


F. 2979

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE AGRONOMIA

**PROTEOLISIS DE LECHE PRODUCIDA POR DOS CEPAS DE
Pseudomonas AISLADAS DE TANQUE DE FRIO**

Por

FACULTAD DE AGRONOMIA

DEPARTAMENTO DE
DOCUMENTACION Y
BIBLIOTECA

**Sergio Leonardo BOTTERO FAVRIN
Sandra Marina BOUTON HERNANDEZ**

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

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2001**

Tesis aprobada por

Directores :

Dra . Stella Reginensis

Ing. Agr. Jorge Bermúdez

Jurados :

Dra. Stella Reginensi

Ing. Agr. Jorge Bermúdez

Ing. Agr. Aldo Ibarra

Fecha: 20 de agosto del 2001

Autor:

Sergio Leonardo Bottero Favrin

Sandra Marina Bouton Hernández

AGRADECIMIENTOS :

1. A la Facultad de Agronomía, por nuestra preparación académica y por las facilidades brindadas.
2. A CONAPROLE y a CONICYT (proyecto 3023) por el financiamiento.
3. Al Ing Agr Jorge Bermudez y a la Dra Stella Reginensi por habernos brindado la oportunidad de haber trabajado bajo su dirección, por su amistad y apoyo profesional en todo momento permitiendo la culminación de esta tesis.
4. A Teresa Tombolini y Jimena Viejo por su colaboración en el procesamiento de las muestras .
5. A nuestras familias, por su calor y apoyo y a todas aquellas personas que en este momento escapan de nuestra memoria, pero que de alguna manera u otra contribuyeron a la realización de esta tesis, gracias .

LISTA DE FIGURAS GRAFICAS E ILUSTRACIONES

	Página
Figura I.....	20
Figura II.....	22
Gráfica 1.....	82
Gráfica 2.....	87
Tabla I.....	4
Tabla II.....	5
Tabla III.....	8
Tabla IV.....	26
Tabla V.....	27
Tabla VI.....	28
Tabla VII.....	38
Tabla VIII.....	39
Tabla IX.....	40
Tabla X.....	41
Tabla XI.....	42
Tabla XII.....	46
Tabla XIII.....	50
Tabla XIV.....	53
Tabla XV.....	57
Tabla XVI.....	81
Tabla XVII.....	84
Tabla XVIII.....	85
Tabla XIX.....	86
Tabla XX.....	89
Tabla XXI.....	89

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PAGINA DE APROBACION.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	III
I. <u>INTRODUCCION</u>	1
II. <u>REVISION BIBLIOGRAFICA</u>	4
II.A LA LECHE Y SUS COMPONENTES	4
II.A.1 <u>Agua de la leche</u>	5
II.A.2 <u>Grasa</u>	6
II.A.3 <u>Carbohidratos</u>	6
II.A.4 <u>Minerales</u>	6
II.A.5 <u>Componentes menores</u>	7
II.A.6 <u>Sustancias nitrogenadas</u>	7
II.A.6.a Proteínas	9
II.A.6.a.a Caseínas	9
II.A.6.a.b Proteínas del lactosuero o proteínas Solubles	10

II.A.6.a.c Proteasas Peptonas.....	10
II.A.6.b Sustancias nitrogenadas no proteicas.....	11
II.B PROPIEDADES ESPECTROFOTOMETRICAS E HIDRÓLISIS DE LAS PROTEINAS.....	11
II.B.1 <u>Propiedades Espectrofotométricas</u>	11
II.B.2 <u>Hidrólisis</u>	12
II.B.2.a Hidrólisis química.....	12
II.B.2.b Proteólisis.....	12
II.C CASEINA ENTERA.....	13
II.C.1 <u>Tipos de caseína</u>	14
II.C.1.a Caseína alfa s1.....	14
II.C.1.b Caseína alfa s2.....	14
II.C.1.c Caseína landa.....	14
II.C.1.d Caseína beta y las caseínas gama.....	14
II.C.1.e. La caseína Kappa.....	15
II.C.2 <u>Asociación de las caseínas</u>	16
II.C.3 <u>Estado de equilibrio</u>	17
II.C.4 <u>Acción de las enzimas coagulantes</u>	17

II.C.4.a Bioquímica de la coagulación de la leche	17
II.C.4.b Estudio analítico	18
II.C.4.c Reacción de las otras proteasas coagulantes	21
II.C.4.d Mecanismo de la reacción	21
II.C.4.e El fenomeno de la coagulación	23
II.D CALIDAD BACTERIOLOGICA DE LA LECHE	25
II.D.1 <u>Microbiología de la leche cruda</u>	26
II.D.1.a La microflora termodúrica	28
II.D.1.b La microflora psicrótrofa	29
II.D.1.c Microorganismos coliformes	31
II.D.2 <u>Microbiología de la leche pasteurizada</u>	31
II.D.3 <u>Microbiología en queso</u>	32
II.D.4 <u>Microbiología en leche UHT</u>	34
II.E CONTAMINACION MICROBIANA DE LA LECHE EN SU PRODUCCION	37
II.E.1 Contaminación debida a las mamas	39
II.E.2 Contaminación debida al agua	42

II.E.3 Contaminación debida a la Tierra.....	43
II.E.4 Contaminación debida al aire.....	44
II.E.5 Contaminación debida a mastitis.....	45
II.E.6 Contaminación de las ordeñadoras.....	45
II.E.7 Contaminación del tanque a granel.....	48
II.F CONTAMINACION DE LA LECHE DURANTE SU RECOGIDA.....	49
II.G FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO BACTERIANO.....	52
II.G.1 <u>Temperatura</u>.....	52
II.G.2 <u>Cantidad de bacterias y género</u>.....	54
II.G.3 <u>Tiempo</u>	57
II.G.4 <u>Presencia de sustancias inhibidoras</u>.....	59
II.H MICROORGANISMOS PSICROTROFOS.....	59
II.H.1 <u>Aspectos taxonómicos</u>.....	60
II.H.1.a <i>Pseudomonas</i>.....	60
II.H.1.b <i>Enterobacteriaceae</i>.....	62
II.H.1.c <i>Flavobacterium</i>.....	63

II.H.1.d <i>Cytophago</i>	63
II.H.1.e <i>Aeromonas</i>	64
II.H.1.f <i>Acinetobacter, Alcaligenes, y Achromobacter</i>	64
II.H.1.g Psicrótrofos Termodúricos.....	64
II.I MODIFICACIONES DE LA LECHE DESPUES DE SU RECOGIDA	65
II.I.1 <u>Principales alteraciones bioquímicas</u>	65
II.I.1.a <u>Proteólisis por psicrótrofos</u>	66
II.I.1.b <u>Producción y caracterización de las proteasas</u>	68
II.I.1.d <u>Hidrólisis de la proteína de la leche</u>	68
II.I.1.d <u>Grado de proteólisis</u>	69
II.I.1.e <u>Termoestabilidad e inactivación de las proteasa Psicrótróficas</u>	70
II.I.1.f <u>Detección de proteólisis</u>	71
II.I.1.g <u>Lipólisis por psicrótrofos</u>	71
II.I.1.h <u>Inactivación de las lipasas por calor</u>	73
II.I.1.i <u>Producción de fosfolipasas por psicrótrofos</u>	73

III. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	74
III.A. Metodología	74
III.A.1. Obtención de inóculo	74
III.A.2. Curva de crecimiento	75
III.A.3. Determinación de proteólisis por el método de difusión	76
III.B. Extracción de muestras	76
III.C. Curva estándar para proteínas	77
III.D. Preparación del inóculo	77
III.E. Inoculación de leche UHT estéril con cepas de <i>Pseudomonas Fluorescens</i> (1005) y <i>Pseudomonas fragi</i> (1886)	78
III.E.a. Cinética de crecimiento	78
III.E.b. Determinación de actividad proteolítica mediante técnica de OPA y método de difusión	78
III.E.b.a. Técnica de OPA	79
III.E.b.b. Técnica de difusión en Placa de Petri	79
IV. <u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	80
V. <u>CONCLUSIONES</u>	92
VI. <u>RESUMEN</u>	94
VII. <u>SUMMARY</u>	96
VIII <u>BIBLIOGRAFIA</u>	98

I.INTRODUCCION

La producción lechera del Uruguay mantiene una importante tasa de crecimiento, estable a través del tiempo, superando en la actualidad los 1.200 millones de litros anuales. El consumo interno de productos lácteos es muy superior a los valores mínimos recomendados, por lo que no se esperan incrementos en este sentido.

Más del 50% de la producción anual es exportada bajo distintos productos, por un valor aproximado de 150 millones de dólares.

El mercado internacional de los lácteos es altamente exigente en la calidad de los productos que consume. Gran parte de ello ya viene definido por la calidad de la materia prima, es decir de la leche remitida por los productores lecheros del país a las plantas industrializadoras. Es por ello que nuestro país debe apostar al aumento de la calidad de leche en los tambos, para así poder competir en el comercio internacional.

Calidad de leche es sinónimo de leches con: bajo conteo de células somáticas; bajo recuento microbiano; alto contenido proteico; sin inhibidores.

Estos factores además de afectar la calidad del producto final, lo hacen a nivel de la eficiencia del proceso industrial en términos de reducir los costos del proceso e incrementar el rendimiento industrial. Todos estos aspectos, afectan los resultados económicos y por ende también el precio de la leche percibida por el productor.

Los problemas más comunes en la industria láctea son aquellos que surgen debido a la presencia de psicrotrofos, de antibióticos o a la presencia accidental de sustancias químicas, aunque probablemente el problema más grave sea el primero, la contaminación por psicrotrofos.

El método de enfriamiento de la leche, en la granja en tanques refrigerados y la colecta en cisternas han influido considerablemente en la naturaleza de la flora microbiana de la leche cruda. Antes de la

implantación de estos métodos, la flora dominante estaba constituida por bacterias lácticas, actualmente la flora dominante es la psicrotrofa y en particular algunos de ellos como las *Pseudomonas*.

La presencia de esta nueva microflora actúa en detrimento de la calidad, tanto de la leche como de los productos derivados de ella. En el caso de la leche comercial la alteración se debe a la presencia de olores y sabores anómalos. La producción de queso se puede ver afectada desde dos puntos de vista, por un lado una carga bacteriana muy alta puede, a través de enzimas extracelulares proteolíticas, ocasionar una degradación significativa de caseínas y reducir el rendimiento del queso, por otro lado durante la maduración de los quesos se desarrollan sabores anómalos. En la leche UHT aparte de los cambios organolépticos y nutritivos que se producen durante el almacenamiento, puede observarse también modificaciones de la viscosidad que conducen, a veces a gelificaciones.

En la industria láctea, el término psicrótrofo se aplica para designar a micro-organismos capaces de desarrollarse en leche y productos derivados, a temperaturas de refrigeración comercial (4-7 °C), independientemente de su temperatura óptima de desarrollo. Si bien en teoría los gérmenes psicrótrofos constituyen un grupo taxonómico amplio, ya que incluye a bacterias, levaduras y hongos, en la industria láctea resultan predominantes las bacterias bacilares, gram (-), no esporígenas, catalasa (+) y sensibles al calor. El género más representativo es *Pseudomonas*.

Las bacterias psicrótrofas son consideradas actualmente el grupo de microorganismos alteradores más importantes en la industria láctea ya que es capaz de limitar la conservabilidad de leche y productos lácteos, mantenidos a bajas temperaturas.

Su capacidad deteriorante deriva de la producción, durante su desarrollo en leche, de enzimas extracelulares que alteran componentes esenciales de la misma, de manera irreversible. Las enzimas de mayor significación son proteasas, lipasas y fosfolipasas, muy activas hacia la caseína (proteasas) y grasa de la leche (lipasas y fosfolipasas). La actividad sobre la caseína implica un aumento del N soluble (con

disminución del rendimiento en quesería) y la producción de off-flavors (amargo, pútrido o sucio) por liberación de péptidos y aminoácidos específicos. Por su parte, las lipasas generan a partir de los triglicéridos de la grasa de leche, ácidos grasos libres (FFA), responsables de off-flavors, por sí mismos, o a través de una posterior oxidación o esterificación. Estos defectos de sabor no desaparecen con tratamientos de pasteurización o esterilización. Las fosfolipasas de bacterias psicotrofas favorecen la acción de las lipasas ya que al hidrolizar las lecitinas de la membrana del glóbulo graso, los triglicéridos del interior de éste quedan más expuestos al ataque por dichas lipasas.

Al margen de la actividad deteriorante de las enzimas mencionadas, otro factor adicional de gran impacto tecnológico lo constituye sus elevadas termorresistencias. La mayoría de estas no se inactivan con tratamientos de pasteurización (HTST) e incluso, en muchos casos, de esterilización (UAT), condicionando la conservación de todos los productos elaborados con la leche conteniendo estas enzimas. De este modo, las leches calentadas (pasteurizada y esterilizada), los quesos madurados y otros derivados, pueden potencialmente ser alterados durante su almacenamiento.

Los métodos para controlar el nivel de bacterias psicrótrofas en leche cruda que se industrializará incluyen una acción al nivel de su obtención (higiene del ordeño), el control estricto de la refrigeración durante el almacenamiento de la leche, el agregado de bacterias lácticas específicas y adición o eliminación de gases. Todos ellos tienden a limitar la multiplicación de estas bacterias en frío y, por ende, las alteraciones provocadas sobre los componentes de la leche.

El control o destrucción de los microorganismos una vez han llegado a la leche no es fácil ni eficaz, pero sí lo es evitar la contaminación desde un primer momento.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

II.A. LA LECHE Y SUS COMPONENTES

Según la ordenanza bromatológica municipal la leche es el producto de la secreción mamaria natural obtenida por una o varios ordeños, sin adición ni sustracción alguna. O sea que se entiende por leche, sin otro calificativo el producto integral del ordeño total e ininterrumpido de vacas lecheras sanas, adecuadamente nutridas y no fatigadas, recogida en forma higiénica y sin contener calostro.(Ordenanza Bromatológica Municipal, decreto N° 27.335 del 12/09/96). No debe tener menos de 3.25% de grasa de leche y no menos de 8.25% de solidos no grasos de leche.(Revilla Aurelio, 1969)

Sus principales caracteres físicos y fisico-químicos, de determinación inmediata son los siguientes según la Tabla I:

Tabla I

Densidad a 15°C	1,030 a 1,034
Calor específico	0,93
Punto de congelación	-0.55°C
PH	6,5 a 6,6
Acidez (°Dornic)	16 a 18
Indice de refracción a 20°C	1,35

(Lactología Técnica 1988 Dr. Roger Veisseyre)

La leche es una mezcla de agua, grasas, carbohidratos, proteínas, minerales, gases, enzimas, vitaminas y bacterias. Está compuesta de 107 diferentes sustancias reconocidas. La leche de las vacas en Uruguay tiene la siguiente composición según la Tabla II.

Tabla II

Agua	88 %
Grasa	3.65 %
Caseína y albúmina	3.20 %
Lactosa	4.8 %
Ceniza o minerales	0.75 %

La composición de la leche varía según : raza, animal individual y el hato, período de lactancia, condición de la vaca en el parto, estación del año, etapas de la ordeña, sección de la ubre, edad de la vaca, cambio de vaquero, alimento, excitación, cambios súbitos e importantes de la temperatura, enfermedades, influencia de las drogas, frecuencia de las ordeñas.

II.A.1. Agua de la leche

El contenido de agua en la leche puede variar de 84% a 89%. El agua de la leche es igual a cualquier otra agua. Su función es sostener a los sólidos de la leche parcialmente en solución y parcialmente en suspensión.

II.A.2. Grasa

La grasa existe en la leche como emulsión de pequeños glóbulos esféricos cuyo diámetro varía de 2 a 10 micras según la raza de la vaca. La materia grasa agrupa un conjunto de numerosas sustancias de estructura química diferente, pero todas ellas solubles en estado anhidro en disolventes orgánicos apolares, como cloroformo, benceno o éter.

Uno de los papeles más importantes que tiene la grasa en los productos lácteos es conferirle el sabor característico. Además del sabor la grasa brinda una contextura y textura propia en los productos lácteos.

II.A.3. Carbohidratos

El disacárido lactosa es el carbohidrato predominante y específico de la leche. Sin embargo, existen además pequeñas concentraciones de monosacáridos (incluyendo glucosa y galactosa), oligosacáridos neutros y ácidos y carbohidratos ligados a la proteínas.

II.A.4. Minerales

La leche contiene sales tanto disueltas (moléculas e iones) como en estado coloidal. La mayoría de estas sales son de tipo mineral, siendo por ejemplo fosfatos de calcio, aunque también los hay de origen orgánico. La fracción aniónica de estas moléculas suele ser el citrato, y el catión siempre es de origen mineral. Se puede decir que los valores van de 8 a 10 g.l⁻¹ en la leche de vaca. Son compuestos con características ácidas.

Las interacciones entre Ca²⁺, Mg²⁺, fosfato, citrato y caseínas determinan la composición iónica de la leche y afectan a la estructura de las micelas de caseínas.

II.A.5. Componentes menores

a- Fosfolípidos- El principal fosfolípido encontrado en la leche es la lecitina.

b- Colesterol- Se halla en proporción directa con la grasa, se calcula una concentración de 105 a 176 ppm

c- Pigmentos- i) Caroteno
ii) Riboflavina

d- Enzimas- En condiciones normales, la leche contiene una gran variedad de enzimas. A la actualidad se han encontrado más de 60 diferentes enzimas. La distinción entre los componentes nativos y los procedentes de aportes externos no es fácil, pues se sabe que la leche contiene numerosas células extrañas (leucocitos, microorganismos) que elaboran también enzimas. La mayoría de las enzimas presentes pertenecen a las óxido-reductasas, las transferasas y las hidrolasas.

e- Vitaminas-La leche es una fuente no despreciable de estas sustancias. En general, las vitaminas se clasifican en dos grandes categorías:

-Las vitaminas hidrosolubles (vitaminas del grupo B, vitamina C) que se encuentran en la fase acuosa (leche desnatada, lactosuero).

-Las vitaminas liposolubles (vitaminas A, D, E, K y F) que están asociadas a la materia grasa (nata y mantequilla).

f-Hormonas- Las hormonas que se encuentran en la leche pertenecen a las familias de hormonas proteicas, peptídicas y esteroides. Las hormonas más estudiadas en la leche son las proteicas y las peptídicas, y en particular la prolactina.

II.A.6. Sustancias nitrogenadas

Las sustancias nitrogenadas forman la parte más compleja de la leche.

La importancia de la parte proteica de la leche es muy grande por varias razones:

a- Las sustancias nitrogenadas se encuentran entre las más abundantes (aunque en la leche de los rumiantes es aproximadamente en la misma proporción que los lípidos).

b- Las propiedades físico - químicas más importantes de la leche, en especial la estabilidad, se deben a la presencia de prótidos en forma micelar.

c- Los prótidos son muy importantes desde el punto de vista nutritivo.

d- Las proteínas son los componentes fundamentales de las células y los más importantes de todos los materiales biológicos: enzimas, inhibidores, anticuerpos.

Tabla III

Protéido	Caseína bruta		27,0 gr	
	Proteínas del lactosuero	β lactoglobulina	3,0gr	6,2 gr
		Lactoalbúmina	1,2gr	
		Albúmina sérica	0,4gr	
		Inmunoglobulinas	0,7gr	
		Proteosas-peptonas	0,6gr	
		Proteínas menores	0,3gr	
	Aminoácidos, oligopéptidos, sustancias nitrogenadas no protéicas (urea, ácido úrico, etc.)	Nitrogeno no proteico		1,6 gr

(Dr. Roger Veisseyre 1988)

II.A.6.a. Proteínas

La proteína de la leche juega el papel más importante en la elaboración de quesos. Las principales proteínas de la leche de vaca son: α s1-caseína, α s2-caseínas, β -caseínas, κ -caseína, α -lactalbúminas, β -lactoglobulinas, seroalbúmina e inmunoglobulinas e inmunoglobulinas IgG1, IgG2, IgA, e IgM. (Robinson, R. K. 1987).

Las proteínas de la leche se diferencian de los constituyentes del NNP por el tamaño de sus moléculas, formadas por uniones complejas de aminoácidos y cuyas masas moleculares van desde 12.000 hasta 380.000 daltons (Ribadeau-Dumas, 1981 citado por Ch. Alais).

En la leche las proteínas se presentan en dos fases diferentes, una fase micelar inestable, constituídas por partículas sólidas, en suspensión, las micelas, que difunden la luz y dan a la leche su aspecto blanco opaco son las caseínas, y, una fase soluble estable, constituída por diferentes polímeros protéicos hidrófilos, que constituyen las proteínas solubles o proteínas del lactosuero.

II.A.6.a.a. Caseínas

Entre las proteínas de la leche, la caseína es la más común y representa el 80% de las proteínas. La leche desnatada al microscopio electrónico muestra a la caseína bajo la forma de gránulos esféricos, cuyo diámetro varía de 40 a 200 micrómetros. Las caseínas se presentan formando micelas que son complejos orgánicos constituídos por proteínas desnaturizada, es decir, en forma de una cadena floja, enmarañada, que une se une por enlaces químicos fosfato de calcio (mineral) coloidal; las proteasas penetran fácilmente en las cadenas peptídicas.

II.A.6.a.b. Proteínas del lactosuero o proteínas solubles

Las más abundantes tienen las propiedades de las albúminas y de las globulinas. Se insolubilizan por el calor antes de los 100°C

Las proteínas solubles se encuentran, en forma de una cadena enrollada muy cerrada, no desnaturalizadas y son exclusivamente de naturaleza orgánica. Los iones y las enzimas se introducen difícilmente en la estructura nativa.

Estas proteínas permanecen solubles en el lactosuero, tanto si la leche se ha coagulado por acidificación a pH 4,6 como si se ha hecho por vía enzimática. Por el contrario, el calentamiento de la leche las desnaturaliza, es decir, provoca su floculación. Sin embargo, esta insolubilización depende mucho del grado de calentamiento y de las condiciones técnicas, tales como la acidificación, etc. (Luquet, F.M. 1991).

Las proteínas del lactosuero son las sustancias no dializables contenidas en el "suero isoeléctrico" (obtenido tras la precipitación de la caseína a pH 4,7) y en el "suero de la cuajada" (aunque éste contiene también caseinoglicopéptido).

Si se exceptúa una parte de las glicoproteínas, las proteínas del lactosuero precipitan en su casi totalidad con el ácido tricloroacético al 12%. Estas proteínas representan un 17% de las materias nitrogenadas de la leche de vaca.

II.A.6.a.c. Proteasas-Peptonas

Son sustancias glicoprotéicas con un volumen molecular intermedio entre el de las proteínas y el de los péptidos. En la leche abundan poco. Son péptidos que provienen de la caseína beta como resultado de su proteólisis por la plasmina, (Luquet, 1991). Se trata de una fracción pequeña, de la magnitud de las inmunoglobulinas (0,6 gr/l). Estas sustancias están incluidas en el grupo de las proteínas porque precipitan en gran parte por el ácido tricloroacético al 12% y no se

dializan aunque se distinguen de las anteriores por el hecho de que no precipitan por calentamiento a 95-100 °C.

II.A.6.b. Sustancias nitrogenadas no proteicas

Constituyen una parte escasa, pero que comprende un gran número de sustancias de peso molecular inferior a 500. Estas sustancias son dializables, y permanecen en solución en las condiciones en que se produce la precipitación de las proteínas. Su estructura química es muy variada.

II.B. PROPIEDADES ESPECTROFOTOMÉTRICAS E HIDRÓLISIS DE LAS PROTEINAS

II.B.1. Propiedades Espectrofotométricas de las proteínas de la leche

Las proteínas de la leche no muestran bandas de absorción en el espectro visible ya que son incoloras, salvo un componente menor, la lactoferrina. Por el contrario, originan bandas características en los espectros ultravioleta e infrarrojo. Una de las más interesantes es aquella cuyo punto máximo se sitúa hacia 280 micrometros, y se debe a los aminoácidos de la serie aromática, tirosina y triptófano. Esta propiedad permite valorar las proteínas por espectrofotometría en el ultravioleta, (Alais, C. 1985).

II.B.2. Hidrólisis

II.B.2.a. Hidrólisis química

Es una degradación consecutiva a la ruptura de enlaces peptídicos; por lo tanto existe una destrucción de la estructura primaria con liberación de fragmentos moleculares más o menos largos. Algunos agentes desnaturalizantes pueden provocar la hidrólisis si se les hace actuar de una manera intensa o más prolongada. Como es el caso del calentamiento a más de 100°C , de los ácidos fuertes y las bases.

II.B.2.b. Proteólisis

Las proteasas catalizan la hidrólisis enzimática, especialmente las del sistema digestivo: pepsina, tripsina y quimotripsina. Cada una de ellas tiene preferencias por la ruptura de determinados enlaces peptídicos, con fijación de una molécula de agua. El cuajo es una proteasa de alta especificidad; en las condiciones prácticas de empleo rompe muy pocos enlaces.

Una fase esencial de la fabricación de los quesos es la proteólisis parcial de la caseína durante la "maduración"; la proteína insípida e insoluble se transforma en productos sápidos y solubles; la proteólisis secundarias.

Se pueden realizar hidrolizados enzimáticos con varias proteinasas y en un grado de hidrólisis más o menos grande, pero en el caso de las caseínas existe el problema de la aparición de péptidos amargos. Pese a todo, se dispone de armas para disminuir el amargor, particularmente el tratamiento con la leucina aminopeptidasa, (Alais, C. 1985).

II.C. CASEINA ENTERA

La caseína entera es el complejo proteico fosforado, de carácter ácido, que precipita a pH 4,6. Se le designa igualmente caseína isoeléctrica.

Su contenido medio es de 27 gr/l en la leche de vaca. Puede variar en valor absoluto pero mucho menos que la materia grasa. La proporción de caseína del total nitrogenado varía de 74 a 79% en leches normales. (Alais, C. 1985).

Todas las caseínas son moléculas de gran tamaño que contienen fósforo y un gran número de aminoácidos, entre los cuales los más abundantes son el ácido glutámico y en menor grado la leucina y la prolina.

Las caseínas se presentan en la leche en forma micelar, un complejo orgánico de caseínas α_s , β , y κ unidas a $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ coloidal. Está constituida por subunidades micelares (submicelas) de 15 a 20 nm de diámetro. Las submicelas, de unos 250.000 daltons de masa molar, unidas entre ellas por $(\text{PO}_4) \text{Ca}_3$, dan lugar a la micela. (Luquet, F. M. 1991).

FACULTAD DE AGRONOMIA



DEPARTAMENTO DE
DOCUMENTACION Y
BIBLIOTECA

II.C.1. Tipos de caseína

II.C.1.a. Caseína alfa-s₁

Esta caseína es la proteína más importante en masa (del 39 a 46 % del total de proteínas). Posee 199 aminoácidos con una masa molecular de alrededor de 23.600 daltons. Es muy sensible al calcio al pH normal de la leche, pudiéndose producir su floculación a cualquier temperatura (Luquet, F. M. 1991).

II.C.1.b. Caseína alfa-s₂

La caseína α_{s2} , presente en cantidad modesta (8-11 %), está compuesta por 207 aminoácidos. El peso molecular va de 25150 a 25390 (Alais,C. 1985).

Esta caseína es muy sensible al calcio, cualquiera que sea la temperatura, debido a su riqueza en grupos fosfato. (Luquet,F.M. 1991).

II.C.1.c. Caseína lambda

Esta caseína nunca ha sido plenamente identificada. Podría ser uno o varios fragmentos de la caseína α -s₁. Es bastante rica en fósforo (1.32 %). (Alais, C. 1985)

II.C.1.d. La caseína beta y las caseínas gama

v) La caseína β

Esta caseína se encuentra en cantidades importantes (25-35%), tiene 209 aminoácidos, y una masa molar de unos 24.000 daltons. La

caseína β no es sensible al calcio más que a la temperatura ambiente, hacia 20°C y por encima de estos. A baja temperatura, por debajo de 10°C, permanece soluble en presencia de calcio. La desfosforilación enzimática pierde su sensibilidad al calcio y se impide la precipitación de la caseína α -s₁ por el calcio, pero con una menor eficacia que la caseína kappa.

Entre los péptidos de este origen se encuentran sustancias fuertemente amargas, pero también se encuentran sustancias de actividades biológicas específicas.

vv) Las caseínas gamma

Tras un decenio de investigaciones, hoy se conoce el origen de las tres caseínas σ . Han sido Gordon y colaboradores, 1972 (citados por Alais, C. 1985) quienes han concluido que eran fragmentos C-terminales de la caseína beta. Las roturas se realizan tras una lisina, y se podía pensar en la acción de una enzima tipo tripsina en la misma glándula mamaria. No se sabe por que la caseína beta no sufre más que tres rupturas de enlaces peptídicos.

II.C.1.e. La caseína kappa

La caseína κ por su composición y propiedades, es uno de los constituyentes de la caseína bruta más interesantes. La caseína κ es pobre en fósforo (0.2% lo que representa 1 a 2 átomos de P por molécula). Por el contrario, su contenido en serina y treonina es elevado y sobre todo es notable la presencia de cisteína (aminoácido azufrado).

La estructura primaria de las caseínas kappa lleva 169 restos de aminoácidos, lo que da un peso molecular de 19000, menor que el de las caseínas sensibles al calcio.

La caseína κ es la única caseína que contiene una fracción glucídica, que está formada por una o varias secuencias galactosamina-galactosa-ácido-N-acetilneuramínico o ácido siálico. Se presenta bajo diversas

formas caracterizadas por su contenido en glúcidos. Estas fracciones no están regularmente repartidas a lo largo de la cadena peptídica, pero parecen agruparse en el extremo COOH terminal.

Propiedades y características

Entre las diferentes fracciones que constituyen la caseína entera, la caseína kappa ocupa una posición excepcional, a pesar de su proporción relativamente pequeña, del 13%, y ello por las siguientes razones:

1) La caseína kappa es soluble en presencia de calcio a todas las temperaturas.

Cuando se adiciona a una solución de caseína completa a pH 7 y a 20°C, cloruro de cal a concentración 0.4 M, el complejo se disocia y, las caseínas alfa-s y beta precipitan, mientras que y la caseína kappa queda en la fase líquida.

2) La caseína kappa posee, sobre las otras caseínas, un poder estabilizante frente al calcio. Tiene el papel de coloide protector y permite la formación de micelas estables en presencia del calcio.

3) La molécula de caseína kappa contiene un enlace Fen-Met muy lábil, que constituye el sustrato específico de la quimosina (cuajo) en el curso de la primera fase que precede a la coagulación de la leche.

4) La caseína kappa contiene dos restos de cisteína por molécula en estado nativo.

5) La caseína kappa contiene restos glucídicos fijados como: galactosa 1.3%, galactosamina 1.4%, ácido N-acetilneuramínico (o siálico) 2.0%.

II.C.2. Asociación de las caseínas

Una de las propiedades más destacadas de las caseínas α_1 , β y κ es poderse asociar para formar polímeros complejos. La situación es muy diferente según que el medio contenga calcio, como la leche, o no lo contenga. En el primer caso los complejos ternarios forman micelas. (Alais, C. 1985)

Las caseínas se asocian entre ellas, principalmente por interacciones hidrófobas. Se han observado tres asociaciones binarias: α_s - κ β - κ y α_s - β . Las mediciones termodinámicas muestran que κ se une más fuertemente a α_s que a β . (Alais, C. 1985)

II.C.3. Estado de equilibrio

En la leche, las caseínas no se encuentran totalmente en estado micelar; del 5 al 10% de las caseínas se encuentran bajo forma de monómeros o de pequeños agregados; es la caseína soluble. (Alais, C. 1985)

El equilibrio entre las formas micelar y soluble es muy variable, principalmente en función de la temperatura y el contenido de la leche en calcio iónico. Así, una disminución de la temperatura aumenta la proporción de caseína soluble.
(Veisseyre, R.1988)

II.C.4. Acción de las enzimas coagulantes

II.C.4.a. Bioquímica de la coagulación de la leche

Cuando se añade cuajo a la leche se observa primeramente, antes de cualquier modificación de la estructura física del líquido, una proteólisis limitada. Esta reacción, llamada reacción primaria, es rápida al principio, después más lenta y finalmente nula cuando la cantidad de nitrógeno liberado alcanza el 1,5 a 2% del contenido en nitrógeno de la caseína nativa. Es preciso hacer notar que la reacción primaria puede también desarrollarse a baja temperatura, próximo a

0°C. Su coeficiente de temperatura Q_{10} a la 10 es cercano a 3, es decir débil. Al pH de la leche fresca la reacción es rápida, a pH 3,5 está claramente frenada y a pH 2 cesa.

Al finalizar la reacción primaria la cantidad de nitrógeno liberada no aumenta más y se observa la coagulación de la leche que se traduce por la formación de un gel homogéneo. Esto es la reacción secundaria que no se desarrolla a una velocidad conveniente más que cuando la temperatura es superior a los 15°C. Por debajo de esta temperatura, la coagulación es larga y a 0°C exige varias decenas de horas. El coeficiente de temperatura, Q_{10} , de la reacción secundaria es elevado, próximo a 15, lo cual explica las dificultades para la coagulación de la leche a baja temperatura. (Veisseyre, R. 1988)

El lactosuero separado de la cuajada contiene una sustancia soluble nueva denominada proteosa de Hammarsten, que representa alrededor del 6% de la caseína original. La caseína modificada se ha denominado paracaseína, y se distingue de la caseína completa por su insolubilidad en presencia de pequeñas cantidades de calcio.

II.C.4.b. Estudio analítico

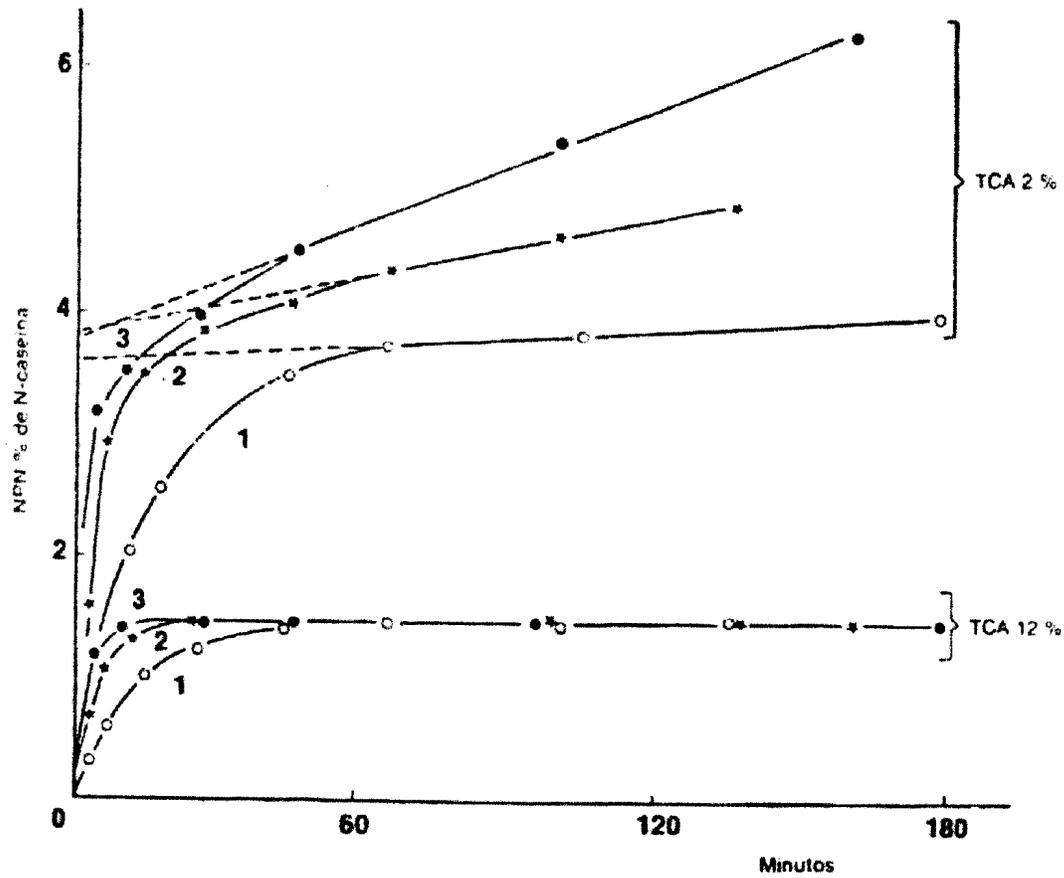
Se puede seguir el curso de estas dos reacciones en función del tiempo, mediante la determinación del nitrógeno no proteico, o (N.P.N.), soluble en 2 y 12 % de ácido tricloroacético (TCA).

La Figura 1 muestra las curvas de proteólisis obtenidas con la caseína entera de vaca como sustrato. Con el 12% de TCA, la reacción primaria se manifiesta sola; la velocidad es máxima al principio y a continuación va disminuyendo y se vuelve prácticamente nula; entonces se alcanza un valor final de la proporción de nitrógeno no proteico; este valor corresponde a la solubilización de un 1,5 % del nitrógeno de la caseína, en el caso de la leche o en el de soluciones de

caseína de vaca, en la que la concentración es del mismo orden que la de la leche. Si se añade una nueva cantidad de quimosina a la mezcla en reacción, no hay formación de nitrógeno no proteico. En presencia de calcio y a una temperatura favorable, la coagulación sobreviene al cabo de un tiempo cuya duración corresponde aproximadamente al término de la reacción, mientras que el NPN-12% no aumenta o lo hace muy poco. Debe señalarse que el conjunto de sustancias nitrogenadas liberadas en el curso de la reacción primaria no es soluble en 12% de TCA; pero este contenido separado del reactivo desproteinizante permite distinguir las dos reacciones. Las dos reacciones aparecen en la curva de proteólisis con el 2% de TCA. La segunda parte es una recta cuya pendiente es proporcional a la concentración de la enzima; refleja el curso de la reacción de proteólisis general que prosigue tras la coagulación y que interviene en el curso de la maduración. Esta reacción se produce todavía a pH 2,0; mientras que la reacción primaria es inhibida ; de esta manera se pueden disociar las dos reacciones.

Con la leche como substrato se obtienen las mismas curvas que con la caseína entera, excepto para el NPN natural de la leche. La determinación del nitrógeno soluble a pH 4,6 lleva a resultados comparables a los obtenidos con el 2% de TCA.

Figura I



Liberación de nitrógeno no proteico (NNP) durante la acción de la quimosina cristalizada (1.0.4-2:1.6-3ug/ml) sobre la caseína entera de vaca (3%), a 25° y con pH 6.7 (Según C. Alais y otros, 1953)

II.C.4.c. Reacción de las otras proteasas coagulantes

La pepsina da una curva de proteólisis semejante a la de la quimosina. Con las otras proteasas, la reacción primaria apenas es visible, porque la reacción general es más intensa; es el caso de la tripsina, como se muestra en la Figura 2. Las curvas de la Figura 2 ponen en evidencia que, con excepción del cuajo y la pepsina, las proteasas liberan de forma continua NPN soluble en el 12% de TCA.

II.C4.d. Mecanismo de la reacción

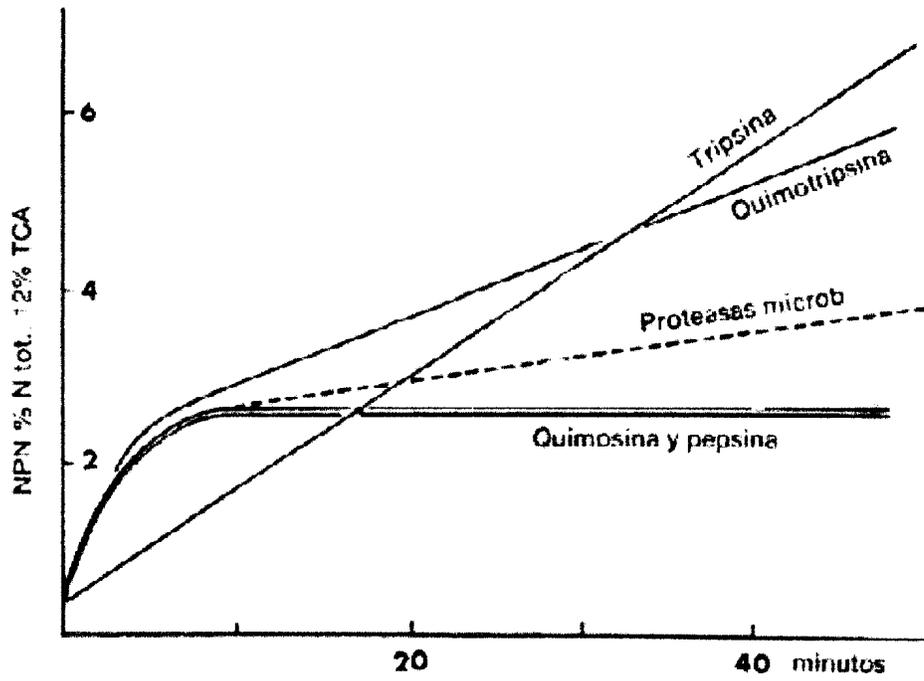
-El sustrato-

Si se hace reaccionar la quimosina sobre los tres principales componentes de la caseína completa de vaca, se comprueba que sólo la caseína kappa da lugar a la formación de sustancias nitrogenadas proteicas solubles en el 12% de ácido tricloroacético. Las caseínas alfa s y beta no experimentan la reacción primaria.

La caseína kappa da unas cinco veces más NPN que la caseína completa de que procede, alrededor del 8 al 10%. Por lo tanto, la caseína kappa es el sustrato específico de la enzima en la reacción primaria. Por otra parte, cuando se encuentra pura en solución es precipitada por la quimosina, mientras que no pasa nada con las soluciones de las caseínas alfa s1 y beta.

De esta forma se puede medir la actividad coagulante por turbidimetría, con la solución de caseína kappa como sustrato.

Figura II



Liberación del nitrógeno no proteico, soluble en el 12% de ácido tricloro acético, a partir de la caseína de vaca, por diferentes proteasas. (Las dosis utilizadas dan casi el mismo tiempo de coagulación en la leche).

-Los productos de la reacción-

Constituyen las dos mitades de la molécula de la caseína kappa. Es probable que la quimosina sólo rompa un único enlace Fen-Met, en el curso de la reacción primaria. La denominación de caseinoglicopéptido a la parte soluble pone en evidencia la principal característica de esta sustancia, que es la que contiene todos los glúcidos de la caseína kappa (como término medio: 5% galactosa, 5% de galactosamina y 9% de ácido siálico). Pero existen péptidos privados de glúcidos; estos últimos, menos solubles, son probablemente poco abundantes en el filtrado tricloroacético. El peso molecular del caseinoglicopéptido de vaca es muy elevado para una sustancia tan soluble, alrededor de 7.000. Por otro lado, a pesar de su gran solubilidad en el agua, esta sustancia es retenida en los sacos de diálisis celulósicos, por lo tanto es fácil de purificar a partir de tricloroacético sobrenadante.

En total, el caseinoglicopéptido representa entre el 20 y el 22% de la caseína kappa.

II.C.4.e. El fenómeno de la coagulación

-Las fases de la acción de la quimosina-

Todos los trabajos científicos recientes apoyan la vieja hipótesis de la alteración enzimática realizada por la quimosina sobre un componente de la caseína original, que actuaría como coloide protector frente a los otros componentes. Tras esta alteración perdería sus propiedades protectoras y el conjunto, vuelto inestable en presencia de calcio, precipitaría, se han diferenciado dos fases sucesivas:

a) Fase enzimática, o "reacción primaria", en el curso de la cual la quimosina ataca a la caseína y solubiliza una pequeña parte. El coeficiente de temperatura Q_{10} (aumento de la velocidad de reacción para una elevación de temperatura de 10°C) se acerca a 3; la reacción no exige la presencia de calcio iónico, y a 0°C se produce todavía a notable velocidad.

b) Fase de coagulación o fase "secundaria", que ataca a la mayor parte de las sustancias que proceden de la reacción primaria; posee un coeficiente de temperatura elevado; alrededor de 1,5 por grado, que es

característico de las reacciones de desnaturalización . A temperaturas inferiores a 15°C se vuelve extremadamente lenta (aparentemente la leche ya no se cuaja),y precisa, calcio iónico.

A estas dos fases esenciales de la coagulación es necesario añadir dos más para presentar el conjunto de fenómenos consecutivos a la acción de la quimosina o de otras enzimas coagulantes.

c) Proteólisis general o " reacción terciaria".

d) "sinéresis" del coágulo, es decir, su retracción con expulsión del lactosuero. (Alais,C.1985)

II.D. CALIDAD BACTERIOLOGICA DE LA LECHE

La leche, además de ser un medio nutritivo, es también un medio favorable desde el punto de vista físico para la multiplicación de microorganismos, y al ser un producto de origen animal sujeto a una gran diversidad de métodos de producción se puede contaminar con un amplio espectro de microorganismos. Como es bien sabido una buena calidad de leche desde el punto de vista bacteriológico es esencial para obtener productos de excelente calidad.

La flora bacteriana de la leche puede variar considerablemente en número y especies, dependiendo de cómo se contamina la leche. En la ubre la leche de vaca contiene pocas bacterias pero posteriormente sufre una contaminación procedente del hombre y de su entorno. La contaminación por el hombre depende de los métodos empleados en la producción animal y de las prácticas utilizadas para el ordeño, pero el número y tipo de microorganismos contaminantes también dependen del estado higiénico de los animales.

En los últimos años se ha producido un incremento muy notable de leche refrigerada. Esta es una buena medida para el control de la flora mesófila, cuya actividad metabólica principal es la transformación de la lactosa en ácido láctico con la consiguiente acidificación de la leche. Sin embargo, la refrigeración tiene aspectos negativos, que se agudizan si no se realiza en condiciones muy estrictas de limpieza, higiene, control de temperatura, etc. En dichas condiciones se favorece el desarrollo de la flora psicrótrófa que libera al final de la fase exponencial de crecimiento, proteasas y lipasas que no son destruidas por el tratamiento térmico (Martínez. A. et al 1993)

Aunque la recontaminación de la leche (después de la pasteurización) puede ser uno de los factores que acelera su alteración en los productos terminados, la presencia de psicrótrófos en la leche cruda fría (antes del procesado) puede ser el factor crítico que afecta la calidad de la leche pasteurizada y de los productos lácteos. Speck y Adams, 1976 (citado por

Zall,R.1987) señalan que aún una población de psicrótrofos en leche menor a 10.000 ml⁻¹ puede producir alrededor de 10 unidades o más por ml de proteasas termoestables.

II.D.1. Microbiología de la leche cruda

La microflora inicial de la leche recién ordeñada, refleja directamente la contaminación microbiana durante su obtención. La microflora de la leche cuando abandona el tambo depende de la microflora inicial, de la temperatura a la que la leche se ha enfriado, de la temperatura a la que se ha almacenado y del tiempo transcurrido hasta su recogida.

Según Janzen, J.J., J.R. Bishop, A.P. Bodine, and C.A. Caldwell, 1982, citados por S.R. Tatini et al, la leche fluída presenta problemas de calidad con defectos sensoriales, cuando alcanzan cargas bacterianas psicrótrofas de 1×10⁴ UFC/ml.

Cuando la leche se enfría y mantiene a ≤ 4°C se previene normalmente la multiplicación de las bacterias al menos en las primeras 24 horas y la microflora es, por tanto, similar a la presente originalmente tras el ordeño.

La leche extraída asepticamente de ubres sanas no es estéril, pero solamente contiene un pequeño número de bacterias que van de 100 a 10.000 bacterias por ml. La población media se sitúa alrededor de 1.000 pero los datos son muy variables. Los valores dados por Tolle (1980) (citado por Amiot,J.1991) se presentan en la Tabla IV

Tabla IV
Contaminación de la leche a la salida de la ubre

Contaminación, gérmenes/ml	Frecuencia
Menos de 100	41%
100 a 1.000	35%
1.000 a 10.000	23%
Más de 10.000	1%

Tolle, 1980

El contenido bacteriano de la leche recién ordeñada aumenta significativamente por la mamitis y por la posterior contaminación procedente del ambiente exterior.

Desde el exterior del pezon o de la ubre puede llegar a la leche un gran número de microorganismos. Los trabajos de Chatelin y Richard (1981) (citados por Amiot, J. 1991), demuestran que la leche obtenida en un ordeño cuidadoso, con los pezones previamente lavados, contiene un número considerablemente menor de bacterias mesófilas, psicrótrofas y termorresistentes (Tabla V)

Tabla V
Contaminación microbiana de la leche por la ubre

Origen de las muestras	Número de microorganismos por ml			
	Flora total	Flora psicrótrofa	Flora termorresistente	
			Total	Esporos de Bacillus
Ordeño cuidadoso	5.200	450	135	24
Ordeño ordinario	42.100	12.500	4.900	92

Según Chatelin y Richard, 1981

Joergenssen, 1980 (citado por Amiot, J. 1991) obtuvo los mismos resultados, señalando que el lavado y desinfección de la ubre puede disminuir por un factor de 10 la población microbiana de la leche recién ordeñada.

Los microorganismos contaminantes también pueden llegar a la leche mediante los utensillos y las superficies con las que contacta. De estas fuentes suelen provenir los estreptococos lácticos, los coliformes y las bacterias Gram-negativas. Además, las máquinas ordeñadoras constituyen un excelente lugar para el crecimiento de bacterias termodúricas que luego pueden contaminar la leche.

Al ser la leche almacenada durante más tiempo y a temperaturas más bajas se crean condiciones especiales que permiten el crecimiento de microorganismos tolerantes al frío, o sea de psicrótrofos. Los géneros que se encuentran más frecuentemente dentro de este grupo son: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* y *Achromobacter*. También se pueden encontrar *Streptococcus*, *Bacillus coagulans*, levaduras y mohos.

Diferentes observadores han informado que existen amplias variaciones en la incidencia de microorganismos termodúricos y psicrótrofos en la leche cruda; algunas pueden ser de carácter regional y estacional y otras están asociadas a los métodos de limpieza y desinfección del equipo empleado en los tambos.

Tabla VI
MICROORGANISMOS TERMODURICOS Y PSICROTROFOS DE LA
LECHE CRUDA FRESCA

Géneros termodúricos ^a	Género psicrótrofos ^b
<i>Microbacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Acinetobacter</i>
Esporos de <i>Bacillus</i>	<i>Flavobacterium</i>
Esporos de <i>Clostridium</i>	<i>Aerobacter</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Alcaligenes</i>
	<i>Bacillus</i>
	<i>Arthrobacter</i>

^a Sobreviven a un tratamiento térmico de 63° durante 30 minutos

^b Crecimiento visible a 5-7°C durante 7-10 días

Juffs, 1973 (según Robinson)

II.D.1.a. La microflora termodúrica

Los psicrótrofos termodúricos son un grupo de bacterias capaz de resistir las temperaturas altas similar a aquellas usadas en la pasteurización (72-

74°C durante 15 segundos) y que crecen también a temperaturas de refrigeración (4 a 7 °C)Coghill, D.1982 citado por Suhren,G.1989.

Según la tabla VI, la microflora termodúrica es aquella que sobrevive a la pasteurización efectuada en el laboratorio, *Microbacterium lacticum* y los esporos bacterianos tienen una supervivencia del 100%. Algunas especies del género micrococcus son algo menos termorresistentes y sólo el 1-10% de las cepas de *Alcaligenes tolerans* puede soportar dicho tratamiento. Ciertas especies de estreptococos, de lactobacilos y algunos corineformes son termorresistentes, soportando tratamientos de 60°C durante 20 minutos pero sólo un pequeño porcentaje, probablemente inferior al 1% puede sobrevivir tras un tratamiento de 63°C durante 30 minutos.

Los psicrótrofos termodúricos se caracterizan por largos tiempos de generación y largas fases de retraso. La mayoría de estos microorganismos no se multiplican con facilidad en la leche cruda ni siquiera a temperatura ambiente, por ello, un elevado recuento de termodúricos de una leche de 24 horas indica de una forma bastante veraz que ha existido una fuerte contaminación procedente del equipo de lechería.

II.D.1.b. La microflora psicrótrofa

La incidencia y desarrollo de las bacterias psicrótrofas en la leche cruda son muy variables y dependen del tipo, número y estado fisiológico de los microorganismos, las condiciones de producción de leche, y el contacto con las superficies, dependiendo además de la temperatura y duración del almacenamiento refrigerado antes del procesamiento.

En leche producida bajo condiciones sanitarias aparecen las bacterias típicas de la ubre, principalmente Micrococcaceae, y menos del 10% del conteo total son psicrótrofos. Con conteos altos, la flora del equipo de ordeño se vuelve una fuente más importante de la flora de la leche. Bajo tales condiciones antihigiénicas la leche puede contener más del 75% de psicrótrofos (Thomas,S.B. and Thomas, B.F. 1973; Kurzweil R. And Busse, M. 1973) citados por Suhren,G.1989.

Aunque las bacterias psicrótrofas Gram-negativas constituyen una parte menor de la microflora de la leche inmediatamente después del ordeño, el número rápidamente se incrementa debido a su habilidad de crecer a las temperaturas de refrigeración encontradas en los tanques de refrigeración de leche a granel (3-5°C), pasando a ser la flora dominante en la leche que llega a planta de proceso; a estas alturas, incluso las leches crudas de buena calidad pueden tener cuentas de psicrotrofos en un rango de 1×10^3 a 1×10^4 UFC/ml (Messer, Behney, and Leudecke, 1985., Zall, Chen and Murphy, 1982., citados por Tatini et al, 1991).

Los psicrótrofos que con mayor frecuencia se encuentran en la leche cruda son los bacilos Gram-negativos. *Pseudomonas spp.* constituye el 50% de los géneros de bacterias Gram-negativas y la especie *Ps. fluorescens* es la que predomina aunque también se detectan *Ps. putida*, *Ps. fragi* y *Ps. aeruginosa*. Los géneros *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Achromobacter* y *Alcaligenes* junto a coliformes comprenden la mayoría del 50% restante de bacterias Gram-negativas Juffs, 1973, (citado por Christina, M. Cousins, B and Bramley, A. 1989).

En las muestras de leche a granel el número de las formas esporuladas generalmente fue menor a 1 ml^{-1} . Durante el transporte y almacenamiento durante el verano no hubo aumento de bacterias psicrótrofas de formas esporuladas. Las especies encontradas incluyen *Bacillus coagulans*, *B. circulans*, *B. cereus*, y *B. subtilis* (McKinnon, C.H. and Pettipher, G. L., 1983, Mikolajcik, E.M., 1979 citados por Suhren, G. 1989).

Los psicrótrofos que, crecen en leche refrigerada, elaboran lipasas y proteasas exocelulares termorresistentes, siendo sus actividades muy variables, incluso entre cepas de una misma especie. Las cepas de *Ps. fluorescens* son las que con más frecuencia presentan ambas actividades: lipolítica y caseinolítica. Los psicrótrofos Gram-negativos se destruyen durante la pasteurización pero sus enzimas no se desactivan.

Durante el almacenamiento de la leche cruda en los tanques de refrigeración durante 48 horas, no se detecta la aparición de glicomacropéptidos. Si el período de almacenamiento de la leche cruda se prolonga cuatro días más a 7°C, la proteólisis comienza a ser detectada en forma de glicomacropéptidos y supera el recuento de microorganismos psicrótrofos los 10⁶ UFC/ml en concordancia con los datos de Cousin, Marth, 1977., Grieve, Kitchen, 1985., citados por A. Martínez Penagos et al.

II.D.1.c. Microorganismos coliformes

Los coliformes crecen rápidamente en residuos de leche y en el equipo de ordeño húmedos, constituyendo las principales fuentes de contaminación de la leche. Sin embargo, un recuento relativamente bajo de coliformes no indica necesariamente una eficaz limpieza y desinfección del equipo. Algunos autores consideran que las condiciones higiénicas durante la producción de leche han sido poco satisfactorias cuando la tasa de coliformes excede, de forma regular, a 100/ ml.

Algunas de las especies incluidas en los géneros que constituyen el grupo coliforme son bacterias psicrótrofas, las cuales representan entre el 10 y el 30% de la microflora aislada a 5-7°C a partir de la leche cruda. La mayoría de estos coliformes pertenecen al género *Aerobacter*.

II.D.2. Microbiología de la leche pasteurizada

Generalmente en nuestro mercado la leche pasteurizada llega al consumidor en un breve período de tiempo medio de 3 días, por lo que en este producto la pérdida de calidad debido a la presencia de psicrótrofos no es un problema.

Niveles de cambios detectables organolépticamente, normalmente implican poblaciones bacterianas superiores a 10^6 ml⁻¹ y frecuentemente de 10^7 /ml.

Se considera que la producción de proteasas exocelulares no tiene lugar hasta alcanzarse un mínimo de 10^6 UFC/ml (Cousins, Marth 1977, Grieve, Kitchen, 1985).

La alteración de la leche pasteurizada se puede deber a enzimas termoestables exocelulares o a la contaminación post pasteurización, por el crecimiento de microorganismos que han sobrevivido al tratamiento térmico. Generalmente, si la flora alterante está dominada, por bacilos Gram-negativos es casi seguro que ha ocurrido una contaminación después de la pasteurización. La presencia de microorganismos Gram-positivos sugiere que la alteración se debe a bacterias formadoras de esporas que han soportado el tratamiento térmico.

II.D.3. Microbiología en queso

El fabricante de queso, intenta conseguir un doble objetivo: producir un queso de alta calidad y obtener un gran rendimiento a partir de una determinada cantidad de leche. Los principales factores que determinan el rendimiento del queso son el contenido de caseína y de grasa, además de la fabricación .

En los países donde la mayor parte de la leche se emplea en la elaboración de queso, las enzimas microbianas ocasionan graves problemas, porque no solo interfieren los delicados aromas del queso sino que producen pérdidas económicas al disminuir el rendimiento del producto.

Se ha demostrado que una carga bacteriana muy alta puede, a través de enzimas exocelulares proteolíticos, ocasionar una degradación significativa de caseínas y reducir el rendimiento del queso. Sin embargo, la leche

comercial raramente alcanza el grado de contaminación necesario para que aquello ocurra.

Algunos investigadores piensan que un recuento elevado de bacterias psicrótrofas en la leche destinada a quesería, puede dar como resultado una hidrólisis tal de la caseína que ocasione problemas en la fabricación. Si se elabora queso con esta leche las partículas de caseína están tan modificadas que dificultan la fabricación del queso y se sospecha que las micelas de caseína están alteradas al extremo de que no es posible obtener un coágulo firme.

Los efectos más importantes de los factores higiénicos son aquellos relacionados con los sabores anómalos que se desarrollan en el queso durante la maduración. Las enzimas exocelulares elaborados por las bacterias psicrótrofas tienen la capacidad de permanecer activos después del tratamiento térmico y originan degradaciones no deseables durante el almacenamiento. Por ejemplo la leche con una carga de psicrótrofos superior a 10^6 microorganismos por ml puede producir la cantidad de lipasas suficiente para causar un enranciamiento detectable durante el proceso madurativo. Altos niveles de bacterias psicrótrofas ($>1 \times 10^6$ UFC/ml) han sido asociados con pérdida de rendimiento y malos sabores en queso Cheddar maduro, Banks, J.M. et al, 1986., Banks, J.M. et al, 1988., Hicks et al, 1982., Hicks et al, 1986., Law et al 1976., citados por S.R. Tatini et al. Por consiguiente, el fabricante de queso necesita conocer la cuenta bacteriana inicial de psicrótrofos en leche cruda entrante para determinar el período máximo de almacenamiento refrigerado no perjudicial para el rendimiento y calidad del queso.

Algunos trabajos publicados por ciertos investigadores indican que cuando el queso Cottage se fabrica con leche contaminada por psicrótrofos, el rendimiento disminuye en un 0,5% aún cuando no se produzcan accidentes en la fabricación.

II.D.4. Microbiología en leche UHT

El tratamiento a temperatura muy alta (UHT) se ha diseñado para conferir al producto una vida útil de varios meses. El objetivo del proceso UHT es obtener un producto que, en términos comerciales, puede considerarse como bacteriológicamente estéril, que mantiene además las características deseables de la leche fresca, es decir, su valor nutritivo, color, y propiedades organolépticas.

Durante el almacenamiento se detectan cambios en las propiedades organolépticas y nutritivas, observándose además modificaciones de la viscosidad que conducen, a veces, a gelificaciones. Según Mottar et al; 1989, la vida útil de la leche UHT está limitada por la acción de proteinasas termorresistentes durante el almacenamiento. Muchos investigadores creen que algunas de las alteraciones se deben a actividades enzimáticas residuales. Existen enzimas exocelulares, particularmente lipasas y proteasas, producidos por bacterias psicrótrofas que habitualmente se encuentran en la leche y son extremadamente resistentes a la desnaturalización por el calor. En algunos casos, estos enzimas pueden mantener más del 50% de su actividad después del tratamiento UHT, a pesar de que los microorganismos que las elaboraron hayan sido destruidos. Por ello, aunque el tratamiento UHT rinda un producto estéril a partir de una leche cruda con una gran carga bacteriana, la vida útil del producto puede estar condicionada a la calidad higiénica del producto original. Se ha demostrado, por ejemplo, que la leche cruda que contiene una cepa de *Pseudomonas fluorescens* a un nivel de 5×10^7 UFC/ml se gelifica transcurridos 10 a 14 días después del tratamiento UHT. Si el recuento es de 3×10^6 UFC/ml la gelificación no ocurre hasta los 56 días después del tratamiento UHT (Bank, W. Dalgleish, D.G. and Rook, A.F. 1987).

Defectos organolépticos como amargor, rancidez y gelificación se creen que son causados entre otros por enzimas de bacterias psicrótrofas. En un ensayo realizado por Collins, Bester y McGill lotes de leche desnatada UHT fueron guardados a 20, 30 y 40°C durante aproximadamente cuatro meses a los efectos de evaluar la calidad sensorial teniéndose como referencia

muestras guardadas a 3°C a los efectos de preservar su calidad. Durante el período de almacenamiento a 20°C las muestras presentaron una calidad aceptable, pero a 30°C y 40°C las muestras se alteraron. Asimismo notaron que las muestras guardadas a 40°C eran menos aceptables que las guardadas a 30°C. La vida media de la leche UHT mantenida a 30°C se limitó a tres meses. A 40°C las muestras de leche tuvieron una vida media de un mes. Además se determinó que la razón principal para la no aceptabilidad de las muestras fue el amargor excesivo. A su vez el amargor pareció estar relacionado con la gran magnitud de proteólisis existente a los 30°C. Los niveles de bacterias de psicrótrofos en lotes diferentes de leche no tenían un efecto significativo en el amargor. En ensayos realizados por McKellar et al., 1981 (citado por Mottar, 1989), también se encontró un alto grado de proteólisis y sabor amargo en leches UHT debido a las proteinasas de microorganismos psicrótrofos. También Driessen 1983 (citado por Mottar, 1989) determinó que hubo un cambio en el gusto de la leche y en la consistencia, tornándose amarga y gelificándose luego de siete semanas a 20°C cuando fueron incubadas con enzimas proteolíticas de *P. fluorescens* 22F, en una cantidad producida por 5×10^5 ufc/ml.

En el ensayo realizado por Collins, Bester y McGill (1991) encontraron que la consistencia de la leche no se incrementaba significativamente durante el almacenamiento a las diferentes temperaturas, notando si una sedimentación, que fue considerada como un factor importante en la vida media de las muestras de leche UHT desnatadas. Estas conclusiones se contraponen con varios informes que indican que la gelificación es el defecto más serio que limita la vida media de la leche UHT. Según Hostettler (citado por Collins et al 1991) la formación de sedimento se relaciona con la formación de un complejo grasa-proteína y la formación de este complejo es acompañada por un incremento en viscosidad, reduciéndose la estabilidad de la leche al calor. Manj, et al (citado por Collins et al 1991) no encontraron tampoco ninguna relación entre la magnitud de proteólisis y el tiempo de gelificación, mientras que Gaafur y Haque (citados por Collins et al 1991) atribuyeron la gelificación a interacciones proteína-proteína causada por el tratamiento de UHT. Kocak y Zadow (citados por Collins et al 1991) observaron gelificación después de 100 días de almacenamiento a 30°C y después de 120 días a 25°C, pero no

ocurrió gelificación después de 300 días de almacenamiento a 40 y 50°C. Manji et al, y Gaafur y Haque (citados por Collins et al 1991) encontraron gelificación en muestras almacenadas por 11 meses a 2°C y 30°C o por 84 a 98 días a 22 o 25°C. Sin embargo ninguna gelificación ocurrió en muestras guardadas por 98 días a 11 meses a 4°C, para 98 días a los 37°C, o durante 11 meses a los 40°C. Suhren (citado por Collins et al 1991) sugirió la implicancia de las proteinasas termorresistentes en la gelificación de la leche UHT. Mottar, 1989 investigó la influencia del tiempo de almacenamiento de la leche cruda en la vida de la leche UHT, encontrando que para que la vida útil de la leche UHT fuese por lo menos 3 meses a 20°C, el máximo tiempo de almacenamiento de la leche cruda con conteos menores a 10^5 ufc/ml y a 4-6°C era de 72 horas. En cambio si la leche tenía una carga bacteriana mayor, el máximo almacenamiento que admitía para llegar a tener 3 meses de vida útil eran 48 horas, pues períodos más prolongados serían propicios para una mayor producción de proteinasas que limitarían la vida útil de la leche UHT.

Collins et al (1991) detectaron un incremento en la magnitud de la proteólisis a medida que avanzaba el tiempo de almacenamiento de las muestras de leche UHT descremadas. A su vez, la magnitud de proteólisis a los 30° C era significativamente superior que a los 40°C, y a los 40°C la proteólisis era significativamente superior que a 20°C. Los altos niveles de proteólisis encontrados en las muestras almacenadas a 30°C confirman los resultados obtenidos por Adams et al., y Kocak y Sadow (citados por Collins et al 1991) quienes también encontraron máxima proteólisis a 30°C, contraponiéndose dichos resultados con los encontrados por Suhren (citado por Collins et al 1991) según quien, la actividad óptima de la mayoría de las proteinasas termorresistentes se encuentra en un rango entre 37 y 45°C y cerca de pH neutro.

En un ensayo realizado por Picard et al 1996, en el cual se indujo la gelificación inoculando *Ps.fluorescens* a leche pasteurizada que luego fue tratada UHT, se encontró que la leche fue desestabilizada después de 2 días de almacenamiento a 37°C, y exhibió una proteólisis de la kappa caseína cercana a un 25% . La leche UHT almacenada a 20°C fue desestabilizada

después de 14 días y contenía cerca de 250 µg CMP/ml, valor similar al encontrado en la leche desestabilizada a los dos días.

Según Zalazar et al., La determinación de los ácidos libres parece ser un método útil para supervisar la calidad de leche UHT durante el almacenamiento. Según estos autores el contenido de ácido siálico en muestras de leche UHT fue 50%-215% mayor que el ácido siálico en muestras de leche fresca pasteurizada. A su vez el contenido de ácido de las muestras guardadas hasta 17 meses después de la expiración era aproximadamente 3 veces superior que las muestras de UHT fresca equivalente. El análisis electroforético a pH 4,6 de la caseína insoluble de leche mostró evidencia de proteólisis de la kappa caseína en los componentes para-kappa-caseína y glicomacropéptido, apareciendo como consecuencia la gelificación. En un estudio realizado por Martinez Penagos et al; 1993; en el cual se tomaron 32 muestras de leche UHT que fueron analizadas cada 15 días hasta el final de su vida comercial, detectándose un incremento significativo de los niveles de glicomacropéptidos a lo largo del almacenamiento. Al final de la vida comercial (tres meses) el contenido teórico medio en suero sería de 13,4% con un mínimo de 4,1% y un máximo de 27,9%. En todos los casos estudiados por estos autores el incremento de los niveles de glicomacropéptidos en función del tiempo de almacenamiento es lineal, con coeficientes de correlación oscilando entre 0,910 y 0,999. A su vez encontraron actividades proteásicas muy diferentes entre las distintas muestras. Las leches UHT analizadas sufrieron proteólisis importantes a lo largo de su vida comercial, medida en términos de crecimiento continuo de glicomacropéptidos.

II.E. CONTAMINACION MICROBIANA DE LA LECHE EN SU PRODUCCION

Controlar la calidad de las materias primas implica disminuir la presencia y el desarrollo de microorganismos (Luquet, F.M.1991). Las bacterias

psicrotróficas son obicuas y por consiguiente el agua, tierra, plantas, y animales son las fuentes naturales de estos microorganismos. El contacto de la leche con estas fuentes pueden llevar a una contaminación con psicrotrosis; Ingraham y Stokes, Witter, Stokes y Redmond, Thomas y Thomas, (citados por Suhren, G. 1989).

El aire del establo está poco contaminado, lo mismo que el interior de la mama; por el contrario, el exterior de la mama y la instalación de ordeño pueden ser factores contaminantes no despreciables (Luquet, F.M.1991).

En un estudio realizado por Carballo et al 1999, bajo las condiciones predominantes de nuestras explotaciones lecheras quedo demostrado que la principal fuente de contaminación de psicrotrosis en la leche del tambo son el tanque de frío y el equipo de ordeño representando el 49.9% y el 33.8% en invierno y verano respectivamente, mientras que la leche obtenida del ordeño manual y el agua del tambo son fuentes de menor importancia, Tabla VII.

Tabla VII

Porcentaje de grupos bacterianos en diferentes puntos del proceso de obtención de la leche en dos épocas del año.

Fuente	Psicrotrosis	Staphylococcus	Enterobacterias
Leche directa de la ubre			
Invierno	5.3	73.2	21.5
Verano	2.0	59.8	38.2
Leche recibida en tanque			
Invierno	21.5	54.8	23.7
Verano	18.0	42.3	39.6
Agua general			
Invierno	1.3	29.9	68.8
Verano	0.9	25.6	73.5
Hisopado de tanque			
Invierno	44.9	34	21.1
Verano	33.8	9.7	56.4

Tesis A.V.Carballo, M.Ilundain, J.L.Inciarte, J.M.Lataste, 1999

II.E.1. Contaminación debida a las mamas

En el espacio de tiempo existente entre los ordeños, los pezones de las vacas se ensucian con estiercol, lodo y restos del material de las camas, tales como paja, aserrín, viruta o arena. Si no se elimina antes del ordeño todo este material pasará, junto a la gran cantidad de microorganismos que contiene, a la leche.

Aunque teóricamente la leche al salir del pezón debería ser estéril, siempre contiene de 100 a 10.000 bacterias por mililitro. La población media se sitúa alrededor de 1.000 pero los datos son muy variables. Los valores dados por Tolle, 1980 (citado por Amiot, J. 1991), se presentan en la Tabla VIII.

Tabla VIII
Contaminación de la leche a la salida de la ubre

Contaminación, gérmenes/ml	Frecuencia
Menos de 100	41%
100 – 1.000	35%
1.000 – 10.000	23%
Más de 10.000	1%

Tolle, 1980

La microflora del conducto galactóforo se parece a la de la superficie de la ubre y la composición se influencia indudablemente por la flora de la superficie de la ubre y por el ambiente. La mayoría de las leches de los cuartos individuales de la ubre están libres de bacterias gram-negativas. Esto sugiere que los organismos gram-negativos en leche cruda pueden considerarse que son contaminantes, en lugar de parte de flora normal de la ubre.

Cuando las vacas son ordeñadas a máquina, la microflora de las tetas influye más en la contaminación de la leche de lo que lo hace el resto de la

superficie de la ubre. La flora contiene psicrótrofos así como termófilos. La contaminación de las tetas es a menudo alta. En un experimento realizado por Cousins y Bremley (citado por Christina, M. Cousins, B. and Bramley, A. 1989) se determinó que la carga bacteriana sobre los pezones es mayor en animales estabulados que en animales pastando Tabla VIII.

Tabla IX

Efecto del lavado con manguera y secado de los pezones en la carga bacteriana de torundas aplicadas a los ápices de los pezones de vacas que están pastando o que usan de cama arena.

Condiciones rebaño	Pezones		Media geométrica ^a (UFC por ápice de pezón)			
			Total	Psicrótrofos	Coliformes	Esporos
Cama de arena	A	Sin lavar	$8,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	10	$5,0 \times 10^4$
		Lavados	$7,3 \times 10^{5*}$	$8,3 \times 10^4$	12	$1,2 \times 10^4$
	B	Sin lavar	$3,3 \times 10^7$	$1,3 \times 10^6$	15	$1,0 \times 10^5$
		Lavados	$8,5 \times 10^{6*}$	$4,0 \times 10^5$	11	$4,8 \times 10^4$
Pastando	A	Sin lavar	$7,5 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	1	$1,3 \times 10^2$
		Lavados	$3,1 \times 10^4$	$2,5 \times 10^3$	9	$1,1 \times 10^2$
	B	Sin lavar	$1,2 \times 10^5$	$4,3 \times 10^3$	14	$4,9 \times 10^2$
		Lavados	$1,4 \times 10^5$	$3,3 \times 10^3$	11	$5,8 \times 10^2$

^a Media de seis muestras

* $P < 0,05$

El exterior de la mama, aunque mucho menos contaminado que el material (sobre todo si está sucio) puede aportar a la leche gérmenes y esporas. La bosta que recubre la mama es un agente de aportes 'butíridos', de ahí el interés de eliminar sistemáticamente los primeros chorros de leche. La mayor parte de estos microorganismos corresponden frecuentemente a una flora de tránsito, sin consecuencias para las transformaciones o para la conservación de la leche a baja temperatura. Sin embargo, esta contaminación es la principal y prácticamente la única fuente de esporas aerobias (*Bacillus*) y anaerobias (*Clostridium*).

Desde el exterior del pezón o de la ubre puede llegar a la leche un gran número de microorganismos. Los trabajos de Chatelin y Richard, 1981 (citados por Amiot, J 1991), demuestran que la leche obtenida en un ordeño cuidadoso, con los pezones previamente lavados, contiene un número considerablemente menor de bacterias mesófilas, psicrótrofas y termorresistentes, Tabla X.

Tabla X

Contaminación microbiana de la leche por la ubre

Origen de las Muestras	Número de microorganismos por mililitro			
	Flora total	Flora psicrótrofa	Flora termorresistente	
			Total	Esporos de bacillus
Ordeño cuidadoso	5.200	450	135	24
Ordeño ordinario	42.100	12.500	4.900	92

Chatelin y Richard, 1981.

Joergenssen, 1980 (citado por Amiot, J. 1991), obtuvo los mismos resultados, señalando que el lavado y desinfección de la ubre puede disminuir por un factor de 10 la población microbiana de la leche recién ordeñada.

Chatelin y Richard (citados por Suhren, G. 1989) registraron una cuenta de psicrótrofos media XG de $3,7 \times 10^2$ UFC/ml en la leche de vacas con las ubres lavadas cuidadosamente, comparadas con $6,7 \times 10^3$ UFC/ml en la leche de vaca con ubres mal lavadas. A veces también ocurre que el cepillo, que debería asegurar la limpieza de las mamas, contribuye de hecho a mancharlas. En este caso se observa el aumento del número de organismos termorresistentes.

En una experiencia realizada en el National Institute for Research in Dairying se estudió la influencia de la estabulación y del lavado de los pezones en el recuento bacteriano de la leche mezcla procedente de una manada muestreada una vez a la semana, (TablaXI). Los resultados mostraron que cuando las vacas eran estabuladas el número de bacterias o de UFC se incrementaba, además de dicho estudio surgió que la tasa bacteriana era mayor si se omitía el lavado de los pezones. También de dicho estudio se deduce que en animales en pastoreo el lavado de los pesones no tiene tanto efecto sobre la carga microbiana como lo tiene en animales con cama.

TablaXI

Condiciones	Pezones	Medida geométrica (UFC/ml de leche)				
		Total	Psicrótrofos	Coliformes	Termodúricos	Esporos de bacillus
Cama de arena	Sin lavar	31.700	1500	43	120	18
	Lavados	15.500	990	61	110	14
Pastando	Sin lavar	4.250	280	19	990	7
	Lavados	3.530	270	26	750	5

En resumen, la mama de la vaca es una fuente de contaminación a tener en cuenta, por lo que es necesario utilizar material limpio y aséptico para su correcta limpieza (Luquet,F.M. 1991).

II.E.2. Contaminación debida al agua

Muchas granjas obtienen el suministro de agua de los pozos, o de ríos. Algunos de estos pueden contaminarse con organismos de origen fecal y una gran variedad de microorganismos saprofíticos derivados de la tierra o de la vegetación incluso *Pseudomonas* y otras gram-negativas. Los números de estos contaminantes variarán ampliamente.

Las aguas pueden contaminarse por los tanques del almacenamiento o con las mangas. Existe contaminación de la leche desde el subsuelo, ya sea por transmisión directa o mediante transmisión indirecta.

En 1947 Thomas (citado por Suhren, G. 1989) encontró que de 126 aguas de granja el 70% tenían las cuentas de psicrótrofos mayores a 10^2 ufc/ml mientras que el 14% tenían conteos mayores a 10^4 UFC/ml. La microflora psicrótrofo fue dominada por *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, y *Flavobacterium*. En un estudio realizado por Morse et al, 1968 (citado por Suhren, G. 1989) en tres localidades canadienses se encontró que el conteo medio de las muestras de agua analizadas eran 10, 300, y 560 ufc/ml. Todos estos datos muestran la gran variabilidad existente entre las diferentes aguas y por consiguiente el diferente grado de incidencia en la contaminación de la leche. El uso de agua contaminada en el enjuague del equipo de lechería de granja puede contribuir a la contaminación de psicrótrofos (Suhren, G. 1989).

Trabajos clásicos indican que el 40% de las bacterias psicrotrofas de la leche coincidían con la flora predominantemente en el agua de los tambos respectivos (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*) (Resbani, 1997 Seminario Regional de Calidad de Leche).

II.E.3. Contaminación debida a la tierra

De acuerdo a un estudio realizado por Thomas, Druce, y Davies, 1966 (citado por Suhren, G. 1989) el conteo de colonias de psicrótrofos en tierra seca abarcó un rango de 3 a 200×10^6 g⁻¹. Los tipos Coryneformes, a menudo pareciendose *Arthrobacter*, constituyeron el 60% de los psicrótrofos aislados; el resto estuvo constituido por *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, y *Flavobacterium*. Thomas y Druce 1972., (citados por Suhren, G. 1989), encontraron que *Citrobacter sp*, y *Klebsiella sp*. eran las especies coliformes dominantes en diferentes muestras de suelo.

II.E.4. Contaminación debida al aire

El aire no es una fuente importante de microorganismos en la leche de la granja. Según Benham y Edgell, (1970), Underwood et al.,(1974) citado por Christina, M. Cousins, B. and Bramley, A. 1987 el número de bacterias procedentes del aire es habitualmente inferior a 5 UFC/ml en leche y el de esporos de *Bacillus* no llega a 1UFC/ml.

Las fuentes principales de microorganismos aerotransportados en las lecherías son la actividad del obrero, los ventiladores, desagües y el polvo Thomas y Druce 1971 (citados por Suhren, G. 1989) . Los cálculos basados en los niveles grabados de contaminación aérea y en el volumen de aire que pasa en la máquina ordeñadora indican que las bacterias normalmente aerotransportadas consistirían en menos de 5UFC/ml de leche producida.

Las cuentas bacterianas de aire de cobertizos raramente exceden las 200 UFC/l, constituyendo los gram-negativos una pequeña proporción. El nivel bacteriológico en el aire de establo reportado por varios autores osciló en un rango de 6 a 45 UFC/l siendo cocos gram-positivos el 50 a 70%, bastones gram-positivo 10 a 40%, bastones gram-negativos 2 a 8%, formas esporuladas aeróbicas 7 a 9%, y hongos 4 a 10% Cousins y Bramley 1981, Palmer 1981, Benham y Edgell, Underwood et al 1974, (citados por Suhren, G.1989).

Thomas, Druce, y Davies, 1966., (citados por Suhren, G. 1989) reportaron que muestras de leche estériles expuestas por cinco minutos al aire durante el invierno presentaron una contaminación de 10×10^3 en lecherías limpias, 50×10^3 en establos limpios y $10, 500 \times 10^3$ en salas de ordeño polvorrientas. El polvo colectado del exterior de las tuberías de la ordeñadora en salones de ordeño polvorrientos contuvo número muy grandes de psicrótrofos, flavobacteria, pseudomonas, y enterobacteria.

El aire aporta una mínima contaminación (salvo errores de manejo); pero son bacterias que afectan considerablemente la calidad de la leche.

II.E.5. Contaminación debida a mastitis

La leche de cuartos con infecciones agudas por ejemplo de *Streptococcus agalactiae* pueden contener recuentos de hasta 100.000.000 gérmenes por mililitro. Mastitis subclínicas a estafilococos o estreptococos representan aproximadamente 40.000 gérmenes/ml en leche del cuarto afectado y unos 3.000 en leche total de vaca (Información técnica N° 4, Mayo 1992).

II.E.6. Contaminación de las ordeñadoras

Si la mama ha sido lavada previamente, la principal fuente de contaminación microbiana de la leche se encuentra en la instalación de ordeño, sobre todo cuando no está suficientemente limpia o desinfectada. (Luquet,F.M. 1991).

Existe una variación importante en la microflora de los equipos de ordeño de diferentes granjas, principalmente en aquellos casos en los que una inadecuada limpieza prevalece. Según Druce y thomas 1972, (citados por Suhren,G.1989), la variación de la microflora se relaciona con el tipo de detergente-desinfectante, método de limpieza y temperatura de la solución, del diseño del equipo de ordeño, condición de los componentes de goma y al nivel de contaminación.

Stadhouders., 1975 (citado por Amiot,J.1991), informa que las bacterias procedentes del equipo que no ha sido suficientemente lavado y desinfectado, serían las siguientes :

- a) bacilos Gram-negativos termolábiles, como: *Pseudomonas*,
Achromobacter, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*,
Enterobacteriaceae;
- b) bacterias lácticas termosensibles; *Streptococcus lactis*,
Streptococcus cremoris y *Lactobacilos*;
- c) bacterias termorresistentes;

Según J. Amiot, basándose en un estudio de Frazier y Westhoff, 1978, el contacto con el material utilizado en el ordeño, el paso de la leche a través de las conducciones y su permanencia en el tanque de refrigeración, multiplican por un factor de 2 a 50, según la limpieza de las superficies, el número de bacterias en la leche cruda, Tabla XII.

Tabla XII

Contaminación de la leche en la granja

Origen	Número de bacterias/ml
Salida del pezón	500-1.000
Equipo de ordeño	1.000-10.000
Tanque de refrigeración	5.000-20.000

Frazier y Westhoff, 1978

En la práctica, la contribución de la contaminación del equipo de ordeño a la flora total de la leche no se puede determinar con precisión mediante los recuentos de la leche producida debido a la amplia variación, tanto en número como en tipos, de los microorganismos procedentes de las ubres de las vacas. El método más eficaz de determinar la extensión de la contaminación de la leche derivada de las paredes del equipo es mediante lavados con un líquido esterilizado y la determinación de la tasa bacteriana en el líquido tras el lavado.

La incidencia de los diferentes tipos de bacterias en el enjuague de la máquina ordeñadora varía de acuerdo a la limpieza, a los métodos de desinfección aplicados y a la complejidad de la planta. La temperatura de las soluciones usadas para limpiar y desinfectar influyen en la microflora

En un estudio realizado por Thomas,(1966) (citado por Suhren, G.1989) se determinó que en granjas lecheras con equipos de esterilizado al vapor, la cuenta de psicrótrofos raramente excedió 10^5 (m²)⁻¹. Cuando vapor o agua hirviendo de inmersión fueron usados, menos del 10% de la flora eran bastones gram-negativos, mientras que con una pizca de amonio cuaternario

sanitizante (QAC) los bastones gram negativos predominaron (Thomas y Thomas 1973., citados por Suhren G.1989).

Aunque los métodos de esterilización por vapor son muy eficaces ya no se usan debido a su costo elevado, siendo sustituidos por métodos de circulación de soluciones detergentes-desinfectantes

Los efectos de una temperatura de circulación alta mayor a 82°C se comparó con una temperatura menor de 60°C encontrándose que a temperaturas altas el 50% presentaba un conteo de colonias $\leq 10^3 \text{ (m}^2\text{)}^{-1}$, bajando dicho porcentaje a 20% en el caso de circulación a baja temperatura. El porcentaje correspondiente de coli-aerogenes positivas en las muestras de tratamiento con alta y baja temperatura fueron 6,9 y 48,7% respectivamente (Druce y Thomas,S.B. 1972, citados por Suhren, G.1989).

El conteo de psicrótrofos en el enjuague de las tuberías de las plantas ordeñadoras fueron más altas para limpieza de circulación que para limpieza con agua hirviendo acidificada; 57% del anterior comparado con 37% del último tenía un conteo de psicrótrofos mayor a $10^3 \text{ (m}^2\text{)}$ (MacKenzie, E., 1973 citado por Suhren, G.1989).

Thomas, S. B. Y Thomas, B. F., 1977, citados por Suhren, G.1989 encontraron que en plantas ordeñadoras mal limpiadas la flora predominante era gram-negativa.

Un estudio de bacterias termodúricas y psicrótrofas contenidos en el equipo de ordeño mostró que la incidencia de organismos termodúricos en la tubería de la maquina de ordeño eran ligeramente más baja que el de psicrótrofos (MacKenzie 1973 citado por Suhren, G.1989).

Los artículos de goma de la máquina de ordeñar agregaron 10 a 117 veces el número de contaminantes contribuido por las paredes de metal en granjas en que el suministro de leche se encontró poco satisfactorio bacteriológicamente (Palmer, J., 1981, citado por Suhren, G.1989). En contraste las partes de goma y las partes de metal contribuyeron con similares grados de contaminación cuando las partes de goma estaban en

condiciones mecánicas satisfactoria, y el suministro de leche fue bacteriológicamente sana (Jackson, H. Y Clegg, L. F. L.1965, citados por Suhren, G.1989).

Las bacterias pueden protegerse del calor, de el proceso de esterilización en los poros del caucho.El acero limpio de una calidad aceptable presenta pocos problemas con limpiar y desinfectar; sin embargo, los ácidos como el ácido clorhídrico o bajo pH de soluciones cloradas pueden causar corrosión severa, y superficies corroidas pueden albergar bacterias.

Aún si cada uno de los componentes de la máquina puede desagotarse, puede encontrarse el agua residual luego de la limpieza del ordeño; las bacterias proliferan en esta agua y contribuyen pesadamente a la contaminación de la leche. Lo que es más, ellos están en un estado de activo crecimiento y altos conteos de bastones gram-negativos pueden detectarse (Von Bockelmann, J., 1981, citado por Suhren,G.1989).

La contaminación del equipo de ordeño desde el reservorio de agua por transmisión indirecta se realiza por colonización de superficies por biofilms bacterianos cuya adhesividad es desigual en distintas partes del equipo, y resulta favorecida por la presencia de sales de calcio y magnesio en el suministro del agua que inciden en la mayor resistencia del glycocalix de alginato. Por otra parte, las altas concentraciones de sales de calcio y magnesio también interfieren con el funcionamiento de detergentes y sanitizantes, lo que complementa la mayor resistencia de los biofilms bacterianos a los tratamientos de limpieza y sanitizado. Las bacterias persistentes tienen además la facultad de formar enzimas exocelulares proteolíticas y lipolíticas termoestables, cuya acción a largo plazo hidroliza grasas y proteínas al nivel de compuestos que confieren características sensoriales objetables a la propia leche o los productos con ella elaborados. Resbani (Seminario Regional de Calidad de Leche 1997).

II.E.7. Contaminación del tanque a granel

La contaminación de la superficie total de los tanques a granel en la granja son más bajos que el de la máquina de ordeñar. El contenido de

bacterias termodúricas es muy bajo, menos de 1×10^5 UFC/m², esto es porque la mayoría de las bacterias termodúricas no puede multiplicarse en los ambientes fríos del tanque. La proporción de bastones gram-negativos y psicrótrofos en los tanques es sin embargo mucho más alto que en máquinas de ordeño (Cousins, C. M. y Bramley, A. J., 1981, MacKenzie, E., 1973, citados por Suhren, G. 1989).

En un experimento realizado por Thomas, S. B. y Thomas, B. F., en 1973, citados por Shuren estudiando tanques de leche a granel recientemente instalados, los contenidos de bacterias psicrótrofas del 8% de las muestras de enjuague, fueron mayor a 10^5 (m²)⁻¹, considerando que un tercio de las muestras de enjuague de las tuberías de ordeño de las plantas exedieron esta cuenta.

II.F. CONTAMINACIÓN DE LA LECHE DURANTE LA RECOGIDA

A pesar de que la proporción de leches de buena 'calidad' es satisfactoria, las lecherías constatan que la leche de mezcla que reciben contienen entre 500.000 y 1.000.000 de gérmenes/ml o incluso más (Luquet, F.M 1991)

La calidad bacteriológica de la leche decrece considerablemente desde el momento del almacenaje en el tanque de la granja hasta su utilización final. De un trabajo realizado en Noruega durante los años 1978 a 1981 (citado por Luquet, F.M. 1991) se desprende que un 85-90% de las leches almacenadas en los tanques contenían menos de 100.000 bacterias por mililitro reduciéndose esta proporción al 50-70 % a la llegada a la lechería y a un 30-50 % inmediatamente antes de su utilización en los procesos de transformación.

Tabla XIII

Comparación del contenido de gérmenes de la leche refrigerada, recogida diariamente, según las muestras tomadas en los refrigeradores de la granja y de las cisternas a la llegada a la fábrica

Contenido de gérmenes	Muestreo	Número de muestras de leche	<1.000	1.000 10.000	>10.000 50.000	>50.000 100.000	>100.000
Gérmenes totales sobre YMA 72hs a 30°C	Granja	369	0,0	32,2	44,4	11,7	11,7
	Lechería	73	0,0	2,8	45,2	27,4	24,6
Psicrótro-fos sobre YMA 7d. A 3,5°C	Granja	369	91,7	6,4	1,9	0,0	0,0
	Lechería	60	55,0	30,0	13,3	1,7	0,0
Termorresistentes sobre YMA 4d. a 30°C	Granja	369	83,8	11,5	3,9	0,8	0,0
	Lechería	73	68,5	27,4	4,1	0,0	0,0
Coliformes aerógenos			>1	1.10	>10.100	>100.1000	>1000
Sobre VRB Agar 18-20 hs a 30°C	Granja	369	18,7	47,2	26,0	8,1	0,0
	Lechería	68	2,9	7,4	52,9	33,9	2,9

VRB: Violet Red Bile Agar, 1974

Thomas 1974

YMA: Yeastred Milk Agar

La Tabla XII muestra los resultados de un estudio realizado por Thomas, (1974) citado por Luquet 1991, sobre el crecimiento del contenido de gérmenes en la leche desde su almacenamiento en la granja hasta su llegada a la lechería; se compara la concentración de gérmenes de leches recogidas todos los días y de leche de cisternas en la llegada a la lechería, en el país de Gales. El crecimiento es particularmente apreciable en los recuentos de psicrótrofos y en coliformes, mientras que los termorresistentes no se multiplican, o lo hacen muy lentamente.

En un experimento realizado por Sogaard, H. Y Lund, R.(1981) (citado por Shuren, G.1989) el porcentaje de psicrótrofos en el conteo total fue de 4,1% en granja, 6,2% en camión cisterna y 13,9% en el silo de la lechería, durante la estación invernal, pasando a ser durante el período estival 16,7%, 21,9% y 78,1% respectivamente.

Un grupo de trabajo belga (citado por Luquet,F.M.1991) preocupado por la calidad de la leche cruda llevó a cabo un estudio de gran valor, del que se extrae la conclusión de que existe una clara relación entre el número de gérmenes contenidos en la leche en el momento de su llegada a la lechería y el número medio de gérmenes de las entregas correspondientes al momento de su partida de la granja. El factor multiplicativo medio se puede evaluar en 1,6. La influencia negativa de la recogida a intervalos de 3 días sobre la calidad bacteriológica de la leche es sorprendente, ya que mientras el número medio de gérmenes en las recogidas efectuadas cada dos días era de 235.000 gérmenes/ml, era de 375.000 gérmenes/ml las recogidas cada 3 días. En el momento de la llegada a la lechería, esta diferencia se acentuaba, ya que la leche de recogidas efectuadas cada 2 días contenía por término medio 315.000 gérmenes/ml (factor multiplicativo medio de 1,3) mientras que la leche recogida cada 3 días contenía alrededor de 685.000 gérmenes/ml (factor multiplicativo de 1,8).

Según Flückiger, E., 1981 (citado por Shuren,G.1989), los tanques cisternas insuficientemente limpios son fuentes potenciales de contaminación de psicrótrofos; el tanque cisterna a pesar de presentar la ventaja de tener una superficie de contacto más pequeña por litro de leche, tiene un diseño más complicado

Un examen realizado por Gerlach, R. y Sabolic, M., 1980 (citado por Shuren,G.1989) sobre 69 tanques cisterna reveló que más de 35% de las conexiones testadas, las tapas y sus empaquetaduras de la toma corriente, el ambiente de las entradas, las conexiones de la succión, y los fondos de la cámara eran bacteriológicamente poco satisfactorias después de la limpieza rutinaria y procedimiento sanitizante. En los ensayos de Dommett et al., 1980 (citado por Shuren,G.1989) cada uno de los tanques testados fue usado por dos viajes en el día con un saneamiento aplicado antes de la primera carga y un proceso de enjuague más corto entre las cargas. El examen reveló que este procedimiento era eficaz reduciendo la contaminación a los niveles despreciables.

Cuando la leche llega a la lechería, después de una conservación de más de 48 horas en la granja y de un transporte que eleva siempre su temperatura algunos grados, se está produciendo en ella una intensa multiplicación microbiana. La población de gérmenes psicrótrofos (*Pseudomonas*) que contiene, se dobla cada 6 u 8 horas a 4°C, siendo la tasa de multiplicación tanto más rápida cuanto mayor sea la temperatura de la leche contenida en la cisterna (H. Mahieu., 1991).

II.G. FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO BACTERIANO

Al ser la leche un producto orgánico, está sometido a la degradación por microorganismos si no se evita la multiplicación y acción de los mismos con determinados medios y condiciones. Por ello es importante tener en cuenta que la multiplicación bacteriana depende de la temperatura, cantidad de bacterias y género, tiempo, y presencia de sustancias inhibidoras.

II.G.1. Temperatura

Las bacterias se pueden clasificar según su temperatura óptima de desarrollo en: psicrófilas (por debajo de 20°C), mesófilas (entre 20 y 40°C), termófilas (por encima de los 40°C).

Para señalar las bacterias que pueden desarrollarse a temperatura de refrigeración, por debajo de 7° C, se usa el nombre de psicrótrofas. Una bacteria mesófila psicrótrofa es aquella que tiene temperatura óptima de desarrollo por encima de 20°C, pero puede desarrollarse a menos de 7°C (Información técnica N° 4).

Para la calidad de la leche, el grupo de las bacterias mesófilas psicrótrofas es de gran importancia, aún cuando el tiempo de generación óptimo no esté por debajo de los 7°C, debido a que a esa temperatura hay

una gran actividad enzimática que conduce a la alteración de los componentes.

A bajas temperaturas el tiempo de generación es más largo como se puede apreciar en la tabla XIV, por lo que la refrigeración frena el crecimiento microbiano.

Tabla XIV
Tiempo de generación de bacterias psicrótrofas (hs)

Microorganismo	Medio	3°C	3-5°C	5-7°C	7-9°C	Ref
<i>P.fluorescens</i>	Leche de vaca	31,0	-----	-----	8,7	(1)
	Leche de vaca	19,0	-----	-----	5,0	(1)
<i>P.putida</i>	Leche de vaca	31,0	-----	-----	9,4	(1)
	Leche de vaca	16,0	-----	-----	5,4	(1)
<i>Pseudomonas spp</i>	Leche pasteurizada	8-12	6-7,5	4,5-5	3,5-4	(2)
<i>Serratia liquefaciens</i>	Leche pasteurizada	-----	16,1	13,7	-----	(3)
<i>Enterobacter sp.</i>	Leche pasteurizada	17	7,5	5	3,2	(2)
<i>S.lactis</i>	Leche pasteurizada	-----	-----	-----	9	(2)
<i>B.circulans</i>	Leche pasteurizada	-----	22	18	12	(2)
<i>B.cereus</i>	Leche pasteurizada	-----	-----	-----	7	(2)

Referencias: (1) Brandt, M.J. y Ledford, R.A., 1982.
(2) Langeveld, L.P.M. y Cuperus, F., 1980.
(3) Juven, B.J., Gordin, S., y Laufer, A., 1979.

La refrigeración de la leche frena el crecimiento de los microorganismos, pero favorece el predominio de algunos tipos de bacterias psicrótrofas. En un experimento realizado por Muir et al., 1978 (citado por Amiot, J. 1991) se estudió el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de los gérmenes psicrótrofos en la leche cruda, colocándose las muestras a 4°C, 6°C, y 8°C, notándose un incremento considerable en el crecimiento de los microorganismos a temperaturas más elevadas, y siendo dicha diferencia muy notoria durante las primeras 48 horas de incubación, disminuyendo hacia las 96 horas.

Según otro estudio de varios autores investigaron en leches crudas de buena calidad inicial enfriadas a 4-5 °C inmediatamente después de la

producción pueden ser mantenidas por tres días sin un incremento significativo en el número de bacterias. Estos mismos autores notaron que cuando la refrigeración de la leche no se hizo inmediatamente, hubo un incremento significativo en el número de bacterias bajo las mismas condiciones de almacenamiento. El fenómeno es probablemente debido a una reducción de la fase de retraso por la preincubación por una temperatura más alta., Mikolajcik, E. M., 1979, Stadhouders, J., 1968 1982, Mabbitt, L. A. 1980 (citados por Suhren, G.1989).

Estudios realizados por Thomas et al (1971) (citado por Christina,M.Cousins,B and Bramley,A.1987), indicarían que la recogida alterna no es perjudicial para la calidad bacteriológica de la leche hasta que abandona la granja, siempre que la leche añadida se enfríe rápidamente a $\leq 4^{\circ}\text{C}$, probablemente se produce un ligero incremento de la tasa de psicrótrofos pero es insignificante. Sin embargo, el almacenamiento a $5-7^{\circ}\text{C}$ unido a una gran contaminación por psicrótrofos conduce a un marcado incremento del número total en el momento de la recogida.

Según el doctor Gerard Claude, (Congreso calidad de leche 1997) se observa una proliferación importante de bacterias luego de 24h a 7°C . Por el contrario a temperatura de refrigeración de 4°C las leches pueden tener un tiempo de conservación comprendido entre 72 y 96 horas a condición que se trate de leches poco contaminadas. Para leches con una carga inicial de 40.000 a 50.000 gérmenes/ml conservadas a una temperatura de 4°C , sólo la flora psicrótrofa continuará desarrollándose.

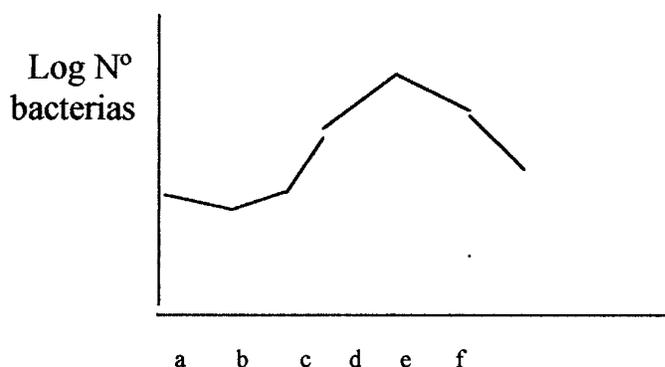
II.G.2. Cantidad de bacterias y género

Según Champagne y Goulet (Amiot,J.1991) la lactosa no puede ser metabolizada por todos los microorganismos, solo los que tienen β -galactosidasa son capaces de hidrolizarla y acceder a los monosacáridos liberados, glucosa y galactosa. Por lo tanto, el desarrollo en la leche de los microorganismos que no poseen esta enzima, está muy limitado. Algunas cepas estreptococos, normalmente llamadas “lentas”, no poseen (o

pierden) la capacidad de sintetizar estas enzimas. De hecho, no son necesariamente más lentas que las otras, pero su desarrollo se detiene prematuramente al agotarse los pocos aminoácidos libres naturalmente presentes en la leche.

La flora de la superficie de los pezones está constituida por un grupo de microorganismos entre los que se encuentran corineformes y bacilos Gram-negativos que según Johns, 1962, 1971, (citado por Christina, M. Cousins, B and Bramley, A. 1987) no se multiplican fácilmente en la leche cruda.

Toda bacteria que utiliza el medio leche como sustrato, debe adaptarse al medio leche siguiendo la curva de adaptación.



Fase	Velocidad de crecimiento
A de adaptación	nula (latencia)
B de aceleración	creciente (activación)
C exponencial	constante (exponencial)
D de declinación retardada)	decreciente (multiplicación)
E de estacionamiento	nula (estacionaria)
F de mortandad	negativa (en declive)

Las bacterias en la leche se reproducen según el siguiente esquema:

Generación:	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
	1	2	3	4	16	32	64	128	256	512	1024

Cuando el número de bacterias del pool de leche del tambo es bajo, un alto porcentaje de las mismas proviene de la piel de los pezones o del medio ambiente y por lo tanto no están adaptadas al medio leche.

Cuando los recuentos bacterianos en leche pool de tambo son elevados (centenares de miles o millones) un alto porcentaje de las mismas están adaptadas al medio leche (Equipos y elementos de ordeño con restos de leche entre un ordeño y otro) entonces, desde el instante mismo del comienzo del ordeño caen a la leche (con todas sus enzimas ya elaboradas en el equipo de ordeño) e inmediatamente sigue la reproducción porque están en la fase exponencial de la curva de crecimiento. La bibliografía demuestra que con equipos y elementos de ordeño bien higienizados, fácilmente se obtiene leche con recuentos inferiores a 100.000 bacterias/ml. Considerando las fuentes de contaminación, podemos inferir que por encima de las 100.000 bacterias/ml en leche pool de tambo hay un alto porcentaje de bacterias adaptadas a leche (proviene de los equipos y elementos de ordeño) (Información técnica N°4).

En estudios realizados por Sogaard, H. Y Lund, R., (1981) se determinó que el conteo final de organismos psicrótrofos en la leche a granel en las lecherías eran de $5,8 \times 10^3$ y $9,6 \times 10^4$ psicrótrofos/ml durante el invierno y verano respectivamente, debido a una contaminación de psicrótrofos más alta en verano. Estos resultados confirman que una contaminación inicial alta resulta en una rápida multiplicación porque la gran proporción de bacterias están activando el crecimiento.

Cerca de la mitad de las Enterobacteriaceae aisladas de la leche cruda colectada de los camiones a la entrada de la planta fueron psicrótrofos y estos consistieron en *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella ozaenae*, y *S. Liquefaciens.*, Chung, B. W. y Cannon, R. Y., 1971 (citado por Suhren, G. 1989).

En el experimento realizado por Ewings, K. N., O' Connor, R. E., y Mitchell, G. E., 1984 (citado por Suhren, G. 1989) muestras de leche cruda fueron refrigeradas en tanque durante 3 días. Aquellas muestras que dieron

conteos menores a 10^5 UFC proteolíticos por mililitro tuvieron una alta proporción de organismos gram-negativos como Pseudomonas, Enterobacteriaceae, Aeromonas, Flevobacterium, Chromobacterium y Alcaligenes, en cambio cuando las cargas fueron superiores a 10^5 UFC por mililitro predominaba P. fluorescens.

II.G.3. Tiempo

Las bacterias necesitan para su multiplicación, una vez adaptadas, desde 10 minutos hasta 24 horas, es lo que se denomina 'tiempo de generación'. La fase de adaptación es por lo general de una a dos horas.

Robinson cita un experimento en el que muestras procedentes de tanques de leche de mezcla localizados en las granjas que contenían leche de dos ordeños que se tomaron después de la adición de la leche del segundo ordeño se mantuvieron a 5°C y se determinó el recuento total diariamente; los resultados mostraron un amplio rango en los recuentos. En algunos casos se observó sólo unos ligeros cambios después de 4 días y en otros se obtuvo un recuento de 3 a 8 veces mayor después de dos días. Como cabía esperar, en las 4 muestras en las que la multiplicación bacteriana fue más rápida, el recuento de psicrótrofos y el total fue similar después de 3 días Tabla XV.

Tabla XV

Granja	UFC/ml de leche después de un almacenamiento durante			
	0 días	2 días	3 días	4 días
A	5.800	3.300	7.900	14.000
B	14.000	10.000	11.000	70.000
C	14.000	10.000	710.000	15.000.000
D	28.000	83.000	2.800.000	18.000.000
E	62.000	400.000	9.500.000	41.000.000
F	170.000	110.000	110.000	130.000
G	240.000	1.800.000	8.900.000	17.000.000

En un experimento realizado por Celestino 1996, en el cual se estudió los efectos del almacenamiento de la leche cruda a 4°C durante 48 hs se constató que hubo un incremento de las bacterias lipolíticas y proteolíticas. Pasando el porcentaje de psicrótrofos en placas de un 47% inicial a un 80% a las 48 horas. Por tanto se constató que el nivel bacteriano era mayor luego de un período de almacenamiento.

Dicke, B., Langstrof, H., y Nitzschke, E.,(1985) (citados por Suhren,G.1989) encontraron que la proporción de psicrótrofos en conteo total en placa de leche colectada de camiones cisternas era mayor en la leche colectada de días alternos (76%) que en aquellos que se colectaba todos los días (30%).

La figura 3 muestra los resultados del almacenamiento de muestras de leche recogida diariamente, teniendo una carga inicial de psicrótrofos de 1×10^4 UFC/ml. Incluso a 5°C el recuento excedió a 1×10^6 UFC ml⁻¹ en 3 días (Cousins et al., 1977 citado por Christina,M.Cousins,B and Bramley,A 1987); otros investigadores han observado incrementos mayores en muestras de leche tomadas de los silos de almacenamientos antes del mantenimiento en el laboratorio. En algunas experiencias, el recuento total de leche de mezcla procedente de los silos de la central fue de aproximadamente 1×10^7 UFC/ml después de 1 día de almacenamiento (La Grange, 1979 citado por Christina,M.Cousins,B and Bramley,A.1987) pero la leche de algunos de los tanques de transporte presentó un recuento total mayor a 1×10^6 UFC/ml. Muir et al.,1978 (citado por Chistina,M.Cousins,B and Bramley,A.1987) registraron recuentos entre 10^4 y 5×10^6 UFC/ml en leche procedente de silos en los que se adicionaron algunas partidas que se habían recogido en días alternos y se almacenaron 24 horas en la fábrica. La tasa total de psicrótrofos y coliformes en la leche de las cisternas de transporte al llegar a las centrales es demasiado elevada en comparación con la de la leche procedente de los tanques de frío de las granjas pero no existe apenas diferencias en la tasa de termodúricos (Thomas, 1974;citado por Christina,M.Cousins,B and Bramley,A.1987).

II.G.4. Presencia de sustancias inhibidoras

Las sustancias inhibidoras pueden inhibir totalmente el desarrollo de gérmenes o pueden actuar como 'selectores' permitiendo el desarrollo de determinados géneros (Información técnica N°4).

II.H. MICROORGANISMOS PSICROTROFOS

En 1887 Forster fue el primero en observar el crecimiento bacteriano a 0°C, y desde entonces la terminología usada para microorganismos que son capaces de crecer y multiplicarse a temperatura de refrigeración o a temperatura de congelación ha sido confusa. El término psicrófilo fue introducido por Schmidt-Nielsen en 1902. El término etimológico implica que estos microorganismos son los que aman el frío y tienen una preferencia por crecer a una temperatura baja.

En realidad, la temperatura óptima para el crecimiento de microorganismos estropeadores de leche está en el rango de 25 a 35°C, similar a muchos microorganismos mesófilos. En 1960 Eddy, B. F. (citado por Suhren, G. 1989) recomendó el uso del término 'psicrófilo' únicamente cuando una temperatura baja óptima está implicada, y 'psicrótrofo' para la bacteria capaz de crecer a 5°C o menos, cualquiera sea la temperatura óptima.

En 1976 la Federación Lechera Internacional adoptó la siguiente definición de psicrótrofos. Un psicrótrofo es un microorganismo que puede crecer a 7°C o menos, independiente de su temperatura óptima de crecimiento (el crecimiento en este contexto no solo incluye la multiplicación sino también esos procesos metabólicos que necesariamente preceden a la multiplicación)

II.H.1. Aspectos taxonómicos

Los psicrótrofos no constituyen un grupo de microorganismos específico; bacterias psicrótrofas aisladas que dañan la leche y productos lácteos pertenecen a aproximadamente 15 géneros diferentes. Estos géneros incluyen bacterias gram-negativas y gram-positivas, bastones, cocos o vibrios, formas esporuladas o no esporuladas, aeróbicos y microorganismos anaerobios. Además de las bacterias, varios géneros de mohos y levaduras tienen representantes psicrótrofos que pueden causar los defectos en los productos lácteos.

II.H.1.a. Pseudomonas

El género *Pseudomonas* son los psicrótrofos más comunes aislados de la leche. Bacilos rectos o curvos ($0.5-1 \mu\text{m} \times 1.5-4 \mu\text{m}$). Gram negativos. Móviles mediante flagelo polar. Catalasa positivos. Habitualmente oxidasa positivos. Quimioorganotrofos. Metabolismo respiratorio, nunca fermentativo. Exigencias para su crecimiento extremadamente simples en la mayoría de los casos. Aerobios estrictos excepto aquellas especies que tienen capacidad denitrificante y que pueden crecer en anaerobiosis.

Entre las *Pseudomonas* psicrótrofas que tienen origen en la lechería se describen varias especies diferentes: *P.fluorescens*, *P.fragi*, *P.putida*, y *P.putrefaciens*.

(i) Pseudomonas fluorescens

Se encuentra principalmente en el agua y en el suelo. Produce alteración de la leche y productos lácteos debido a que son psicrótrofas y elaboran enzimas hidrolíticas extracelulares termorresistentes. Produce un pigmento fluorescente difusible especialmente en el medio B de King. Algunas cepas producen un pigmento azul, no difusible. No producen pigmento en el medio A de King.

Grupo I de homología del RNA (Pecknold and Grogan, 1973). Presencia de arginina dihidrolasa. Habitualmente no reduce los nitratos a nitritos. Crece a 4°C pero no a 42°C. Generalmente puede usar el manitol como fuente de carbono pero no el etanol en medio con sales de amonio y azúcares (King and Phillips, 1978). Se han descrito 4 biotipos, de acuerdo principalmente con la producción de pigmento, capacidad de denitrificación, síntesis de levanos a partir de sacarosa y capacidad de utilizar varios carbohidratos como fuente de carbono.

Exigencias nutritivas versátiles. Aerobio obligado excepto unas pocas cepas capaces de utilizar los nitratos como aceptor final de electrones. Temperatura óptima de crecimiento 25-30°C aproximadamente.

P. fluorescens licúa la gelatina.

(ii) *Pseudomonas putida*

Se aísla del suelo y, con menor frecuencia, del agua. Produce un pigmento fluorescente difusible especialmente en el medio B de King. No produce pigmento en el medio A de King.

Grupo I de homología del RNA (Pecknold and Grogan, 1973). Presencia de arginina dehidrolasa. No reduce los nitratos a nitritos (King and Phillips, 1978) aunque Buchanan Gibbons (1974) afirman que puede producir nitritos a partir de nitratos. Crece a 4°C pero no a 42°C (King and Phillips, 1978). Puede utilizar el etanol pero no el manitol en el medio con sales de amonio y azúcares (King and Philips, 1978).

Exigencias nutritivas versátiles. Aerobio obligado. Temperatura óptima de crecimiento 25-30°C aproximadamente.

P. putida tiene dos variedades y no licúa la gelatina.

(iii) *Pseudomonas fragi*

Se encuentra habitualmente en el suelo y en el agua (Morrison and Hammer, 1941). No produce pigmentos fluorescentes y no se observan colonias pigmentadas (Hendrie and Shewan, 1966). Algunas cepas pueden producir un pigmento marrón difusible (Lysenko, 1961). Presencia de arginina dehidrolasa. No reduce los nitratos. Puede crecer a 5°C pero no a

42°C (Lysenko, 1961) Puede utilizar el etanol y la maltosa en medios con sales de amonio y azúcares (King and Phillips, 1978).

(iv) *Pseudomonas putrefasciens*

Se encuentra en el agua y en el suelo. Produce alteración en el pescado, la leche y productos lácteos. Produce un pigmento difusible: marrón rojizo o rosa (Long and Hammer, 1941). Reduce los nitratos a nitritos y su capacidad para producir reducciones posteriores depende de la cepa (King and Phillips, 1978). Puede crecer a 4°C pero no a 37°C; produce rápidamente fosfatasa en leche y otros medios (Long and Hammer, 1941). Posee ornitina decarboxilasa (King and Phillips, 1978). Produce SH₂ en Agar Hierro Peptona (Levin, 1968). Se considera como facultativo (Long and Hammer, 1941) debido, probablemente, a su capacidad para utilizar el nitrato como aceptor final de electrones. Temperatura óptima de crecimiento 21°C aproximadamente (Derby and Hammer, 1931).

II.H.1.b. Enterobacteriaceae

Algunos géneros lacto-fermentadores de la familia Enterobacteriaceae contienen especies psicrótrofas. La ocurrencia frecuente de estos organismos en la leche cruda es debida a la distribución obicua en los hábitat naturales como la tierra, césped, heno, cereales, estiércol, y agua de la superficie. Estos géneros no son dominantes a las temperaturas debajo de 8 a 10°C en una población desarrollada espontáneamente en la leche. Algunos aislados de leche refrigerada muestra características atípicas. Esto puede apuntar a una selección de biotipos particulares y variantes en poblaciones que desarrollan a las temperaturas bajas (Gyllenberg, H. G. Y Eklund, E., 1966, citado por Suhren, G.1989). Esta familia comprende bacterias gram-negativas, de forma bacilar, anaerobias facultativas de tamaño pequeño (0,4-0,7 × 1,0-4,0 μm). Lo normal es que se presenten individualmente. Pueden tener cápsula. Móviles mediante flagelos peritricos, o inmóviles. Gram-negativos. Quimioorganotrofos. La temperatura óptima de crecimiento para casi todos los géneros, es de 37°C.

Se destruyen fácilmente durante la pasteurización (Gilmour,A and Rowe,M.1987).

II.H.1.c. Flavobacterium

A menudo han sido aislada de la leche cruda bacterias Gram negativas pigmento amarillo-naranja identificadas como *Flavobacterium spp.*, Dos de cuatro variedades de *Flavobacterium* probadas han tenido tendencias psicotróficas; ellas no obstante eran incapaces de producir proteinasas a 7°C en una proporción importante para ser de importancia práctica. A las temperaturas ambientes (22°C) estas variedades eran favorablemente los proteolíticos. Se sugiere por consiguiente que la importancia práctica de flavobacteria de la lechería no quede tanto en su crecimiento de psicotróficas en la leche refrigerada, como en su contaminación de leche vía las tuberías y equipo mal lavados (Jooste, P. J. Y Britz, T. J., 1986, citado por Suhren, G.1989).

Las flavobacterias son un grupo heterogeneo de bacterias pigmentarias. Se ha observado, además, que *Flavobacterium sp* puede producir gran viscosidad en la leche a 4°C de temperatura (Thomas, 1958 citado por Gilmour,A and Rowe,M.1987).

II.H.1.d. Cytophago

El deslizamiento debido a la motilidad y la extensión del crecimiento son dos características de importancia para diferenciar *Flavobacterium* y *Cytophago*. Hay considerables similitudes químicas y bioquímicas entre *Flavobacterium* y *Cytophago* que llevan a problemas cuando uno intenta distinguir entre los dos géneros (Holmes, B, Owen, R. J., y McMeekin, T. A., 1984, citado por Suhren, G.1989).

II.I.1.e. Aeromonas

Aeromonas sp. Comparte algunas propiedades con los miembros de los Enterobacteriaceae y algunos con los miembros del género *Pseudomonas* y *Vibrio*, pero miembros del género *Aeromonas* se separan ahora claramente

En bacteriología de la lechería *Aeromona sp* es de importancia y pertenece al grupo de mótils. Todas las especies de *Aeromonas* probadas por Eddy, B. F., 1960 (citado por Suhren, G.1989) eran caseinolíticas y lipolíticas. El agua es uno de los habitat naturales principales de estos organismos. Por consiguiente es de suponer que *Aeromona* se encuentra en forma consistente en la microflora de productos lácteos (Thomas, S. B. Y Druce, R. G., 1971, citado por Suhren, G.1989). Las colonias de los microorganismos pertenecientes al género *Aeromonas* habitualmente no presentan pigmentación alguna. No son muy exigentes en cuanto a condiciones de crecimiento.

II.H.1.f. Acinetobacter, Alcaligenes, y Achromobacter

Thornley, M. J., 1967, (citado por Suhren, G.1989) recomendó que los bastones coccoides móviles deben ponerse en el género *Acinetobacter*, mientras el género *Alcaligenes* debe retenerse por motil, peritrichously las especies de tipo flagelar. *Achromobacter* debe reservarse para cualquier motil peritrichous.

Fenotípicamente, el género *Acinetobacter* y *Moraxella* son muy similares. Ellos pueden diferenciarse por la prueba oxidasa y sensibilidad de la penicilina (Juni, E., 1984, citado por Suhern, G.1989) *Alcaligenes sp* mencionado a menudo en la lactología de la lechería es *A.viscolactis* (o viscosus) y *A.Tolerans*. Según Gyllenberg y Eklund ellos son fácilmente distinguidos por nosotros por la resistencia de calor pronunciada y presencia de oxidasa en *A. Tolerans*.

A.Tolerans crece a 37°C, no crece a los 2°C, y crece muy despacio a los 5°C. *A.viscolactis* se describe como distintamente psicrotrofos y notablemente lipolítico.

II.H.1.g. Psicrótrofos Termodúricos

Según Coghil, D., 1982, (citado por Suhren, G.1989) los psicrótrofos termodúricos son un grupo de bacterias capaces de resistir las temperaturas altas similar a aquellas usadas en la pasteurización (72 a 74°C) y también creciendo a las temperaturas de refrigeración (4 a 7°C). Ellos pertenecen al genero *Bacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, y *Corynebacterium*. La mayoría pertenece al genero *Bacillus*, que es espora Gram-positiva formando bastones aerobios. Comparado al bacilo psicrótrofo gram-negativo, los psicrótrofos termodúricos se caracterizan por el tiempo de generación bastante largo y/o fases de retraso. Dentro de la flora de leche cruda mixta estos géneros son cuantitativamente de importancia menor desde que normalmente se guarda la leche cruda por sólo período corto de tiempo. Su importancia radica en su influencia en la calidad, teniendo en cuenta tiempo de guardado, de pasteurizado, de alimento no recontaminado.

II.I. MODIFICACIONES DE LA LECHE DESPUES DE SU RECOGIDA

Después de recogida, la leche presenta dos tipos de modificaciones, modificaciones físico – químicas y modificaciones biológicas

II.I.1. Principales alteraciones bioquímica

La leche puede sufrir un cierto número de alteraciones bioquímicas. Entre ellas, las principales son:

a) Acidificación: la acidificación del medio tiene lugar a partir de 50 a 100 millones de gérmenes por ml de leche.

- b) Proteólisis: la proteólisis se produce a partir de 1 a 10 millones de gérmenes por mililitro de leche.
- c) Lipólisis: la lipólisis se produce a partir de 0,5 a 2 millones de gérmenes por ml de leche.
- d) Hinchamiento butírico: existe el riesgo de la aparición de defectos (hinchamiento butírico de los quesos) cuando se encuentran más de 0,5 esporas de *Clostridium tyrobutyricum* por ml de leche.
- e) Coagulación suave: este riesgo se presenta cuando hay más de 1 millón de gérmenes de *Bacillus cereus* por ml de leche.
- f) Mala conservación: después de la pasteurización la leche debe contener menos de 30.000 gérmenes termorresistentes por ml para asegurar una buena conservación a temperatura inferior a 6°C. (F.M. Luquet 1991).

II.I.1.a. Proteólisis por psicrótrofos

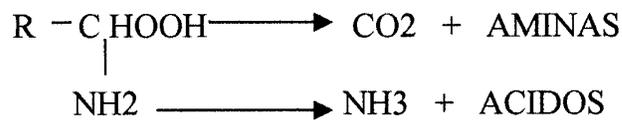
Los productos de degradación de las proteínas ocasionan sabores amargos y a veces pútridos.

La proteólisis puede ser debida a la acción de una de las proteasas naturales de la leche, la proteasa alcalina o plasmina. La enzima está asociado a las micelas, probablemente a la caseína beta y a lo largo del enfriamiento pasa al suero, donde su actividad se acrecienta, observándose un aumento de la proporción de caseína gama.

Las consecuencias tecnológicas más graves se deben a la acción de las proteasas de las bacterias psicrótrofas, producidas a temperatura baja, cuyos efectos se manifiestan en las leches refrigeradas incluso con niveles de población relativamente moderadas. Las proteasas de estas bacterias tienen acción a partir del segundo día y es máximo al quinto. El pH óptimo es 7,8 y la temperatura a la que su actividad es máxima está comprendida entre 40 y 50 °C. Aunque estas proteasas siguen activas a un pH y a una temperatura bajas, la termoestabilidad se sitúa en 150 °C durante 10 segundos, esta termoestabilidad permite que este presente en las leches pasteurizadas y UHT,

con los problemas que ello implica. La producción de proteasas es más importante a bajas que a altas temperaturas; y por ejemplo, la *Pseudomona fluorescens* excreta seis veces más proteasas a 3°C que a 29°C. Las proteasas proporcionan una menor estabilidad térmica a la leche, produciendo su coagulación a lo largo del tratamiento. Dan lugar a la degradación de las caseínas, lo que implica pérdidas en el rendimiento en la fabricación de quesos y un aumento de la cantidad de nitrógeno presente en el lactosuero. Producen una modificación de las características gustativas, al perder frescura la leche, así como una aparición de sabores amargos y pútridos, e incluso gusto a "sucio" cuando se alcanzan los diez millones de gérmenes.

La descomposición de las bacterias de la proteína de la leche, efectuada por las enzimas proteolíticas y proteinasa, trae como consecuencia la llamada "coagulación dulce" de la leche y se caracteriza por la acumulación de compuestos de reacción alcalina en especial las aminas y el desprendimiento de gases del tipo indol que imparten a la leche un olor desagradable (citado por Keating, 1986).



El crecimiento de bacterias psicrótrofas en la leche luego de su recogida no produce de por sí problemas serios del deterioro en la leche. La mayoría son bacilos Gram negativos termolábiles que mueren la pasteurización sin embargo pueden producir proteinasa termoresistentes que pueden provocar cambios indeseables en leche y sub productos lácteos.

Estas proteinasas bacterianas afectan principalmente a la κ caseína, mientras que la β caseína es menos susceptible. La proteólisis afecta el coágulo de la leche, la maduración del queso, así como el sabor y textura de varios productos lácteos.

El término proteinasa (endopeptidasa) y el término proteasa son usados indistintamente sin embargo se considera que las proteinasas son más

específicas . El término proteínasa se refiere a endopeptidasas que catalizan primero el enlace interno entre péptidos y que son muy activas en la mayoría de las proteínas, causando su ruptura en péptidos de menor tamaño (Stepaniak, et al 1989 citado por Mottar,J.1989) .

Los grupos de enzimas de mayor importancia económica son las proteinasas y las lipasas (incluidas las fosfolipasas) producidas extracelularmente que atacan la caseína micelar y los glóbulos de grasa de la leche .

Su acción se presenta durante el crecimiento de los psicrótrofos y con los tratamientos industriales como la pasteurización y/o los tratamientos UHT.

Estas enzimas microbianas pueden afectar la calidad de muchos productos lácteos causando y/o acelerando reacciones físico-químicas durante el almacenamiento de la leche.

Ademas de estas enzimas microbiana, la leche contiene proteínasa y lipasa naturales causantes de importantes cambios biofísicos .

La lipasa natural de la leche es inactivada por la pasteurización (90°C 30 seg) mientras que la proteínasa natural es termoestable .(Chandan et al ,1964, citado por Mottar, 1989). La ocurrencia de enzimas bacterianas termoresistentes en leche depende de la presencia de microorganismos psicrótrofos .

II.I.1.b. Producción y caracterización de las proteasas. *P. fluorescens* contiene una enzima que ataca caseína además de ser lipolítica y amilolítica.

La enzima es producida en grandes cantidades a 0°C y decrece a medida que la temperatura aumenta hasta 30°C. Muchas especies de *Pseudomonas* son altamente proteolíticas capaces de producir la mayor cantidad de proteólisis en la leche descremada cruda y tratada con calor.

El calentamiento con 121°C por 2 min. destruye menos del 40% de la actividad de la mayoría de las proteasas. El pH óptimo y la temperatura para la producción de proteasa depende de la especie y raza de bacterias.

II.I.1.c. Hidrólisis de la proteína de la leche. *P. fluorescens*, *P. fragi*, *Flavobacterium sp*, *Achromobacter sp*. alteran las caseínas de la leche descremada a 0 a 5 °C.

Las β y α caseínas son preferentemente atacadas por las proteasas de los psicrótrofos. (citado por Cousin, M.A. 1982) Los cambios en la composición de las caseínas son los que se observan cuando aparecen sabores desagradables. (Kiure et al 1970 citado por Cousins, M. 1982) Las β caseína es degradada en mayor medida por las bacterias psicrótrofas que la α caseína. Las α y β caseína asiladas son susceptibles a la proteólisis, que la mezcla completa de caseínas. La β caseína es más susceptible a proteólisis cuando la temperatura es menor y la α caseína se hace más susceptible cuando la estructura de la micela se rompe por remoción del coloide fosfato calcio. (Fox 1983 citado por Cousin, M. 1982). Son 8 proteasas las que producen casi idénticos modelos de degradación de proteínas. Las especies de *Pseudomonas* causan descenso en α y β lactoalbúmina entre 0 a 39% de degradación luego de 13 días a 5°C dependiendo de la especie y el género (Adams et al 1979 . citado por Cousins, M. 1982).

II.I.1.d. Grado de proteólisis. Algunos investigadores estudiaron el grado de proteólisis causado por los microorganismos psicrótrofos o sus proteasas midiendo diferentes compuestos nitrogenados obtenidos dentro de un medio de crecimiento. Observaron que el nitrógeno de la caseína en leche disminuyó mientras que el nitrógeno no proteico (NPN) aumentó durante el almacenamiento. (Nakanishi and Tanabe 1970 citado por Cousins, M. 1982). Otros investigadores reportaron un aumento de nitrógeno no caseínico NCN, y NPN en el almacenamiento en frío de la leche tratada con proteasas resistentes al calor aisladas de las bacterias psicotróficas.

Los valores fueron mayores cuando la leche fue inoculada con *Pseudomonas spp.* Estas *Pseudomonas* crecen rápidamente a 6 a 9°C y se observa que aumentan la producción de piruvato y amonía (Heeschen 1972 citado por Cousins, M. 1982). Los psicrótrofos aeróbicos formadores de esporas tiene un crecimiento mucho más lento que los que no forman esporas pero producen una proteólisis considerable. La caseína fue degradada sólo a proteasa-peptona ya que el nivel de NPN permanece esencialmente constante y la disminución del nitrógeno caseínico corresponde a un aumento del nitrógeno de la proteasa-peptona.

No se encontró ninguna relación entre la población de psicrótrofos y la proteólisis, pero existe una relación entre la población y la producción de nitrógeno soluble, tirosina y triptófano. (Van derZant 1955 citado por Cousins, M. 1982) En la leche pasteurizada en corto tiempo ocurre un aumento de la proteólisis, la cual tenía proteasas agregadas antes o después de la pasteurización o tenía *P. fluorescens* P26 agregada antes de la pasteurización (White 1973 citado por Cousins, M. 1982).

La tasa de proteólisis y el tipo de productos obtenidos difieren según las diferentes bacterias psicrótrofas. Por ejemplo la proteólisis de la leche por *B. subtilis* difiere de *P. fluorescens*. Los aminoácidos obtenidos por las proteasas de los psicrótrofos fueron identificados luego del desarrollo de tres especies de *Pseudomonas*. Se detectaron lisina, leucina, ornitina, fenilalanina, valina, metionina, glutamina, serina e isoleucina. Otros aminoácidos fueron detectados en cantidades traza o no identificados totalmente. Los aminoácidos liberados de la beta caseína inoculada con proteasas de *Micrococcus freundenreichii* fueron principalmente lisina, glutamina, prolina, valina, y metionina (Moreno 1973 citado por Cousins, M. 1982).

Por electroforesis Viejo et al, 2000, detectaron que la actividad proteolítica se duplicó a las 24 horas de crecimiento con conteos de 1.2×10^7 UFC/ml. La producción exponencial de estas enzimas coincide con la fase tardía y estacionaria de crecimiento. Los análisis de electroforesis indican que la degradación de caseínas $\kappa > \beta > \alpha_{s1}$ ocurre con la concentración enzimática producida entre las 24 y 48 horas correspondientes a la cinética de crecimiento, mientras que el α_{s2} se degrada totalmente luego de 72 horas (conteos 5×10^9 UFC/ml) para los tratamientos en estudio.

II.1.1.e. Termoestabilidad e inactivación de las proteasas psicrótrofas.

Los minerales calcio y zinc aumentan la termoestabilidad de las proteasas de las *Pseudomonas*. (Barch et al 1976 citado por Cousins, M. 1982). La habilidad para sobrevivir a temperaturas extremas resulta de la flexibilidad

estructural de la enzima y de la interacción de los cationes permitiendo una renaturalización que ocurre durante el calentamiento. El mejor método encontrado para desactivar las proteasas resistentes al calor fue el calentamiento durante una hora a 55°C ya que resulta en la desactivación del 87 al 90% de las proteasas en la leche (West et al 1978 citado por Cousins, M. 1982).

II.I.1.f. Detección de proteólisis. La proteólisis se puede identificar por las características organolépticas que esta imprime a la leche como los olores y sabores desagradables. Algunas investigaciones encontraron una relación entre la contaminación por psicrótrofos y la rapidez con que la leche se pudre. Los sabores amargos acompañan la degradación de la proteína, los sabores y olores a podrido se atribuyen a la ruptura de las proteínas en péptidos amargos y su posterior descomposición de los aminoácidos en productos finales pútridos. Sabores a rancio son el resultado de la ruptura de lípidos en ácidos grasos como butírico, caproico, caprílico, caprico y laurico. De esto se concluye que los sabores defectuosos en la leche se deben a a) productos finales del metabolismo de m.o, b) constituyentes de las células bacterianas destruidas, c) enzimas estables al calor, d) desarrollo de m.o termoestables.

II.I.1.g. Lipólisis por psicrótrofos

La hidrólisis de los triglicéridos con la liberación de ácido graso y triglicéridos es el resultado de una acción enzimática que puede aparecer en todos los productos lácteos y es la causante de una de los grandes defectos, el enranciamiento.

Esto se debe a que durante la lipólisis se produce una descomposición en la que intervienen enzimas lipolíticas y el ácido graso es transformado en glicerol y ácido graso de cadena corta principalmente butírico.

Normalmente se producen dos clases de lipasas, las que existen en forma natural en la leche y las producidas por los microorganismos psicrótrofos.

Al igual que en el caso de la proteólisis ya descrito el crecimiento de éstas bacterias en la leche luego de su recogida no produce de por sí problemas serios de deterioro y la mayoría son bacilos Gram negativos que

mueren luego de la pasteurización. Sin embargo son capaces de producir lipasas y fosfolipasas termorresistentes que pueden provocar cambios indeseables en la leche y sub productos lácteos.

Muchas bacterias psicrótrofas producen enzimas lipolíticas, proteinasas, y lipasas extracelulares con alta actividad (Stead, 1986; citado por Mottar;1989).

La producción de lipasa por los psicrótrofos varía con la especie, la temperatura óptima, el pH y la especificidad enzimática. El sabor amargo probablemente resulte de la proteólisis y la lipólisis. *P. fragi* hidroliza la grasa de la leche a 7°C entre 6 a 9 días. Los ácidos grasos de cadena corta liberados probablemente sirven de sustrato para la subsecuente esterificación. Esos ácidos grasos son los responsables del sabor a fruta que se desarrolla en la leche y el queso cottage. La actividad lipásica fue reportada para la mayoría de los psicrótrofos aislados en la leche el queso cottage y la crema. Sin embargo las bacterias más lipolíticas son: *Pseudomonas* y *Flavobacterium* y *Alcaligenes*. Los ácidos grasos obtenidos por las lipasas microbianas pueden ser degradadas a carbonil y otros compuestos volátiles lo que produce el desarrollo de los sabores en la leche y subproductos. Los sabores a fruta son producidos por psicrótrofos de la especie *Pseudomonas* especialmente por los ésteres etilbutirato y etilhexanato. Hay especies de *Pseudomonas* y *Alcaligenes* que pueden oxidar los ácidos grasos saturados (Muir et al.1979 citado por Cousins,M. 1982).

Las diferentes razas de *P. fragi* tienen habilidades diferentes para producir lipasas bajo las mismas condiciones de crecimiento. La máxima producción de lipasa ocurre a 15°C o menos luego de 3 o más días de incubación.

La lipasa de *Achromobacter lipolyticum* libera más ácido caprílico, capríco laurico y mirístico de la grasa de la leche que otros ácidos grasos como butírico o palmítico (Muir et al. 1979 citado por Cousins,M. 1982).

El 90 % a 95% de la actividad lipasa es extracelular y el 95% de la actividad esterasa es intracelular. La producción de lipasa es afectada por la composición nutricional del medio mientras que la de la esterasa no. Además de los nutrientes la temp. y el pH influyen la producción de lipasa. Una lipasa aislada de *P fluorescens* mostró mayor actividad contra tributirina entre 25 y 50°C, pero su actividad decreció a temperatura por

encima y por debajo de ese rango (Breuil, et al.1975. citado por Cousins,M. 1982).

II.I.1.h. Inactivación de las lipasas por calor

La inactivación de las lipasas por calor se importante porque las enzimas que sobreviven al calor pueden disminuir la calidad de la leche. Las lipasa de varios psicótrofos fueron evaluadas por su habilidad de sobrevivir a la pasteurización normal. de 72°C durante 15 a 20 segundos. Los resultados indican que son requeridos de 3 a 170 minutos para lograr la inactivación del 90 % de la lipasa, y que es necesario el tratamiento UHT de 150°C para destruir las enzimas lipolíticas y proteolíticas de las bacterias psicrótrofas. Algunos autores encontraron que el 40% de las bacterias psicrótrofas principalmente de las especies *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Aerobacter* producen enzimas que retienen el 75% de su actividad luego del calentamiento por 2 min. a 90°C. La lipasa exocelular de *P. fluorescens* pierde actividad en dos fases. Dos enzimas o una enzima con diferentes sitios de acción están involucradas primero la proteína es desnaturalizada y luego hay una reacción química (Kishonti, et al.citado por Cousins, M. 1982).

II.I.1.i. Producción de fosfolipasas por psicrótrofos.

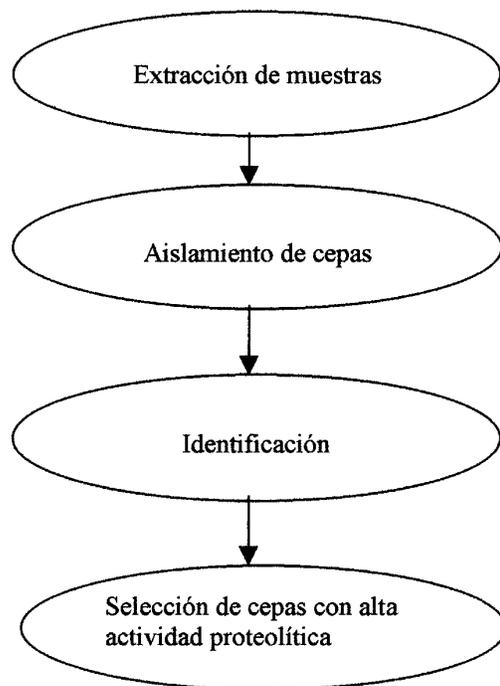
Se asumía que sólo había actividad lipolítica, gicolítica y proteolítica en la degradación de la leche por microorganismos psicrótrofos, sin embargo se descubrió que las fosfolipasas son tambien importantes en la degradación de las leche. Se encontraron 58 microorganismos que producen fosfolipasas, son *Pseudomonas* particularmente *P. fluorescens*. Las fosfolipasas actúan degradando la membrana del glóbulo de la grasa de la leche lo que aumenta su susceptibilidad a la acción de las lipasas (Fox, et al citado por Cousins,M. 1982).

III. MATERIALES Y METODOS

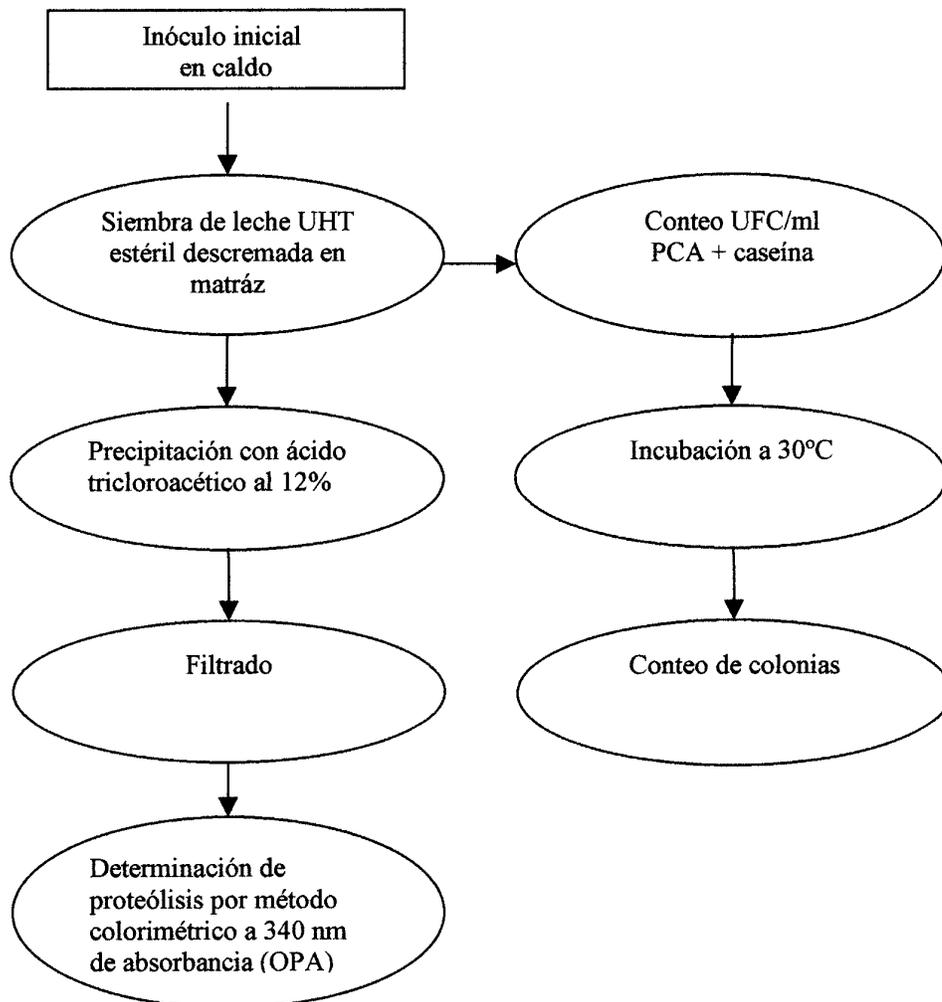
La parte experimental de la presente tesis se desarrolla en el Laboratorio de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Agronomía. Las bacterias utilizadas fueron aisladas de muestras de leche provenientes de tanques de frío de 20 establecimientos lecheros ubicados en la cuenca sur.

III.A. Metodología

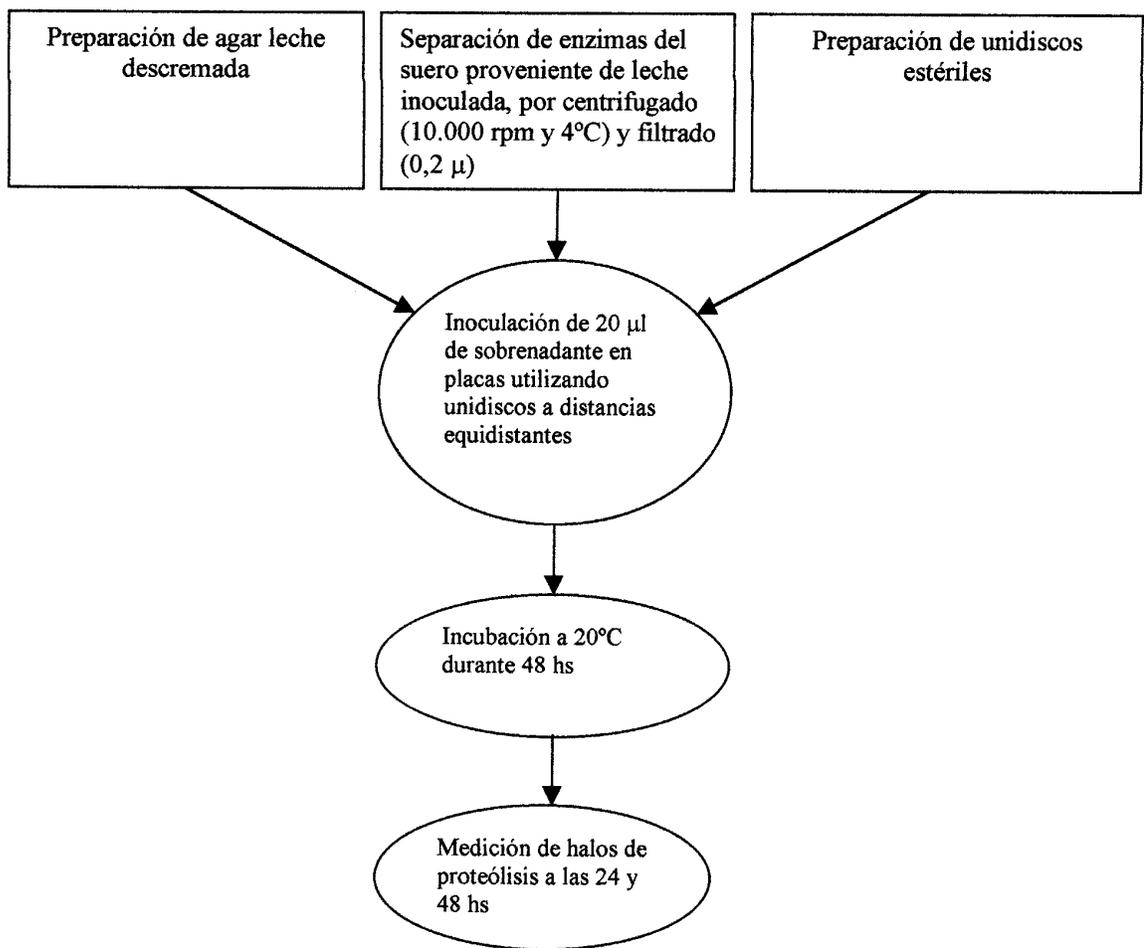
III.A.1. Obtención de inóculo



III.A.2. Curva de crecimiento y determinación de proteólisis por método colorimétrico (o-ophtaldehído)



III.A.3. Determinación de proteólisis por el método de difusión



III.B. Extracción de muestras

Los muestreos se realizaron en los meses de julio 1999 y enero del 2000 en tambos del departamento de Colonia. La recolección de las muestras se

realizaron bajo refrigeración y se cultivaron para determinación de conteos totales (PCA), y psicrótrofos (AC). Los cultivos para conteos totales se incubaron a temperaturas de 35°C durante 48hs, en el caso de determinación de psicrótrofos se incubaron a 4°C durante 10 días. Una vez obtenidos los cultivos de psicrótrofos se realizaron aislamientos de cepas que presentaron una gran actividad proteolítica en placas de agar caseína. Las cepas fueron posteriormente identificadas por pruebas bioquímicas primarias y secundarias, cultivos en medios selectivos y producción de pigmentos. Para la realización de este trabajo se eligieron dos cepas del mismo género. Dichas bacterias fueron identificadas como *Pseudomonas fluorescens* (1005) y *Pseudomonas fragi* (1886). El criterio utilizado para la selección de dichas bacterias fue su alta frecuencia de aparición en los muestreos y su alta capacidad para degradar la caseína en placas de agar caseína.

III.C. Curva estándar para proteínas

Previo a la determinación de la curva de crecimiento se determinó la curva patrón de lisina. En un matraz de 500ml fueron colocados 250 ml de dH₂O a la que se le adicionó 0,0365 gr de lisina. Alícuotas crecientes de dicha solución (10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, y 120µl) fueron pasadas a través de espectrofotómetro a 340nm midiéndose la densidad óptica correspondiente.

III.D. Preparación del inóculo

Se realizó el inóculo inicial para la cinética de crecimiento con las cepas *Ps. fluorescens* (1005) y *Ps. fragi* (1886). Colonias de bacterias 1005 y 1886 fueron tomadas con asa bacteriológica y sembradas por el método de dilución en cajas de Petri conteniendo PCA caseína. Las cajas sembradas se incubaron en estufa a 30°C durante 48 hs. A las 48 horas de incubación se procedió a extraer mediante asa bacteriológica cinco (5) colonias de 2mm de diámetro aproximado cada una de la bacteria 1005 al igual que de la 1886 y fueron inoculadas en tubos de ensayo de 20 cc de capacidad conteniendo 15 ml de caldo nutritivo estéril. Tanto el caldo conteniendo la

bacteria 1005 como el que contenía la 1886 así como las sucesivas diluciones de los mismos fueron pasadas por espectrofotómetro y sembradas en placas de agar caseína encontrándose que una concentración de 1×10^5 UFC/ml en caldo nutritivo se correspondía con una densidad óptica de 0,019 y 0,018 a 600 nm de absorbancia para la 1005 y la 1886 respectivamente.

III.E. Inoculación de leche UHT estéril con cepas de *Pseudomonas fluorescens* (1005) y *Pseudomonas fragi* (1886)

III.E.a. Cinética de crecimiento

Una vez aisladas e identificadas las dos cepas se procedió a determinar la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación. Las cinéticas de crecimiento se realizaron por duplicado utilizándose para ello seis matraces de 500 ml conteniendo 200 ml de leche UHT descremada estéril, se inocularon con dos ml de caldo conteniendo cultivo joven con una concentración de 1×10^5 UFC/ml, para ambas cepas en estudio. Los matraces sin inocular fueron utilizados como testigos. Dichos matraces fueron colocados en condiciones de 150 r.p.m. a 7°C durante 7 días.

Se determinó conteos viables en forma periódica (cada 12 horas) y actividad proteolítica. Se realizaron diluciones en suero fisiológico estéril (0,85%) y se sembraron cada dilución por triplicado en placas de agar caseína para determinar las UFC/ml siendo incubadas a 30°C durante 48 horas.

III.E.b. Determinación de actividad proteolítica mediante técnica OPA y por método de difusión.

En la segunda instancia del experimento se procedió a determinar la proteólisis causada por las enzimas de origen bacterial. Para ello se

utilizaron dos métodos, uno colorimétrico que usó como reactivo al OPA con β -mercaptoetanol, y otro de difusión en placa de Petri.

III.E.b.a. Técnica de OPA

La técnica de OPA se realizó según la descrita por CHURCH, 1983 y se obtuvieron las muestras de acuerdo al procedimiento descrito.

Cada doce (12) horas, cinco (5) mililitros de leche fueron extraídos de los matraces con pipeta de vidrio estéril. La leche extraída fue colocada en tubos de ensayo de 20 cc de capacidad, a los que se le agregó 1 ml de agua y 10 ml de ácido tricloroacético en forma consecutiva, pasándose en forma inmediata a una agitación en vortex durante 10 minutos. El contenido del tubo fue pasado a través de papel filtro Watman N°4. Al filtrado se le aplicó la técnica del OPA. Luego de 5 minutos se determinó colorimetría a 340 nm de absorbancia.

III.E.b.b. Técnica de difusión en Placa de Petri

La técnica de difusión se realizó en Agar Leche Descremada. Se midieron los diámetros de los halos de hidrólisis a 20°C. Muestras de suero proveniente de leche inoculada con las cepas 1005 y 1886 se centrifugaron a 4°C por 10 minutos a 10.000 rpm y se filtran (0,20 μ) los sobrenadantes. Cada caja de Agar Leche Descremada fue inoculada a distancias equidistantes con 20 μ l de sobrenadante utilizándose unidiscos de papel filtro estéril. A las 24 y 48 horas se procedió a la medición de los halos de proteólisis producidos por las enzimas extracelulares.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla XVI se observan algunas de las pruebas para identificación de psicrófilos seleccionados (debido a su frecuencia y proteólisis), notándose

En los aislamientos de bacterias de leche proveniente de los tanques de frío se pudo detectar la firme presencia de microorganismos psicrótrofos con gran capacidad proteolítica, hecho que se puede visualizar en la foto 1. Entre ellos se destacaron *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas fragi*. Apoyándonos en la abundante bibliografía existente podemos decir que su constante presencia en las leches analizadas es debida a la obicuidad de las mismas.

No. de cepa	Reacción Gram	Catalasa	Identificación
1005	Gram (-)	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
1885	Gram (-)	+	<i>Pseudomonas fragi</i>

Foto I



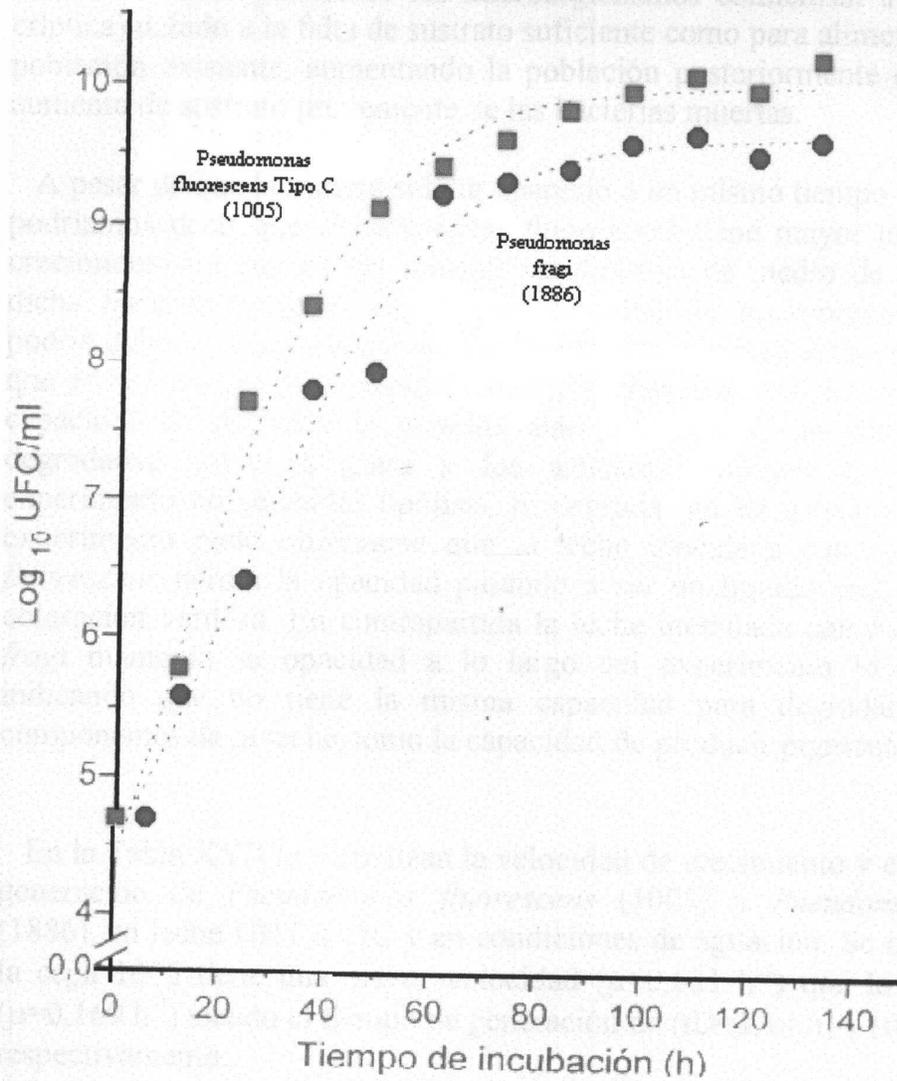
En la Tabla XVI se observan algunas de las pruebas para identificación de psicrótrofos seleccionados (debido a su frecuencia y proteólisis), notándose que son bacilos gram negativos, catalasa positivos y pertenecientes al género *Pseudomonas*, lo que concuerda con la bibliografía existente.

Tabla XVI
Identificación de dos cepas psicrótrofas proteolíticas

	Tinción Gram	Catalasa	Identificación
1005	Gram (-)	+	<i>Pseudomonas Fluorescens</i>
1886	Gram (-)	+	<i>Pseudomonas Fragi</i>

La cinética de crecimiento de las dos cepas de *Pseudomonas* seleccionadas se observan en el gráfico 1, en el mismo se aprecia que desde el comienzo del experimento hasta el final del mismo *Pseudomonas fluorescens* presentó una mayor velocidad de crecimiento. La fase de latencia fue algo mayor en *Pseudomonas fragi* quizás debido a una menor capacidad de adaptación al medio, siendo menos eficiente que *Ps.fluorescens* en la producción de enzimas.

Gráfica 1
Crecimiento de las dos cepas
de Pseudomonas



A las 120 horas de incubación tanto en *Pseudomonas fluorescens* como en *Pseudomonas fragi* se registró una baja en la población microbiana seguido de un incremento a las 136 horas. Es evidente que a las 120 horas de comenzado el experimento los microorganismos comienzan a morir (fase críptica) debido a la falta de sustrato suficiente como para alimentar a la alta población existente, aumentando la población posteriormente debido a un aumento de sustrato proveniente de las bacterias muertas.

A pesar de que la muerte celular apareció a un mismo tiempo cronológico podríamos decir que *Pseudomonas fluorescens* tiene mayor capacidad de crecimiento ya que en las mismas condiciones de medio de crecimiento dicha bacteria presentó una mayor cantidad de microorganismos, esto podría deberse a que *Pseudomonas fluorescens* produce diferentes enzimas que *Pseudomonas fragi* y posiblemente dichas enzimas no solo tienen la capacidad de degradar la proteína sino que tienen una gran capacidad degradativa sobre la grasa y los azúcares. Aunque en el presente experimento no se midió lipólisis, ni degradación de azúcares durante el experimento pudo observarse que la leche inoculada con *Pseudomonas fluorescens* perdía la opacidad pasando a ser un líquido cristalino y con coloración verdosa. En contrapartida la leche inoculada con *Pseudomonas fragi* mantenía su opacidad a lo largo del experimento lo que estaría indicando que no tiene la misma capacidad para degradar todos los componentes de la leche, como la capacidad de producir pigmentos.

En la Tabla XVII se visualizan la velocidad de crecimiento y el tiempo de generación de *Pseudomonas fluorescens* (1005) y *Pseudomonas fragi* (1886), en leche UHT a 7°C y en condiciones de agitación. Se observa que la cepa 1005 tiene una mayor velocidad ($\mu=0,221 \text{ h}^{-1}$) que la cepa 1886 ($\mu=0,169 \text{ h}^{-1}$) siendo el tiempo de generación de ($t_D=3,14 \text{ h}$) y ($t_D=4,101 \text{ h}$) respectivamente.

Tabla XVII
 Velocidad de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (tD) de dos cepas de
Pseudomonas creciendo a 7°C y 150 rpm.

Cepa	μ (h ⁻¹)	tD (h)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0,221	3,14
<i>Pseudomonas fragi</i>	0,169	4,10

Los valores de tD encontrados se aproximan a los encontrados por Langeveld y Cuperus (1980) para *Pseudomonas spp* en leche pasteurizada (3,5 h).

En el caso específico de *Pseudomonas fluorescens* los valores de tiempo de generación encontrados en este experimento discrepan con los encontrados por Brandt y Ledford (1982) de 8,7 y 5 hs en leche de vaca, dicha diferencia podría deberse a condiciones experimentales diferentes o a que en este experimento se utilizó una variante diferente de *Pseudomonas fluorescens* y que dicha variante tiene mejor capacidad de aprovechar el substrato y por tanto de crecer.

En la Tabla XVIII se observa la densidad óptica correspondiente a diferentes concentraciones de lisina, pudiéndose comprobar que a medida que los aminoácidos libres aumentan en una solución la densidad óptica también.

Tabla XVIII
Medición de la densidad óptica de diferentes concentraciones de lisina.

Concentración (μ l)	Equivalencia en gramos	Absorbancia
10	$1,460 \times 10^{-6}$	0,036
20	$2,920 \times 10^{-6}$	0,180
40	$5,840 \times 10^{-6}$	0,440
60	$8,760 \times 10^{-6}$	0,596
80	$11,68 \times 10^{-6}$	0,728
100	$14,60 \times 10^{-6}$	0,961
120	$17,52 \times 10^{-6}$	1,132
140	$20,44 \times 10^{-6}$	1,208
160	$23,36 \times 10^{-6}$	1,443
180	$26,28 \times 10^{-6}$	1,536
200	$29,20 \times 10^{-6}$	1,616

Medición de densidad óptica a 340 nm

El nivel de proteólisis de los testigos podemos visualizarlos en la Tabla XIX. Se observa que a pesar de tener leche estéril sin inocular igual se registra actividad proteolítica, detectándose un leve incremento de la misma con el paso del tiempo.

Tabla XIX

Medición de actividad proteolítica en leche UHT descremada estéril sin
inocular

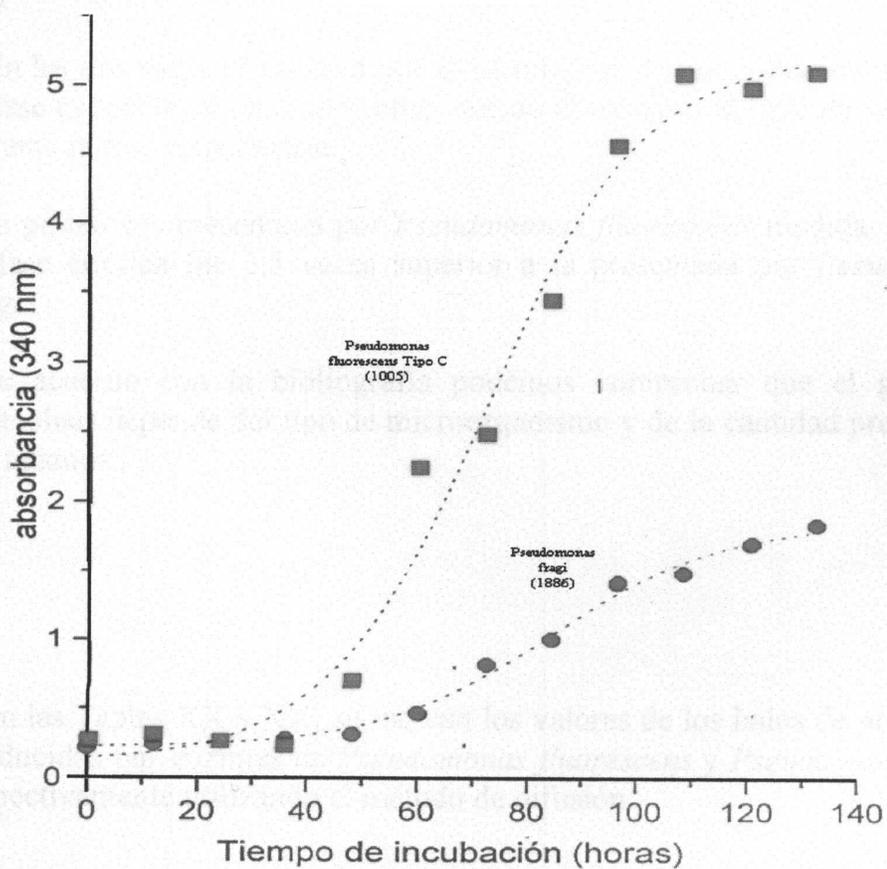
Tiempo (hs)	Densidad óptica (absorbancia)
0	0,277
12	0,308
60	0,313
84	0,314
132	0,315

Podríamos decir que dicha actividad se debe a la presencia de enzimas endocelulares naturales de la leche, a enzimas exocelulares termoestables presentes en la leche al momento de la esterilización y al efecto mecánico de la agitación presente durante todo el experimento.

La proteólisis causada por enzimas exocelulares de *Pseudomonas* en leche UHT descremada, se observa en el gráfico 2. Podemos observar que *Pseudomonas fluorescens* presenta mayor proteólisis que *Pseudomonas fragi*. En concordancia con la bibliografía podemos decir que la proteólisis depende del tipo de microorganismo. También se observa que al aumentar el número de microorganismos el nivel de proteólisis aumenta.

En el caso de *Pseudomonas fluorescens* después de las 24 horas se detecta un incremento en la proteólisis, coincidiendo este hecho con una población microbiana superior a 10^6 UFC/ml; estos datos concuerdan con la bibliografía (Cousin Mart, 1977, Grieve Kitchen, 1985), que indican que la proteólisis comienza a ser detectada al superar el recuento de microorganismos psicrótrofos los 10^6 UFC/ml.

Gráfica 2
Protéolisis en dos cepas de
Pseudomonas en cinética de crecimiento



En el caso de *Pseudomonas fragi* la degradación es apreciable antes de las 24 horas cuando la cantidad de bacterias no llegan a las indicadas en la bibliografía. Esto indicaría que a pesar de su menor capacidad de crecimiento presenta una mayor capacidad degradativa de la proteína dentro de las primeras 24 horas del experimento. Luego de estas primeras 24 horas *Pseudomonas fluorescens* presenta las mayores tasas absolutas y relativas de proteólisis .

En los dos casos se observa que el incremento de proteólisis coincide con la fase exponencial de crecimiento, siendo el máximo al final de esta fase y durante la fase estacionaria.

La proteólisis presentada por *Pseudomonas fluorescens* medida antes de la fase crítica fue 3.5 veces superior a la presentada por *Pseudomonas fragi* .

De acuerdo con la bibliografía podemos comprobar que el grado de proteólisis depende del tipo de microorganismo y de la cantidad presente de los mismos .

En las Tablas XX y XXI se indican los valores de los halos de proteólisis producidas por enzimas de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas fragi* respectivamente utilizando el método de difusión.

Tabla XX

Medida de proteólisis en agar leche causada por enzimas de *Pseudomonas fluorescens* utilizando el método de difusión

Repeticiones	Diámetro de halo (mm)	
	24 hs	48 hs
R ₁	8	10
R ₂	9	10
R ₃	8	12
R ₄	8	11
R ₅	9	11
R ₆	9	12
X	8,5	11

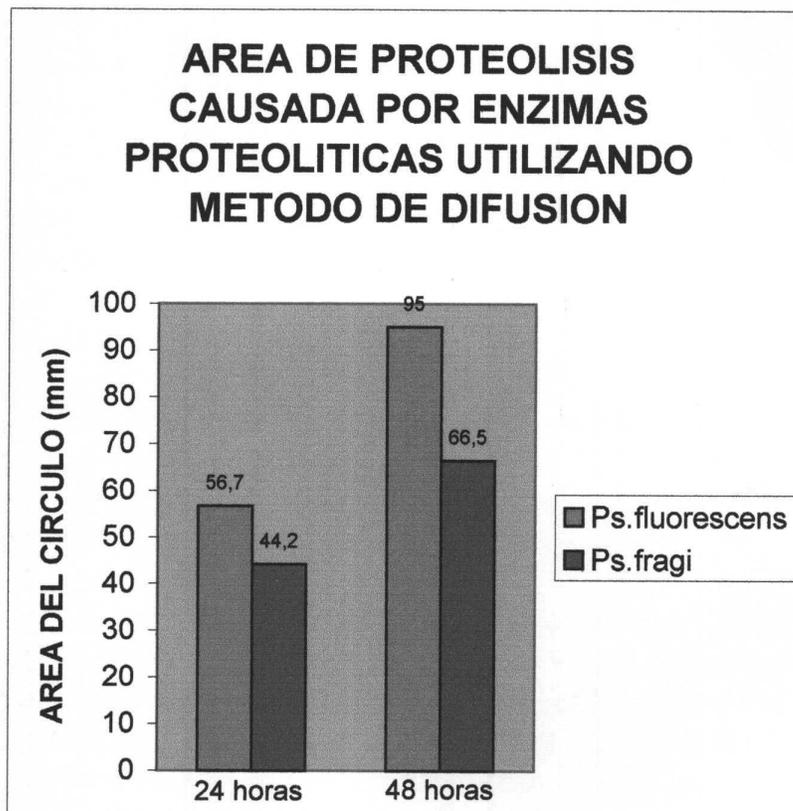
Tabla XXI

Medida de proteólisis en agar leche causada por enzimas de *Pseudomonas fragi* utilizando el método de difusión

Repeticiones	Diámetro de halo (mm)	
	24 hs	48 hs
R ₁	8	10
R ₂	8	9
R ₃	8	9
R ₄	7	9
R ₅	7	9
R ₆	7	9
X	7,5	9,2

con respecto a la detectada a las 24 horas en el caso de *Pseudomonas fluorescens*, y de 50,4% en el caso de *Pseudomonas fragi*.

Podemos observar que la capacidad degradativa que presentan las enzimas de *Pseudomonas fluorescens* es superior al que presentan las enzimas de *Pseudomonas fragi*.



En la gráfica 3 se observa la superficie de los halos de difusión (mm^2) producidas por enzimas de *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas fragi*.

A las 48 horas la proteólisis causada por las enzimas de la cepa 1005 (*Pseudomonas fluorescens*) es 42,8% superior que la causada por la cepa 1886 (*Pseudomonas fragi*). Puede observarse que a las 48 horas seguía el proceso de proteólisis, detectándose un incremento de 67,5% a las 48 horas

con respecto a la detectada a las 24 horas en el caso de *Pseudomonas fluorescens*, y de 50,4% en el caso de *Pseudomonas fragi*.

En este experimento se determinó que el método de difusión es muy sencillo, y detecta bien la proteólisis aunque dadas las características del mismo no pudo detectarse su exactitud.

V. CONCLUSIONES

Las actuales condiciones en que se realiza la explotación lechera han propiciado de manera importante el desarrollo de una flora microbiana psicrótrófa que encuentra las condiciones ideales para crecer y multiplicarse en condiciones de refrigeración y almacenamiento.

Si bien esta flora es mayormente inocua para la salud humana y casi desaparece durante el proceso de pasteurización presenta el problema cada vez más importante de que sus enzimas (exocelulares proteolíticas resistentes a la pasteurización y en algunos casos procesos más severos como ultra alta temperatura y esterilización) siguen actuando luego de la muerte de los microorganismos que le dieron origen, afectando la cantidad y la calidad de los componentes de la leche fundamentalmente grasa y proteína.

Es de destacarse la importancia dentro de estos psicrótrofos del género *Pseudomonas* especies *fluorescens* y *fragi*. Dado que dichos microorganismos se encuentran en aire, tierra y agua se puede concluir que a nivel de tambo es un inóculo muy común.

El experimento se realizó bajo condiciones de temperaturas de 7°C, encontrándose que en estas condiciones los tiempos de generación de las dos cepas en estudio son muy bajos, pudiendo inferir así que en condiciones de campo en las que el tanque de frío generalmente se mantiene a temperaturas superiores a los 4°C la multiplicación de dichas cepas es significativa.

Luego de las 48 horas el crecimiento de los microorganismos y la proteólisis producida por sus enzimas fue importante, por lo tanto se concluye que sería conveniente que la leche llegase a planta no más de 48 horas después de almacenada en frío.

Este trabajo permite evaluar la técnica espectrofotométrica y en especial el método OPA como herramienta fácil, clara, rápida y barata de

cuantificar el nivel de proteólisis provocado por las enzimas exocelulares de microorganismos psicrótrofos con el fin de poder tipificar los distintos tipos de leche a los efectos de poderle asignar diferentes usos.

A partir de este experimento se puede apreciar la importancia de realizar futuros trabajos que investigen la degradación no solo de la proteína sino de los demás componentes de la leche como la grasa y el azúcar. También se desprende la importancia de estudiar más detalladamente el método de difusión englobado dentro de la propia cinética de crecimiento así como también el estudio comparativo de las cinéticas de crecimiento a distintas temperaturas y con diferentes microorganismos.

Finalmente se concluye que para obtener leche de buena calidad no basta con matar los microorganismos; lo ideal es evitar que los mismos entren en contacto con la leche.

Corroborando lo citado a lo largo de la bibliografía destacar la importancia de utilizar agua de buena calidad, para el lavado y desinfección de animales, equipos y salas de ordeño; en lo posible evitar que la temperatura del tanque de frío exceda los 4°C y los almacenamientos por más de 48 horas, especialmente en el verano.

VI. RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue evaluar dos técnicas (una colorimétrica y otra de difusión) para determinar en forma rápida el nivel de proteólisis en leche causada por enzimas proteolíticas de psicrótrofos, además de realizarse las cinéticas de crecimiento correspondientes.

Las bacterias utilizadas fueron aisladas de muestras de leche provenientes de tanque de frío de veinte establecimientos lecheros ubicados en la cuenca sur. Siendo utilizado como criterio de selección la frecuencia y capacidad de proteólisis de dichas cepas.

Las cepas aisladas fueron identificadas por pruebas bioquímicas primarias y secundarias, cultivos en medios selectivos y producción de pigmentos; encontrándose que correspondían a las cepas *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas fragi*.

Luego de aisladas e identificadas se determinó la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación. La actividad proteolítica se determinó mediante la técnica OPA y por la técnica de difusión en Placa de Petri.

A través de la cinética de crecimiento pudo determinarse que *Pseudomonas fluorescens* presentó una mayor velocidad de crecimiento y un menor tiempo de generación que *Pseudomonas fragi* siendo para *Pseudomonas fluorescens* $\mu = 0.221 \text{ h}^{-1}$ y $tD = 3.14 \text{ h}$ y para *Pseudomonas fragi* $\mu = 0.169 \text{ h}^{-1}$ y $tD = 4.101 \text{ h}$.

A través de los métodos para detectar proteólisis se pudo determinar que *Pseudomonas fluorescens* presenta mayor proteólisis que *Pseudomonas fragi*.

Pudo determinarse que el nivel de proteólisis depende del tipo de microorganismos, de la cantidad de los mismos, y del tiempo.

El incremento de proteólisis coincide con la fase exponencial de crecimiento.

Tanto la técnica OPA como la técnica de difusión en placa son técnicas bastante precisas y de fácil realización.

VII. SUMMARY

The objective of this thesis was to evaluate two techniques (colorimetric and diffusion), to determine in a fast way the level of proteolysis in milk caused by proteolytic enzymes and to measure the growth kinetics.

The bacteria used were isolated from milk samples taken from cold milk tanks of twenty dairies located in the south.

The selection criterion was based on proteolysis frequency and capacity.

The isolated strains were identified by primary and secondary biochemistry tests, by selective growth mediums and pigment production. It was found that they belong to the *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas fragi* strains.

After isolation and identification, growth velocity and duplication time were determined. The proteolytic activity was determined through the OPA technique and through the diffusion technique in Petri glass.

Through the growth kinetics it was established that *Pseudomonas fluorescens* had a higher growth velocity and less generational time than the *Pseudomonas fragi*, with $\mu=0.221\text{h}^{-1}$ and $tD = 3.14$ for *Pseudomonas fluorescens* and $\mu=0.169\text{h}^{-1}$ and $tD=4.101\text{h}$ for *Pseudomonas fragi*.

Through the methods to detect proteolysis it was established that *Pseudomonas fluorescens* presents higher proteolysis than *Pseudomonas fragi*.

It was established that the level of proteolysis depends on the type of microorganisms, their quantity and the time.

The technique of OPA as well as the technique of diffusion in the plaques are techniques very precise and of easy realization.

The techniques proved to evaluate the grade of proteolysis of milk allows to establish this experiment that both were used to this purpose. While the technique of the OPA was more quicker to the determination of the grade of proteolysis.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. ALAIS, C.1985. Ciencia de la leche; principios de técnica lechera. Barcelona. Reverté. 873p.
2. AMIOT, J.1991. Ciencia y Tecnología de la leche. Principios y aplicaciones. Zaragoza. Acribia. 547p.
3. BANK, W. DALGLEISH, D.G. and ROOK, A.F. 1989. La leche y su procesado. En Microbiología Lactologica. Robinson, R.K. Zaragoza. Acribia. pp 1-32.
4. CARBALLO, A; ILUNDAIN, M; INCIARTE, J; LATASTE, J. 1999. Estudio de la contaminación microbiana en la leche en seis tambos del departamento de Flores en dos épocas del año. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay, Facultad de Agronomía. pp.52.
5. CELESTINO, E.L; IYER, M; ROGINSKI, H. 1996. The effects of refrigerated storage on the quality of raw milk. Australian Journal of Dairy Technilogy. 51(2):53-63.
6. CHRISTINA, M. COUSINS, and BRAMLEY, A. 1989. Microbiología de la leche cruda. En microbiología Lactologica. Robinson, R.K. Zaragoza. Acribia. pp 109-148.
7. CONGRESO NACIONAL DE CALIDAD DE LECHE Y MASTITIS, (1996, RIO CUARTO). 1996. UNIVERSIDAD Nacional de Río Cuarto. 1996.
8. COUSINS, C.M; BRAMLEY, A.J. 1981. Microbiología de la leche cruda. In Microbiología lactológica. Robinson, R.K. Zaragoza, Acribia. pp. 109-150.
9. GERARD, C. 1997. Congreso de calidad de leche. 45(2):172-207.

10. GILMOUR, A and ROWE, M. 1987. Microorganismos asociados a la leche. En *Microbiología Lactológica*. Robinson, R.K. Zaragoza. Acribia. pp 33-67.
11. HARWALKAR, V.R; CHOLETTE, H; MCKELLAR, R.C; EMMONS, D.B. 1993. Relation Between Proteolysis and Astringent off Flavor in Milk. *Journal Dairy Sci.* 76:2521-2527.
12. KEATING, P.F; GAONA RODRIGUEZ, H. 1986. Introducción a la lactología. Mexico, D.F. Limusa. pp 32-33.
13. LUQUET, F. M. 1991. Laites et produits laitiers. Les laits de la mamelle a la laiterie. Paris, Tec.Doc. 397p.
14. MARTÍNEZ PENAGOS, A; EZQUERRA PLACENCIA, R; GARCÍA ALVAREZ, J.A; RODRIGUEZ LOPERENA; M.A. 1993. Influencia de la proteólisis de la leche en los métodos de detección de suero de quesería. *Alimentaria.* 47:47-50.
15. MEYER, R. 1990. Elaboración de productos lácteos. Manual para educación agropecuaria. Industrias rurales. 2^{da}. Ed. Mexico. Trillas. pp 14-23.
16. MOTTAR, J. F. 1989. Effects on the quality of dairy products. In *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. Mc. Kellar; R. Florida, CRC Pres. pp227-243.
17. MUIR, D. D. 1996. The shelf – life of dairy products: 2. Raw milk and fresh products. *Journal of the Society of dairy Technology.* 49: 2,44-48;
18. PICARD, C; PLARD, I; COLLIN, J. C. 1996. Application of the inhibition ELISA method to the study of proteolysis caused by heat – resistant *Pseudomonas* proteinases specific towards kappa – casein in heated milk. *Milchwissenschaft* 51:8, 438-442; 27 ref.

19. RASBANI, ETCHEVERRY, J. C. 1997. Seminario reegional de calidad de leche. Montevideo. 248p.
20. REVILLA, A. R. 1969. Tecnología de la Leche. Procesamiento, manufactura y análisis. Centro Regional de Ayuda Técnica. 2^{da} ed. Mexico. Agencia para el desarrollo internacional. pp. 11-41.
21. ROBINSON, R. K. 1987. Microbiología lactológica. Microbiología de la leche. Zaragoza, Acribia. 230p.
22. SORHAUG, T. STEPANIAK, L. 1997. Psychrotrophs and Their Enzymes in milk and dairy Products. Quality Aspects. Trends in food Science & Technology. 8(2): 35-41.
23. STEPANIAK, L. And SORHAUG, T. 1989. Biochemical Classification. In Enzymes of psychrotrophs in raw food. Mc Kellar;R. Florida, CRC Pres. pp 36-50.
24. STEPHEN, J; COLLINS, B; MC GILL, A. 1993. Influence of Psychrotrophic Bacterial Growth in Raw Milk on the Sensory Acceptance of UHT. Skim Milk. Journal of Food Protection. 56(5): 418-425.
25. SUHREN, G. 1989. Producer microorganisms. In Enzymes of psychrotrophs in raw food. Mc Kellar;R. Florida, CRC Pres. pp3-34.
26. TATINI, S.R; MEKALA, P; EL, HABAZ, A; GRIFFITHS, M.W. 1991. Rapid Detection of Psychrotrophic Bacteria. In Manufacturing Grade Raw milks. Journal of Food Protection. 54(11): 861-867.
27. VARNAN, A.H; SUTHERLAND, J. 1995. Leche y Productos lácteos. Tecnología, química y microbiología. Serie Alimentos básicos 1. Zaragoza. Acribia. pp. 34-43,93-105.

28. VEISSEYRE, R. 1980. Lactología técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche. 2^{da} ed. Zaragoza. Acribia. 629p.
29. ZALAZAR, C; PALMA, S; CONDIOTI, M. 1996. Increase of free sialic acid and gelation in UHT milk. Australian Journal of Dairy Technology. 51(1): 22-23.
30. ZALL, R. 1987. Control y destrucción de los microorganismos. En Microbiología Lactológica. Robinson, R.K. Zaragoza. Acribia. pp 71-107.