante el crecimiento de las cepas en estudio.

5. Analizar por electroforesis la actividasd enzimática de la cepa seleccionada al almacenar a 20ºC la leche.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de leche caprina se obtuvieron del establecimiento experimental del INIA, Las Brujas (Canelones). Los análisis microbiológicos se realizaron en el laboratorio de la Unidad de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Agronomía, mientras que la técnica de electroforesis se efectuó en laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria.

El muestreo correspondió al período de lactancia del año 2002. La frecuencia de muestreo fue de 4 días seguidos (tiempo de almacenamiento de leche caprina antes de ser recogida), cada 14 días por 3 meses (setiembre a noviembre).

4.1 Muestras de leche

Se procesaron 20 muestras durante 3 meses, las que se obtuvieron asépticamente de los tanques de frío, en recipientes de plástico de 50 ml., previamente esterilizados a 121 ºC durante 15 minutos. Estas fueron transportadas al laboratorio en condiciones de refrigeración y procesadas inmediatamente luego de una homogeneización de 5 minutos a 37ºC.

4.2 Análisis microbiológico

El recuento microbiano viable se realizó en placa por diluciones seriadas decimales en tubo (10^{-1} a 10^{-6}) utilizando 9 ml de solución salina fisiológica (0,85 ClNa, p/v). Las muestras preparadas fueron transferidas por el método de siembra en superficie.

Los conteos de bacterias psicrótrofas se realizó por triplicado en Agar Caseína (1%) incubado por 10 días a 7º C, detectando la microflora caseinolítica (*Standard Methods for the Examinations of Dairy Products*)

4.3 Aislamiento e identificación de cepas bacterianas psicrótrofas

Los aislamientos provenientes de cultivos psicrótrofos a partir de Agar Caseína, se identificaron por pruebas bioquímicas primarias y secundarias, complementando los mismos con los resultados obtenidos por pruebas comerciales. Las colonias también se transfirieron al medio Agar King B para la detección de cepa productoras pigmentos, detectados con luz ultravioleta.

Los test anteriores basados en Mac Faddin (1990), Koneman y col. (1989), Blake y col. (1995), King y col. (1954), Craven (1992), se complementaron con la información obtenida con otros métodos como son: API 20E, API20EN, BBL cristal NF, BBL cristal G+.

4.4 Estudio de proteólisis

Se seleccionaron 56 cepas psicrótrofas con actividad proteolítica alta. Se realizó una estimación cuantitativa de la actividad proteolítica por el método de difusión en placa. Se utilizó para tal fin un medio de cultivo especial, Agar Leche Descremada caprina (ASM) en el que se midió el diámetro de los halos de degradación enzimática a 20º C, a las 48 h de incubación.

Las enzimas extracelulares se obtuvieron de cultivos líquidos idénticos para cada cepa y de los sobrenadantes provenientes de centrifugaciones a 14.000 rpm., 20 minutos en una centrífuga Hermlez 383 K y filtrados (filtro Millipore 0,20 µm) de las cepas en estudio.

Se eligieron las cepas con mayor actividad proteolítica y pertenecían a *Pseudomonas fluorescens* (188.2ª y 264.2ª).

4.5 Cinéticas de crecimiento y producción enzimática de las cepas *Pseudomonas fluorescens* 188.2ª y 264.2ª

La cinética de crecimiento y producción enzimática se realizó por triplicado en matraces de 500 ml con 350 ml de leche cruda descremada caprina estéril (10 libras, 10 minutos) a 200 rpm y a 7º C por 4 días, inoculándose con 9 x 10^5 ufc/ml.

Se determinaron en forma periódica para cada cepa recuento de viables (ufc/ml) y determinación de la actividad proteolítica por la técnica colorimétrica o-ftaldehído (OPA) (Church, *et al*., 1983; Weimer *et al*., 1989).

La cepa con mayor actividad enzimática y con menor tiempo de duplicación (tD=h) fue *Pseudomonas fluorescens* 188.2ª.

4.6 Obtención de fracciones enzimáticas

Las muestras obtenidas cada 24 h de la cinética de crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* 188.2ª., se centrifugaron también a 4ºC por 10

minutos a 10.000 rpm para separar el sobrenadante que fue filtrado (0,20 µm) y se obtuvo diferentes fracciones
Cada una corresponde:

1. a 24 h de crecimiento
2. a 48 h
3. a 72 h
4. a 96 h

4.7 Evaluación del deterioro de la caprina almacenada por un mes

Antes de realizar la electroforesis se inoculó 0,2 m de los filtrados de sobrenadante a tubos con 5 ml de leche caprina estéril descremada proveniente de tanque de frío, almacenados por 4 días y un mes a 20º C.

Los tubos testigos no se inocularon y se estudió por 96 h la esterilidad de la misma.

4.8 Estudio de deterioro enzimático por electroforesis en gel

La degradación enzimática de la caseína se analizó por electroforesis (SDS-PAGE) (Robyt y White, 1990).

Reactivos	Gel separador	Stacking (5%)
H_2O destilada	4,9 ml	2,7 ml
Mezcla de acrilamida/bisacrilamida 30%	6,0 ml	0,67 ml
Tris 1,5 M (pH 8, 8)	3,8 ml	--------
Tris 1,0 M (pH 6,8)	--------	0,5 ml
SDS 10%	0,15 ml	0,04 ml
Persulfato de amonio 10%	0,15 ml	0,04 ml
TEMED	0,006 ml	0,004 ml

Buffer de corrida, pH 8,3 (x5)

- Tris 15 g
- Glicina 72 g
- SDS 5 g
- Agua bidestilada desion. csp 100 ml

En el momento de usar, se diluyeron 200 ml del buffer 5x en 800 ml de agua destilada.

Buffer de muestra (sample buffer), pH 6,75 (x2)

- Tris 1,51 g
- Glicerol 20 ml
- SDS 4 g
- B-mercaptoetanol 10 ml
- Azul de bromofenol 0.05 g
- Agua bidestilada desion. csp. 100 ml

Preparación de las muestras:

A 10 µl de cada muestra de leche se le adicionaron 140 µl de agua destilada, y 150 µl de buffer de muestra

Condiciones de corrida:

El deterioro de la leche de cabra y oveja obtenidas en los 4 días de almacenamiento en tanque de frío se evaluaron por electroforesis en gel, SDS-PAGE al 12% por 1 hora, a temperatura ambiente, a 150v utilizando un equipo Miniprotean II (BIO-RAD). Los geles polimerizados se sembraron antes de la corrida con las muestras pretratadas y lo estándares de caseínas.

Luego de la corrida, los geles se sumergieron por un mínimo de 3 horas en la solución de tinción, compuesta
por:

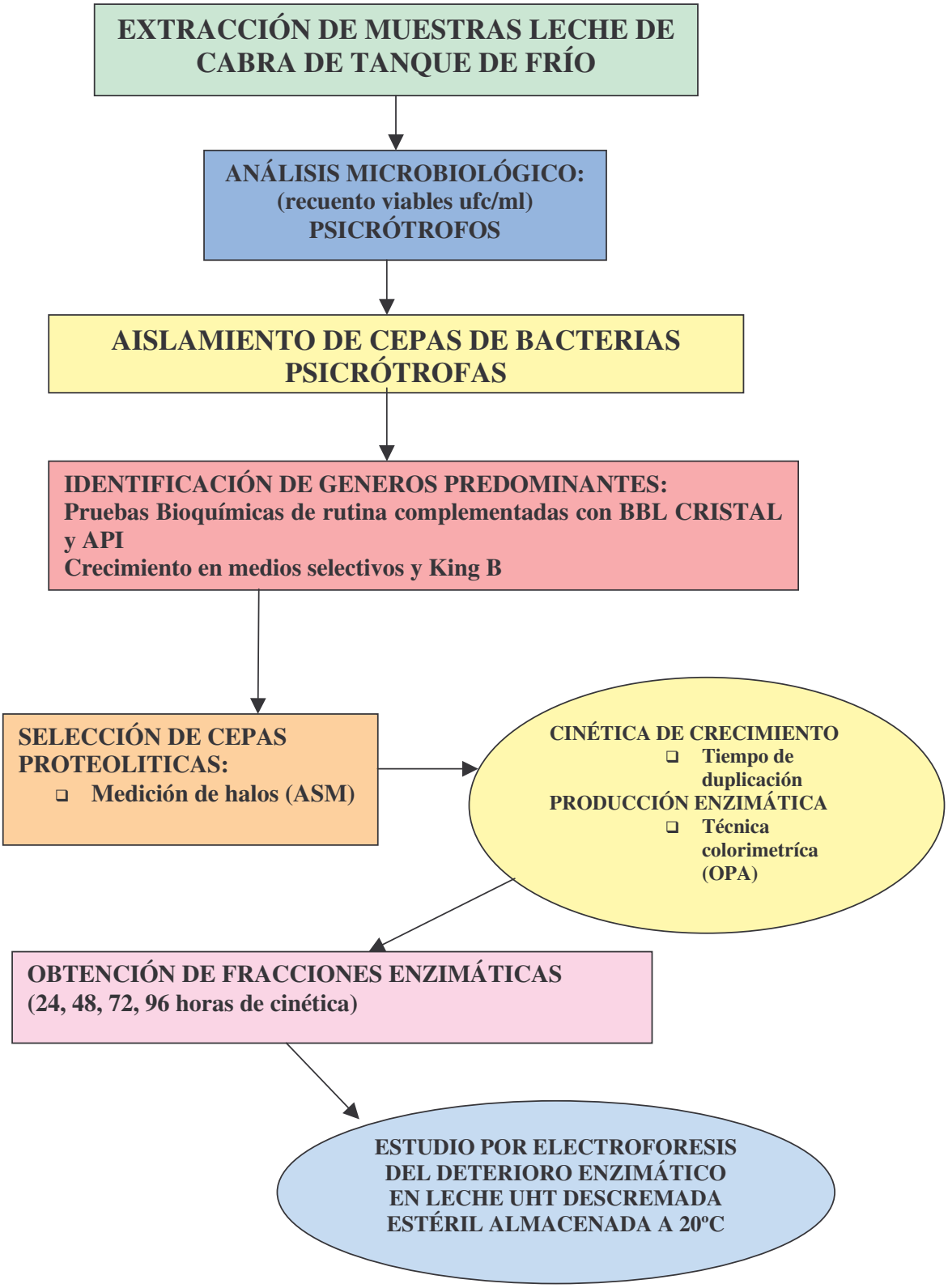
- Ácido acético 10%
- Metanol 50%
- Agua 40%
- Azul Coomasie 0,2 (conc. final).

Transcurrido el tiempo señalado anteriormente, el gel fue desteñido por lavados sucesivos con la siguiente solución de:

- Ácido acético 80 ml
- Alcohol 250 ml
- Agua 650 ml

Los geles se conservaron en esta solución hasta el momento de secado, el cual se realizo con un secador de geles BIO-RAD modelo 583.

Figura 1 Diagrama del procedimiento para el análisis de las muestras



5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Identificación de cepas bacterianas picrótrofas

En la Figura 2 se observan colonias de bacterias psicrótrofas de leche de tanque de frío crecidas en agar caseína a 4º C por 10 días.

Los géneros de psicrótrofos (Figura 3) en leche caprina aislados e identificados de muestras de leche de tanque de frío de este establecimiento en el período de lactancia 2002 fueron: *Pseudomonas* (80%), *Acinetobacter* (5%), *Flavobacterium* (3,5%), *Enterobacter* (10%) y *Alcaligenes* (1,5%). Predominando las especies de *Pseudomonas* y más comúnmente encontrados fueron : *fluorescens, fragi* y *putida*.

Los resultados indican que la composición de la flora microbiana presente en las muestras de leche en los tres meses del presente estudio revelan una disminución del conteo de los géneros de psicrótrofos al aumentar la temperatura ambiental.

5.2 Estudio de proteólisis

Las cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Flavobacterium* presentaron mayor actividad proteolítica en medio de cultivo agar caseína (Tabla 3).

Los diámetros de los halos de proteólisis para las 56 cepas evaluadas indicaron que las que producen mayor deterioro de la caseína son *Pseudomonas fluorescens* 188.2ª y 264.2ª . Los halos producidos en el período de incubación presentan diferentes dimensiones para los géneros aislados. Estos resultados revelan que al comienzo del ordeñe predominan especies de *Pseudomonas* y *Flavobacterium* que producen mayor deterioro en la leche,

Figura 3. Porcentaje de géneros bacterianas psicrótrofas en leche caprina con actividad proteolítica: 1. *Pseudomonas*, 2. *Acinetobacter*, 3. *Flavobacterium*, 4. *Enterobacter*, 5. *Alcaligenes*.

5.3 Cinéticas de crecimiento y producción enzimática de las cepas 188.2ª y 264.2ª.

Las cinéticas de crecimiento de las dos cepas de *Pseudomonas fluorescens* se observan en la figura 4.

La cepa 188.2ª tuvo mayor velocidad de crecimiento (μ= 0,348 h^{-1}) que la cepa 264.2ª (μ= 0,306 h^{-1}). El tiempo de duplicación (tD= 1.98 h) de la cepa 188.2ª fue menor que la cepa 264.2ª (tD= 2.25 h). La diferencia del tiempo de duplicación nos indica también el mayor grado de proteólisis de la cepa 188.2ª debido a un aumento considerable de la biomasa a la misma hora de evaluar la producción enzimática.

Tabla 3. Medida de diámetro de halos (mm) de proteólisis en agar caseína por las enzimas de las cepas aisladas psicrótrofas (> 5mm).

Género bacteriano	Diámetro halo (mm)
Pseudomonas fluorescens 216.2	5
Pseudomonas fluorescens 198.4	6
Pseudomonas fluorescens 164.3	8
Pseudomonas fluorescens 194.7	6
Pseudomonas fluorescens 2224.3	6
Pseudomonas fluorescens 224.8	8
Pseudomonas fluorescens 183.7	10
Pseudomonas fluorescens 78.5ª	6
Pseudomonas fluorescens 93.1	8
Pseudomonas fluorescens 131.5	10
Pseudomonas fluorescens 148.2	10

Pseudomonas fluorescens 61.2	8
Pseudomonas fluorescens 188.2ª	18
Pseudomonas fluorescens 78.1b	5
Pseudomonas fluorescens 264.2ª	16
Pseudomonas fluorescens 89.4	8
Pseudomonas fluorescens 34.9b	6
Pseudomonas fluorescens 101.3	6
Pseudomonas putida 28.4	6
Pseudomonas putida 165.3	8
Pseudomonas putida 219.1	10
Pseudomonas putida 216.9	6
Pseudomonas putida 72.5	5
Pseudomonas putida 61.1	8
Pseudomonas fragi 25.6	6
Pseudomonas fragi 28.3	8
Pseudomonas fragi 16.8	10
Pseudomonas fragi 177.7	10
Flavobacterium indologenes 59.3	8
Flavobacterium sp 95.2	10
Flavobacterium indologenes 66.3	11
Flavobacterium indologenes 89.1	9
Flavobacterium indologenes 95.3	10
Flavobacterium indologenes 76.4	8
Flavobacterium indologenes 24.7	6
Acinetobacter baumannii 12.4	5
Acinetobacter baumannii 13.8	5
Acinetobacter baumannii 15.7	8
Alcaligenes sp 2.3	8
Alcaligenes sp 2.5	7
Alcaligenes sp 3.4	5
Enterobacter aerogenes 32.1	8
Enterobacter aerogenes 36.9	9
Enterobacter aerogenes 32.4	10
Enterobacter aerogenes 33.6	10
Enterobacter cloacae 33.8	6
Enterobacter cloacae 49.6	8

En la figura 5 se detallan los resultados de la actividad proteolítica desarrollada durante la cinética de crecimiento para ambas cepas de *Pseudomonas.* La producción enzimática comienza a la 24 hora de incubación, mientras que la cepa 188.2ª incremento 7 log en relación al inóculo inicial con conteos de 3 x 10^{12} ufc/ml, mientras que la cepa 264.2ª incremento en el mismo tiempo 5 log con conteos 5 x 10^{10} ufc/ml. La mayor proteólisis de la leche caprina ocurrió a las 96 horas de crecimiento con conteos de 2,9 x 10^{12}.ufc/ml y 3,6 x 10^{10} ufc/ml, respectivamente.

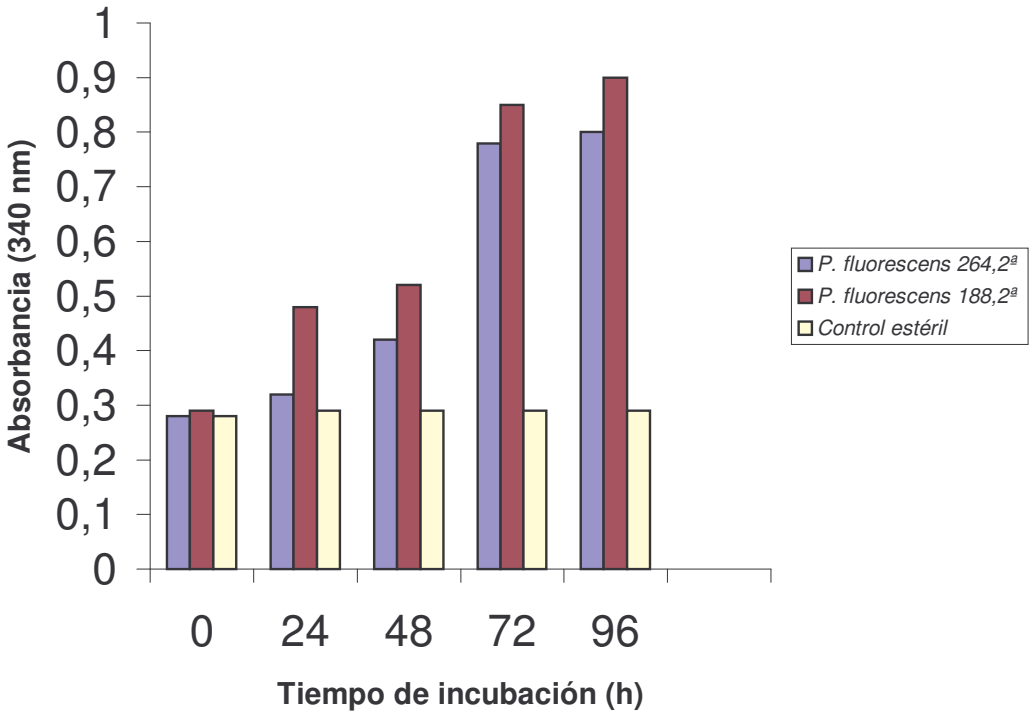


Figura 5 . Proteólisis en leche caprina incubada a 7° C producida por dos cepas de *Pseudomonas fluorescens* (188.2ª y 264.2ª).

5.4 Evaluación de deterioro de la leche

Los análisis de electroforesis (Figura 6) indican que la degradación de las caseínas κ-> β-> α_s ocurre con la concentración enzimática producida entre 48 y 96 horas correspondientes a la cinética de crecimiento de la cepa 188.2ª.

Las enzimas extracelulares producidas por *Pseudomonas fluorescens* 188.2ª utilizadas en este estudio muestran actividad sobre las caseínas κ, β, α_s a los 4 días de inoculadas. Se observa claramente que la caseína κ es rápidamente hidrolizada.

Los cambios causados por la inoculación de extractos enzimáticos libres de bacterias en leche caprina estéril e incubados a temperatura de 20° C por 4 días, indican que el deterioro ocurre con conteos > 10^7 ufc/ml de *Pseudomonas fluorescens* 188.2ª.

El almacenamiento de la leche caprina a 20ºC por un mes con el extracto enzimático presenta desarrollo de la proteólisis marcada en las muestras tratadas con la fracción 2.

Lo anterior nos indica que conteos mayores a 10^7 ufc/ml producen deterioro importante en leche caprina con la cepa seleccionada. También hay que señalar que este experimento se realizó al seleccionar una cepa para evaluar deterioro proteico. A nivel comercial en la leche existe una diversidad enzimática provenientes de microorganismos psicrótrofos que actúan y el efecto de hidrólisis es diferente.

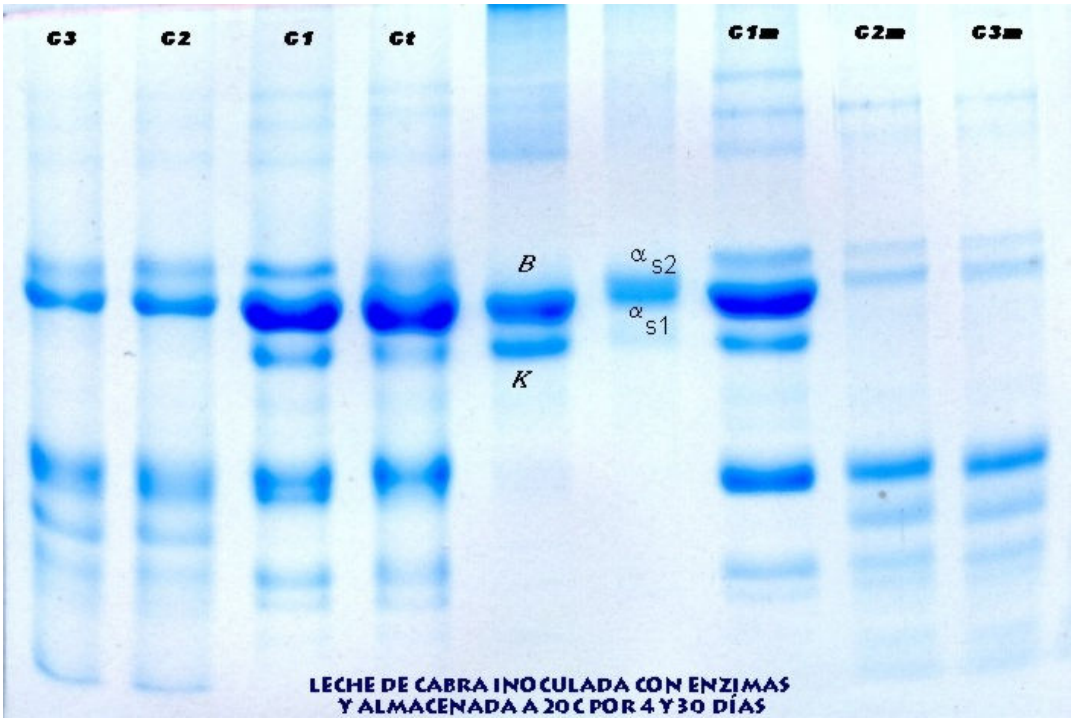


Figura 6. Leche de cabra estéril inoculada con enzima de Pseudomonas fluorescens 188.2ª, almacenada a 20º C por 4 días (C1, C2, C3) y por un mes (C1m, C2m, C3m).

Los resultados electroforéticos detectaron que el deterioro de la leche es marcado con conteos > 10^7, las κ– caseínas desaparecen a los 4 días de almacenamiento y luego de un mes se completa el deterioro lácteo en leche estéril tratada sólo con enzimas, simulando un proceso UHT.

En el tanque de frío el proceso ocurre por 4 días (período de almacenamiento antes de ser recogida) y la actividad enzimática es

realizada por un “pool” enzimático proveniente de diferentes géneros de bacterias psicrótrofas. Caraballo y Douglas, 2002; en su trabajo de tesis en los mismos meses se observó que la degradación enzimática de las caseínas se correspondió con el siguiente orden $\kappa > \alpha > \beta$. En el caso de almacenar en el tanque de frío por 3 o 4 días se debe considerar que en la leche caprina hay un deterioro importante en la fracción κ-caseína en los primeros meses de lactancia a partir de las 72 h. de almacenamiento.

6. CONCLUSIONES

Dada la presencia de bacterias psicrótrofas en condiciones de almacenamiento en frío en leche de cabra, y el alto grado de proteólisis que afecta la industrialización de la misma, el presente trabajo de investigación permitió obtener información sobre las principales cepas bacterianas que producen mayor deterioro en la leche lo que se refleja en la calidad de los productos lácteos y su aceptabilidad por los consumidores.

Fueron seleccionadas 56 cepas psicrótrofas con actividad proteolítica alta. Se realizó una estimación cuantitativa de la actividad proteolítica por el método de difusión en placa. Se utilizó para tal fin un medio de cultivo especial, Agar Leche Descremada Caprina (ASM) en el que se midió el diámetro de los halos de degradación enzimática a 20ºC, a las 48 hras de incubación.

Los resultados indicaron que los géneros de psicrótrofos aislados e identificados en leche caprina de muestras de leche de tanque de frío fueron: *Pseudomonas* (80%), *Acinetobacter* (5%), *Flavobacterium* (3,5%), *Enterobacter* (10%) y *Alcaligenes* (1,5%) Las especies predominantes fueron Pseudomonas, y entre ellas las más frecuentes: *fluorescens*, *fragi* y *putida*.

La importancia de la presencia de *Pseudomonas fluorescens* en leche de cabra y su actividad proteolítica desarrollada entre las 24 y 72 horas de almacenaje a temperaturas > a 5ºC, determinaron la disminución de la vida útil debido al deterioro de las diferentes fracciones de caseínas a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento.

Se estudiaron las cinéticas de crecimiento y producción enzimática realizadas por triplicado en matraces de 500 ml con 350 ml de leche UHT descremada estéril a 200 rpm y a 7ºC poe 4 días.

Se determinaron en forma periódica para cada cepa recuento de viables (ufc/ml) y determinación de la actividad proteolítica por la técnica colorimétrica o-ftaldehído (OPA) (Church et al., 1983; Weimer et al., 1989).

La actividad proteolítica detectada en leche de oveja es menor a la presentada en leche caprina en los meses de octubre a noviembre, predominando los géneros *Pseudomonas* (35 %) y *Enterobacter* (10 %) con menor conteo de psicrótrofos en el tanque de frío.

Los recuentos de mesófilos aerobios al 4to día de almacenaje de, fueron entre $4,2 \times 10^6$ y $5,9 \times 10^6$ UFC/ml.

Los conteos de psicrótrofos al 4to día de almacenaje en leche de cabra en tanque de frío fueron de $2,8 \times 10^5$ a $3,6 \times 10^6$ UFC/ml

La degradación enzimatica de las caseínas se correspondió con el siguiente orden $\kappa > \alpha > \beta$. Las fracciones de caseínas detectadas por electroforesis disminuyeron y en algunas ocasiones hubo una desaparición de las bandas lo que indica un deterioro en la composición caseínica de la leche, como fue el caso de la κ-caseína caprina en los primeros meses de lactancia a partir de las 72 hs. de almacenaje en tanque de frío. Esto es de importancia en la elaboración de productos lácteos (por ej. quesos). La importancia de mantener la integridad de las micelas de caseína se refleja en un mayor rendimiento quesero.

De acuerdo a los resultados obtenidos se recomienda refrigerar la leche de cabra máximo 48 hs. Este tiempo puede incrementarse hasta las 72 horas dependiendo de la estación del año, condiciones ambientales particulares del año en cuestión y el manejo general del tambo.

Es de destacar que este estudio se realizó al seleccionar una cepa para evaluar el deterioro proteico. A nivel comercial en la leche existe una diversidad enzimática proveniente de microorganismos psicrótrofos que actúan y el efecto de hidrólisis es aún mayor.

7. RESUMEN

Los objetivos generales del presente trabajo fue el estudio del deterioro de leche de cabra causada por agentes microorganismos psicrótrofos en condiciones de almacenamiento en frío y la obtención de información sobre la actividad enzimática de cepas psicrótrofas predominantes. Evaluar por diferentes técnicas la actividad proteolítica de las enzimas aisladas de la cepa seleccionada, determinar la velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación de las cepas bacterianas que producen mayor deterioro y evaluar la actividad enzimática desarollada durante el crecimiento de la cepa en estudio.

La muestras de leche caprina se obtuvieron del establecimiento experimental del INIA, Las Brujas (Canelones). Los análisis microbiológicos se realizaron en el laboratorio de la Unidad de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Agronomía, mientras que la técnica de electroforesis se efectuó en el laboratorio de bioquímica de la Facultad de Veterinaria. El muestreo correspondió al período de lactancia del año 2002. La frecuencia de muestreo fue de 4 días seguidos (tiempo de almacenamiento de leche caprina antes de ser recogida), cada 14 días por tres meses (setiembre a noviembre). Las muestras se transportaron refrigeradas y se le determinaron recuentos por el método de dilución en caja (UFC/ml) la presencia de psicrótrofos (Agar Caseína). Se identificaron y asilaron cepas bacterianas psicrótrofas mediante pruebas bioquímicas primarias y secundarias. También se estudio el deterioro de las caseínas por electroforesis en gel (SDS-PAGE) durante los 4 y 30 días de almacenamiento. Durante la primavera las especies predominantes fueron *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas fragi* (45 %), *Enterobacter aerogenes* (10 %) y *Acinetobacter* (15 %) con alta actividad proteolítica en leche de cabra.. Con respecto a la degradación enzimática en las caseínas es $\kappa > \alpha > \beta$ a partir del primer ordeñe y a las 48 hs. de almacenamiento en tanque de frío, la κ-caseína es deteriorada con mayor rapidez. La conservación de la leche durante los dos primeros días es adecuada y posteriormente (3-4 días) el incremento de psicrótrofos determina una disminución en la vida útil.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. ALAIS, C. 1985. Ciencia de la leche. Principios de Técnica lechera. Barcelona, Reverté. 873p.

2. ALICHANIDIS, E.; POLYCHRONIADOU, A. 1996. Special features of dairy products from ewe and goat milk from the physicochemical and organoleptic point of view. In: Proceedings, production and utilization of ewe and goat milk. Crete, Greece, Oct. 19-21, 1995, International Dairy Federation Publ., Brussels, Belgium, pp. 21-43.

3. ANIFANTAKIS, E. 1993. Bacteriological quality of raw goat's milk in Greece. Lait. 73: 465-472.

4. ASSENAT, L. 1991. Composición y propiedades. In: Leche y productos lácteos Vol. 1. Luquet, F. Zaragoza, Acribia. pp. 277-313.

5. BANKS, W.; DALGLEISH, G.; ROOK, J. 1989. La leche y su procesado. In: Microbiología lactologica Vol. 1. Robinson, R. K. Zaragoza, Acribia. pp. 1-32.

6. BERMÚDEZ, J.; REGINENSI, S. 2001. Ponencia Magistral. Calidad de la leche para la producción de productos lácteos diferenciados de alto valor en pequeños rumiantes. 2º Congreso Latinoamericano de Especialistas en Producción Ovina. Mérida, Yucatán, México 2001.

7. BERMÚDEZ, J.; REGINENSI, S.; VIEJO, J. 2000. Géneros bacterianos asociados al deterioro de la leche y productos lácteos. Jornada "Evolución, presente y futuro de calidad". Conaprole. Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay. 25 p.

8. BLAKE, M.; KOKA, R.; WEIMER, B. 1996. A semiautomated reflactance colorimetric method for the determination of lipase activity. Journal of Dairy Science. 79: 1164 -1169.

9. BLOQUEL, R.; VEILLET-PONCET, L. 1980. Évolution et détermination de la flore bactérienne d' un lait cru réfrigéré paucimicrobien en fonction du temps. Lait. 60: 474-486.

10. BONASSI, I.; KROLL, L.; VIEITES, R. 1996. Composiçao protéica do leite de cabra. Ciencia e Tecnologia de Alimentos. 17 (1): 57-63.

11. BONASSI, I.; MARTINS, D.; ROÇA, R. 1997. Composiçao química e propriedades físico-químicas do leite de cabra. Ciencia e Tecnologia de Alimentos. 16 (3): 218-222.

12. BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem 72:248

13. CARBALLO, A.; ILUNDAIN, M.; INCIARTE, J.; LATASTE, J. 1999. Estudio de la contaminación microbiana de la leche en seis tambos del departamento de Flores en dos épocas del año. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay, Facultad de Agronomía. 60 p.

14. COTTIER, H. 1991. Producción de leche de oveja. In: Leche y productos lácteos. Vol. 1 Luquet, F. Zaragoza, Acribia. pp. 315-329.

15. COUSIN, M. 1982. Presence and activity or psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. Journal of Food Protection. 45 (2): 172-207.

16. COUSIN, M. 1989. Physical and biochemical effects on milk components. In: Enzymes of psychrotrophs in raw food. Mc Kellar, R. Florida, CRS Press. pp. 205-224.

17. COUSINS, C.; BRAMLEY, A. 1987. Microbiología de la leche cruda. In: Microbiología lactologica Vol. 1. Robinson, R. K. Zaragoza, Acribia. pp. 109-150.

18. CRAVEN, H.; MACAULEY, B. 1992. Microorganism in pasteurized milk after refrigerated storage 1. Identification of types. Research paper. The Australian Journal of Dairy Technology. 47: 38-45.

19. CROMIE, S. 1994. Spoilage by heat-resistant, cold-tolerant bacteria. www.drdc.aust.com.

20. CHAMPAGNE, C.; GOULET, J. 1991 In: Ciencia y tecnología de la leche: principios y aplicaciones. Amiot, J. Zaragoza, Acribia. pp. 77-95.

21. CHURCH, F.C., H.E. SWAISGOOD, D.H. PORTER, and G.L. CATIGNANI. 1983. Spectophotometric assay using o-phtaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolates milk proteins. J. Dairy. Sci. 66:1290

22. FURTADO, M.; WOLFSCHOON-POMBO, A. 1978. Leite de cabra: Composiçao e industrializaçao. Revista do Instituto de Laticíneos Candido Tostes. Julio-Agosto, 1978. pp. 15-17.

23. GOURSAUD, J. 1991. Composición y propiedades físico-químicas. In: Leche y productos lácteos Vol. 1. Luquet, F. Zaragoza, Acribia. pp. 3-92.

24. HADDADIN, M.; IBRAHIM, S.; ROBINSON, R. 1996. Preservation of raw milk by activation of the natural lactoperoxidase systems. In: Production and utilization of

ewe and goat milk. Crete, Greece, Oct. 19-21, 1995, International Dairy Federation Publ., Brussels, Belgium, pp. 89-94.

25. HAENLEIN, G. 1996. Nutritional value of dairy products of ewes and goats milk. Proceedings, Production and utilization of ewes and goat milk, Crete, Greece, Oct. 19-21, 1995, International Dairy Federation Publ., Brussels, Belgium.

26. HAENLEIN, G. 1992. Lipids And Proteins In Milk, Particulary Goat Milk. http://ag.udel.edu/extension/information/goatmgt/gm-08.htm.

27. JENNESS, R.1980. Composition and characteristics of goat milk: Review 1968-1979. Journal of Dairy Science. 63 (10): 1605-1630.

28. KING, E.; WARD, M.; RANEY, D.; 1954. Two simple media for the determination of pyocyanin and fluorescin. Journal Laboratory Clinical Medicine. 44: 301-309.

29. KONEMAN, E.; ALLEN, S.; DOWELL, V.; SOMMERS, H. 1989. Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana 533p.

30. LE MENS, P. 1991. Propiedades físico-químicas, nutricionales y químicas. In: Leche y productos lácteos Vol. 1. Luquet, F. Zaragoza, Acribia. pp 343-360.

31. LOPEZ G. JUAREZ M. RAMOS M. Two dimensional electrophoresis and immunoblotting for the study of caprine whey protein polymorphism, Journal of Dairy Science (1995) 62 311-320.

32. MAC FADDIN. 1990. Identificación de bacteria Gram negativas. In: Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana. pp. 227-259.

33. MAHIEU, H. 1991. Modificaciones de la leche después de su recogida. In: Leche y productos lácteos Vol. 1. Luquet, F. Zaragoza, Acribia,, pp. 181-227.

34. MANFREDINI, M.; MASSARI, M. 1989. Small ruminant milk. Technological aspects: Storage and processing. Options Méditerranéennes –Séries Séminaires-. nº 6, 191-198.

35. MAURIELLO R. ADDEO F. A gel electrophoretic study of caprine casein. Journal of Dairy Research (1988), 55, 413-421.

36. MOTTAR, J. 1989. Effects on the quality of dairy products. In: Enzymes of psychrotrophs in raw food. Mc Kellar, R. Florida, CRS Press. pp. 227-243.

37. PICARD, C.; PLARD, I.; RONGDAUX-GAIDA, D.; COLLIN, J. 1994. Detection of proteolysis in raw milk stored at low temperature by an inhibition ELISA. Journal of Dairy Research. 61: 395-404.

38. PLA, R.; CARRETERO, C.; MOR-MUR, M.; GUAMIS, B. 1992. Refrigeración de la leche de oveja en la granja. Influencia de la conservación a baja temperatura sobre los recuentos de flora total y sicrótrofa. Revista Española de Lechería. 42: 42-44.

39. PUHAN, Z. 1989. Influence of cold storage on milk chemical aspects. Scienza e Técnica Lattiero-Caesaria. 40: 340-363

40. REGINENSI S.M.., VIEJO M.J. y BERMÚDEZ J.W. 2000. Géneros bacterianos asociados al deterioro de la leche y productos lácteos. Jornada técnica_calidad de leche, "Evolución Presente Futuro y Calidad". CONAPROLE. Hotel Figari.

41. RAYNAL, K.; REMEUF, F. 2000. Effect of storage at 4 ºC on the physicochemical and renneting properties of milk: a comparision of caprine, ovine and bovine milks. Journal of Dairy Research. 67: 199-207.

42. ROBYT, J.; WHITE, B. 1990. Electrohopretic Techniques. In: Robyt, J.; White, B. Biochemical Techniques. Teory and Pratice. Iowa State. University. Waveland Press, Inc. pp 129-157.

43. SASAHARA, K.; ZOTTOLA, E. 1993. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. Journal of Food Protection. 56 (12): 1022-1028.

44. SILVEIRA, I.; PINHEIRO, E.; TEIXEIRA, D. 1998. Influencia de microrganismos psicotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado. Higiene Alimentar. 12 (55): 21-27.

45. SUHREN, G. 1989. Producer microrganisms. In: Enzymes of psychrotrophs in raw food. Mc Kellar, R. Florida, CRS Press. pp. 3-34.

46. TIRARD-COLLET, P.; ZEE, J.; CARMICHAEL, L.; SIMARD, R. 1991. A study of the microbiological quality of goat milk in Quebec. Journal of Food Protection. 54 (4): 263-266.

47. VIEJO, J. 2000. Importancia de los psicrótrofos en la leche y sus productos. Monografía del primer año del Master en Ciencia e Ing. de los Alimentos. Colonia, Uruguay. Centro Politécnico del Cono Sur. 120 p.

48. WEIMER B.C., C.J. OBERG, L.V. MOYES, R.J. BROWN and G.H. RICHARDSON. 1989. Comparison of classic ion exchange aminoacid analysis and o-phtaldehide methods to caracterize proteolysis. J. Dairy. Sci. 72:2873:2876.