



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN DEL DETERIORO PROTEICO
POR PSICRÓTROFOS EN LECHE OVINA Y CAPRINA
EN TANQUE DE FRIO

FACULTAD DE AGRONOMIA

por



Pablo Nicolás CARABALLO MAZZUCHELLI
Guillermo Federico DOUGLAS FULLE

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

MONTEVIDEO
URUGUAY
2002

Tesis aprobada por:

Directores:

Dra. Stella REGINENSI

Ing. Agr. Jorge BERMUDEZ

Ing. Agr. Andrés GANZABAL

Fecha: 28 /10 / 2002

Autores:

Pablo CARABALLO MAZZUCHELLI

Guillermo DOUGLAS FULLE

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración y dedicación prestada en la realización de esta tesis a la Dra. Stella Reginensi y al Ing. Agr. Jorge Bermúdez

Al Ing. Agr. Andrés Ganzabal por haber permitido la realización de la etapa de campo en el tambo de la estación experimental INIA Las Brujas.

A la Sra. Teresa Tombolini por su colaboración y su buena disposición durante el trabajo de laboratorio.

A Juan Pablo Damián por el apoyo recibido en los análisis de electroforesis.

Al personal del tambo del INIA por su colaboración.

A nuestros familiares y amigos por su apoyo durante estos años de estudio.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	2
2.1 <u>CARACTERÍSTICAS DE LA LECHE DE OVEJA</u>	3
2.1.1 <u>Compuestos nitrogenados</u>	3
2.1.1.1 <u>Proteína</u>	3
2.1.1.2 <u>Caseínas</u>	3
2.1.1.3 <u>Proteínas del suero</u>	4
2.1.2 <u>Grasa</u>	4
2.2 <u>CARACTERÍSTICAS DE LA LECHE DE CABRA</u>	5
2.2.1 <u>Compuestos nitrogenados</u>	6
2.2.1.1 <u>Proteína</u>	6
2.2.1.2 <u>Caseínas</u>	6
2.2.1.3 <u>Proteínas del suero</u>	7
2.2.2 <u>Grasa</u>	8
2.3 <u>ENZIMAS EN LECHE DE OVEJA Y CABRA</u>	9
2.3.1 <u>Mecanismos antimicrobianos inespecíficos</u>	9
2.4 <u>PROPIEDADES PARA LECHE DE CABRA Y OVEJA</u>	10
2.4.1 <u>Propiedades organolépticas</u>	10
2.4.2 <u>Propiedades de coagulación</u>	10
2.5 <u>MICROFLORA DE LA LECHE CRUDA</u>	11
2.6 <u>MICROORGANISMOS PRESENTE EN LA LECHE CRUDA</u>	12
2.6.1 <u>Microorganismos mesófilos</u>	12
2.6.2 <u>Microorganismos termodúricos</u>	13
2.6.3 <u>Microorganismos psicrótrofos</u>	14
2.6.3.1 <u>Aspectos taxonómicos</u>	14
2.6.3.2 <u>Temperatura de crecimiento</u>	16
2.7 <u>FUENTE DE CONTAMINACIÓN MICROBIANA DE LA LECHE EN SU PRODUCCIÓN</u>	17

2.7.1	<u>Contaminación del interior de la glándula mamaria</u>	17
2.7.2	<u>Contaminación de la leche en el exterior de la mama</u>	17
2.7.2.1	Contaminación proveniente de la máquina de ordeño	18
2.7.2.2	Contaminación proveniente del tanque de frío	18
2.7.2.3	Contaminación proveniente del ordeñador	19
2.7.2.4	Contaminación proveniente del agua	20
2.7.2.5	Contaminación proveniente del ambiente	20
2.8	EFFECTO DE LA ESTACIÓN CON RESPECTO AL TIPO DE MICROORGANISMO PRESENTE EN LA LECHE.	21
2.9	ALMACENAJE EN FRÍO	22
2.9.1	<u>Efecto del almacenaje en frío en las propiedades fisicoquímicas</u>	23
2.9.2	<u>Efecto del almacenaje en frío sobre la flora microbiana</u>	24
2.9.3	<u>Cambios bioquímicos causados por los psicrótrofos</u>	25
2.9.3.1	Degradación de proteínas	26
2.9.3.2	Efecto de la degradación en la micela de caseína	28
3.	<u>OBJETIVOS</u>	30
3.1	OBJETIVO GENERAL	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4.	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	31
4.1	PERIODO Y FRECUENCIA DE MUESTREO	31
4.1.1	<u>Toma de muestras</u>	31
4.2	ESTUDIO MICROBIOLÓGICO	31
4.2.1	<u>Análisis microbiológico</u>	31
4.2.2	<u>Aislamiento e identificación</u>	32
4.3	ELECTROFORESIS EN GEL	34
5.	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	36
5.1	ANÁLISIS DEL CONTEO BACTERIANO	36
5.2	ANÁLISIS DE LOS CONTEOS DURANTE LA LACTANCIA	41
5.1.1	<u>Géneros de bacterias psicrótrofas de leche ovina y caprina refrigerada</u>	45
5.2	DEGRADACIÓN DE CASEÍNAS	45
6.	<u>CONCLUSIONES</u>	50
7.	<u>RESUMEN</u>	53
8.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	54

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla N°	Página
1. Composición promedio de leche de oveja, cabra y vaca	2
2. Tipo de microorganismos mesófilos aerobios.	13
3. Microorganismos termodúricos de la leche cruda fresca.	14
4. Bacterias psicrótrofas Gram negativas aisladas de leche y productos lácteos.	15
5. Bacterias psicrótrofas Gram positivas aisladas de leche y productos lácteos.	16
6. Bacterias productoras de proteinasas termorresistentes.	28
Figura N°	Página
1. Diagrama del procedimiento para el análisis de las muestras	33
2. Conteo de mesófilos totales viables en leche ovina almacenada en tanque de frío.	37
3. Conteo de mesófilos totales viables en leche caprina almacenada en tanque de frío.	39
4. Conteo de psicrótrofos en leche ovina almacenada en tanque de frío.	40
5. Conteo de psicrótrofos en leche caprina almacenada en tanque de frío.	41
6. Promedio de conteos durante la lactancia de mesófilos totales en leche caprina.	42
7. Promedio de conteos durante la lactancia de mesófilos totales en leche ovina.	43
8. Promedio de conteos durante la lactancia de psicrótrofos en leche caprina.	44
9. Promedio de conteos durante la lactancia de psicrótrofos en leche ovina.	44
10. Estudio de deterioro de caseínas por electroforesis en leche ovina y caprina durante 4 días de almacenaje en el tanque de frío a lo largo de la lactancia.	46

1. INTRODUCCIÓN

La conservación de la leche bajo condiciones de frío (4 °C) es una práctica difundida en bovinos lecheros, cuyo objetivo principal es el control del crecimiento de microorganismos mesófilos y la reducción de los costos de transporte.

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

El mantenimiento por períodos prolongados de la leche en el tambo requiere necesariamente del equipamiento y se considera necesario conocer como responde la leche de ambas especies en relación con el crecimiento bacteriano y el consecuente deterioro de la leche. Es conocido que las caseínas, particularmente las β -caseínas, tienen diferente comportamiento en leche de vaca, cabra y oveja en relación a la sensibilidad a la temperatura de almacenaje. Asimismo la resistencia natural al crecimiento microbiano puede ser diferente en la leche de las especies mencionadas anteriormente. En este trabajo se pretende dilucidar el crecimiento microbiano en leche de cabra y oveja en tanque de frío durante 96 hs. y el deterioro de las distintas fracciones de caseínas durante dicho período.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En la tabla 1 se puede apreciar la diferencia en cuanto a su composición en los diferentes tipos de leche. Se ve que la leche de oveja presenta los niveles más altos en sólidos totales comparado con los otros dos tipos de leches.

Tabla 1 Composición promedio de leche de oveja, cabra y vaca:

Componentes	Oveja (%)	Cabra (%)	Vaca (%)
Grasa	7.1	4.1	3.8
Proteína	5.8	3.4	3.3
Caseína	4.6	2.7	2.6
Lactosa	4.6	4.6	4.7
Cenizas	0.92	0.80	0.72
Sólidos Totales	18.42	12.90	12.52

(Alichanidis y Polychroniadou, 1996.)

En leche de oveja se evidencia un nivel más alto en grasa con respecto a la leche de cabra o vaca y en el nitrógeno total. Mientras que la lactosa se presenta en iguales o inferiores tenores con respecto a la leche de vaca (Assenat, 1991).

Además de las diferencias en cuanto a composición entre leches de distintas especies, también existen variaciones dentro de la misma especie debido a las diferencias existentes entre países (sistema de producción), manejo, raza, diferencias individuales, etapa de lactación, edad, estado sanitario, etc.

2.1 CARACTERISTICAS DE LA LECHE DE OVEJA

2.1.1 Compuestos nitrogenados

2.1.1.1 Proteína

La relación entre el contenido de proteínas y de los componentes nitrogenados es elevada, en torno al 95 %, valor similar al que presenta la leche de vaca. Por el contrario difiere de la leche de cabra que tiene un contenido relativamente más alto de nitrógeno no proteico (Mahieu et al., 1977 citado por Assenat, 1991).

La similitud entre los distintos tipos de proteína de las diferentes especies (cabra, vaca y oveja) es mayor en la fracción soluble, mientras que en el grupo de las caseínas es menor. El grado de similitud entre las distintas fracciones de proteínas se corresponde con el siguiente orden: β -lactoglobulina > α -lactoalbumina > α_{s1} -caseína > α_{s2} -caseína > β -caseína > κ -caseína. Las diferencias entre la κ -caseína están localizadas principalmente en la parte terminal de la proteína, en el caseino-macropéptido. Mientras que la región que incluye el enlace 105-106 sensible a la acción de la quimosina es similar en estas 3 especies (Alichanidis y Polychroniadou, 1996).

2.1.1.2 Caseínas

Estas representan alrededor del 82 – 83% del contenido de proteínas totales (Brochet, 1982 citado por Assenat, 1991). El porcentaje de caseínas α_{s1} y α_{s2} es claramente más elevado en la leche de oveja que en la leche de cabra: 30,2% frente al 12,6%, pero significativamente más bajo que en la leche de vaca, en el que representa el 45,5%. Las β -caseínas representan en la leche de oveja alrededor de la mitad, mientras que constituyen los 2/3 en la leche de cabra y 1/3 en leche de vaca (Assenat, 1991).

La micela de caseína de leche ovina es más rica en calcio con respecto a la caseína bovina, 37 mg Ca coloidal/g caseína y 28,9 mg respectivamente (Alichanidis y Polychroniadou, 1996).

2.1.1.3 Proteínas del suero

Las proteínas solubles son: β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, albúmina sérica, inmunoglobulinas y la fracción proteosomas-peptona. Estas proteínas permanecen solubles en el suero, tanto si la leche se coagula por acidificación a pH 4,6 como si se ha hecho por vía enzimática (Goursaud, 1991).

En comparación con las caseínas, la influencia que tienen las seroproteínas sobre las propiedades fisicoquímicas de la leche cruda es muy baja pero durante el tratamiento térmico adquieren gran importancia y, desde un punto de vista comercial, la importancia de estas proteínas, en el suero, va en aumento (Banks et al., 1989).

Esta fracción de la leche representa el 17,6% del total de las proteínas (Brochet, 1982 citado por Assenat, 1991), porcentaje muy semejante al de la leche de vaca en el que representan el 17% según Alais (1975) citado por Assenat (1991).

Dentro de este grupo la β -lactoglobulina es la proteína mayoritaria (51,4%). En cuanto al grupo de las albúminas (β -lactoglobulina, α -lactalbumina y albúmina sérica), representa el 76,5% del contenido total de proteínas solubles, similar a los valores presentados para leche de vaca (Assenat, 1991). El porcentaje restante está compuesto por globulinas y proteosomas-peptonas.

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

2.1.2 Grasa

El diámetro medio de los glóbulos grasos es de 3,30 micras en leche de oveja y de 4,55 en la leche de vaca (Parkash et al., 1968 citado por Assenat, 1991). Según Alichanidis y Polychroniadou (1996) la leche ovina contiene mayor proporción de glóbulos grasos de menor tamaño, con un

valor promedio de 3,99 micras. Solo el 2,4% de los glóbulos grasos de esta leche tienen diámetros superiores a 6 micras, mientras que para la leche de vaca esta fracción representa el 17,3%.

El color de la grasa de la leche de oveja es netamente blanco debido a la ausencia de carotenos (Laxminarayona et al., 1968 citado por Assenat, 1991).

Los triglicéridos representan en promedio el 98% del total de los lípidos (Assenat, 1991).

Los lípidos de la leche de oveja se caracterizan por su elevado contenido en ácidos grasos saturados de 6 a 12 átomos de carbonos. Los ácidos cáprico y caprílico representan del 6 al 15% de los ácidos grasos totales frente al 3 al 5% en la leche de vaca (Assenat, 1991).

El contenido de ácidos grasos de 6 a 12 átomos de carbono es una de las determinantes del olor y gusto característico de este tipo de leche.

En la leche de oveja existen menos triglicéridos de cadena larga y más de cadena corta comparado con la leche de vaca (Assenat, 1991).

2.2 CARACTERÍSTICAS DE LA LECHE DE CABRA

La composición química de esta leche presenta un alto rango de variación en cuanto a sus diferentes componentes: grasa de 2,3 a 6,9%, con un promedio de 3.3% (Juárez, 1986 citado por Haenlein, 1996); proteína de 2,2 a 5,1% y como valor promedio 3.4% (Haenlein, 1996). Sin embargo según Le Mens (1991) la leche de cabra presenta valores menores en cuanto a proteína con respecto a la leche de vaca, 2,82% frente a 3,11%.

Además de las diferencias en cuanto a los tenores promedios de los distintos componentes, también existen un polimorfismo genético de las proteínas de la leche, la cual tiene importancias comerciales en la elaboración de los diferentes productos (por ej: rendimiento y sabor en quesos). (Remeuf y Lenoir, 1986 citado por Haenlein, 1996). Dicho

polimorfismo tiene un potencial para la nutrición humana el cual aun no se ha explotado por no conocerse bien todas sus posibles aplicaciones (Haenlein, 1991 citado por Haenlein, 1996).

2.2.1 Compuestos nitrogenados

2.2.1.1 Proteína

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

2.2.1.2 Caseínas

Del contenido de proteína total, en promedio el 78% esta compuesto por caseínas, con un rango de 55 a 86% (Renner, 1982 citado por Haenlein, 1992). Según Parkash y Jenness (1968) citado por Bonassi et al. (1996) afirman que el contenido de caseína representa cerca de 70 al 74% de la materia nitrogenada de la leche de cabra, para leche de vaca este valor oscila entre 76 a 79% (Jenness 1980) razón por la cual la leche caprina presenta un rendimiento en queso ligeramente menor que la leche de vaca (Le Mens, 1991). Según Bonassi et al. (1996) la caseína representa el 71,8% (61,54 a 80,71%) de la materia nitrogenada total de la leche de cabra.

Existen 4 grupos de caseínas: α_{s1} ; α_{s2} ; β y κ . Para el primer grupo (α_{s1}) hay tipos genéticos que carecen de dicha fracción, otros presentan niveles bajos o intermedios y otros con altos tenores de α_{s1} . Estas variaciones se observan tanto en animales de distintas razas y también existen diferencias individuales dentro de una misma raza. Estas diferencias en cuanto al contenido de α_{s1} tienen consecuencias nutricionales y en la industrialización de esta leche (Haenlein, 1996). Con respecto a la β caseína, esta es cuantitativamente el mayor componente proteico en la leche de cabra. Richardson y Creamer citado por Jenness (1980) aislaron 2 tipos

de β -caseína, las cuales tienen idéntica composición de aminoácidos, pero difieren solamente en el número de los grupos fosfato.

El tamaño de las micelas es diferente al de la leche de vaca, ya que son o bien más grandes, con un diámetro superior a 200 nm o más pequeñas con un diámetro inferior a 80 nm, pero el tamaño medio de las micelas es inferior a la leche de vaca (Le Mens, 1991). Sin embargo según Alichanidis y Polychroniadou (1996) la leche caprina y ovina tienen una micela de mayor tamaño con respecto a la de la leche de vaca (255 y 193 nm respectivamente, y 175 nm para la leche de vaca) pero la variación en el tamaño de la micela, es mayor en leche caprina y menor en leche ovina.

La caseína de la leche cabra presenta menor capacidad de sedimentación por centrifugado que leche de vaca, teniendo en cuenta la proporción de pequeñas micelas es mayor que en la leche de vaca. La leche de cabra forma un coágulo más suave y quebradizo cuando se acidifica, que puede ser debido a la deficiencia de α_{s1} . Los coágulos menores y más quebradizos son más rápidamente atacados por las proteasas estomacales facilitando la digestión (Jenness, 1980 citado por Bonassi, 1996).

La micela de caseína caprina es más rica en calcio con respecto a la caseína bovina, 36 mg Ca coloidal/g caseína y 28,9 mg respectivamente (Alichanidis y Polychroniadou, 1996).

2.2.1.3 Proteínas del suero

Según Le Mens (1991) estas representan el 20,4% del nitrógeno, similar a los tenores que presenta la leche de vaca, con distinta distribución de cada uno de sus fracciones. Esta fracción está compuesta por: β -lactoglobulina, globulinas, α -lactoalbumina, albúmina sérica, inmunoglobulinas y la fracción proteosa-peptona. Esta leche contiene más β -lactoglobulina y menos α -lactoalbumina comparado con leche de vaca (Alichanidis y Polychroniadou, 1996).

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

2.2.2 Grasa

Según Fahmi et al. (1956) citado por Le Mens (1991) los glóbulos grasos se caracterizan por la abundancia de los de tamaño muy pequeño. Un 65% tienen un diámetro inferior a 3 micras frente a un 43% en la leche de vaca, y un diámetro medio muy próximo al de la leche de oveja, de 3,5 micras y de 3,3 micras respectivamente.

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

La grasa de la leche esta compuesta en casi su totalidad por triglicéridos. Los mono y di-glicéridos son poco frecuentes en este tipo de leche. En cuanto a la cantidad, los ácidos grasos de 4 a 12 átomos de carbono representan un 20% frente al 14% en la leche de vaca. Pero la mayor diferencia con respecto a la leche de vaca se encuentra esencialmente en los ácidos grasos de 8, 10 y 12 carbonos (Le Mens, 1991). Según Furtado y Wolfschoon-Pombo (1978) la grasa de la leche de cabra presenta desde el punto de vista bioquímico una importante diferencia en relación a la leche de vaca: presenta cerca de 18% de ácidos grasos de cadena corta, el doble de la cantidad que tiene la leche de vaca, siendo esos ácidos representados sobre todo por los ácidos caproico, caprilico y caprico. Esto explica las diferencias en sabor entre ambas leches y quesos. La cantidad y composición de esta fracción depende de la alimentación, estación, etapa de lactación y del origen de estos ácidos. Los ácidos grasos C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 aumentan su proporción en el verano, mientras que los ácidos de C4 a 16 carbonos se reducen significativamente (Haenlein, 1996).

2.3 ENZIMAS EN LECHE DE OVEJA Y CABRA

La actividad de la xantina oxidasa que se encuentra adsorbida en la membrana de los glóbulos grasos y la lisozima que se encuentra en el suero, en oveja y cabra es menor que en la leche de vaca. Sin embargo la fosfatasa alcalina que se encuentra adsorbida en la membrana de los glóbulos grasos, presenta mayores niveles de actividad en leche de oveja y cabra comparado con leche de vaca (Alichanidis y Polychroniadou, 1996).

2.3.1 Mecanismos antimicrobianos inespecíficos

La lactoferrina ovina y caprina es similar a la presente en la leche de vaca (Alichanidis y Polychroniadou, 1996). Su función es inhibir la multiplicación de las bacterias al privarlas del hierro y puede proteger a la ubre "seca" de la infección por *E. Coli* (Reiter y Bramley citado por Cousins y Bramley, 1987).

Los niveles de lactoperoxidasa encontrados en leche de cabra son mayores a los reportados en leche de vaca y ovina pero, sin embargo el nivel de actividad del sistema lactoperoxidasa es más alto en leche de oveja (Alichanidis y Polychroniadou, 1996). Este sistema tiene un efecto bacteriostático sobre bacterias Gram positivas y bactericida sobre las bacterias Gram negativas, incluyendo a los psicrótrofos (Alais, 1985). La activación del sistema depende de la concentración de dos reactivos, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y tiocianato (SCN^-). En particular el sistema lactoperoxidasa tiene la habilidad de catalizar la oxidación del SCN^- con el H_2O_2 produciendo hipotiocianato ($OSCN^-$) y otros productos intermedios. Estos compuestos tienen la habilidad de reducir el crecimiento bacteriano por medio de un daño en la membrana celular e inhibiendo la actividad de algunas enzimas citoplasmáticas (Haddadin et al., 1996).

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

2.4 PROPIEDADES PARA LECHE DE CABRA Y OVEJA

2.4.1 Propiedades organolépticas

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

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

La leche de oveja tiene un rico sabor y un aroma especial relacionado con su composición de ácidos grasos. Este aroma es menos pronunciado si esta leche se mantiene bajo buenas condiciones.

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

2.4.2 Propiedades de coagulación

La leche de oveja es muy sensible al cuajo, debido a su alta relación entre β/α_s -caseínas con respecto a la leche de vaca. La leche ovina requiere menos cuajo respecto a la leche de vaca para obtener el mismo tiempo de coagulación y no requiere de la adición de CaCl_2 . La tasa de formación de la cuajada es también mayor con respecto a la leche de vaca, pero presenta un período de sinéresis más largo. Esta diferencia puede ser explicada por un mayor contenido de caseína y calcio coloidal de la leche ovina. La cuajada obtenida a partir de la leche ovina drena menos con respecto a la leche bovina debido a su mayor contenido de sólidos totales, caseína y grasa (Alichanidis y Polychroniadou, 1996).

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

2.5 MICROFLORA DE LA LECHE CRUDA

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

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

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

En leche ovina el crecimiento microbiano es retardado debido una alta actividad inmunológica y un alto poder buffer (Alichanidis y Polychroniadou, 1996). Dicha leche presenta una resistencia al desarrollo de bacterias durante las primeras horas debido a la actividad inmunológica, y un mayor contenido de minerales (el doble) con respecto a la leche de vaca lo cual le da un mayor poder tampón (Assenat, 1991).

2.6 MICROORGANISMOS PRESENTE EN LA LECHE CRUDA

Según Gounot (1986) y Silva (1991) citado por Silveira et al. (1998) observaron que los microorganismos que normalmente contaminan la leche crecen en un amplio rango de temperatura. Estos se dividen en tres grupos: mesófilos, termófilos y psicrótrofos. Los mesófilos constituyen un grupo importante por incluir la mayoría de los microorganismos acidificantes, y por desarrollarse a temperaturas entre 20 a 45 °C, con una temperatura óptima alrededor de 30 a 40 °C (Jay, 1994 citado por Silveira et al., 1998). Las bacterias termófilas tienen un óptimo de crecimiento entre 55 a 65 °C, y pueden llegar a crecer dentro del rango que va desde 35 a 75 – 90 °C (ICMSF, 1980 citado por Silveira et al., 1998). Los psicrótrofos son definidos por Collins (1981) citado por Silveira et al. (1998) de acuerdo a las normas de la International Dairy Federation, como aquellos microorganismos capaces de crecer a temperaturas menores a 7 °C, independientemente de cual fuere su temperatura óptima de crecimiento.

2.6.1 Microorganismos mesófilos

En la tabla 2 se mencionan los géneros mesófilos aerobios más frecuentemente identificados en la leche cruda.

Tabla 2. Tipo de microorganismos mesófilos aerobios.

Micrococcos	Estreptococos	Bacilos Gram + no esporulados	Esporulados	Bacilos Gram -	Misceláneos
<i>Micrococcus</i> <i>Staphylococcus</i>	<i>Enterococcus</i> (fecales) Grupo N Estreptococos de la mastitis <i>Str. agalactiae</i> <i>Str. dysgalactiae</i> <i>Str. uberis</i>	<i>Microbacterium</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Arthrobacter</i> <i>Kurthia</i>	<i>Bacillus</i> (espo- ros o formas vegetativas)	<i>Pseudomonas</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Flavobacterium</i> <i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Aerobacter</i> <i>Escherichia</i> <i>Serratia</i> <i>Alcaligenes</i>	Estreptomicetos Levaduras Mohos

(Cousins y Bramley, 1987)

2.6.2 Microorganismos termodúricos

En la tabla 3 se presentan los géneros que sobreviven a la pasteurización efectuada en el laboratorio (tratamiento térmico de 63 °C durante 30 minutos). La supervivencia a la pasteurización puede ser de un 100% en el caso de *Microbacterium lacticum* y esporulados, mientras que los otros géneros muestran una supervivencia menor a un 10%. La mayoría de estos géneros no se multiplican en forma apreciable en la leche a temperatura ambiente o en el tanque de frío, por lo que los conteos pueden ser usados como un índice del control de la calidad higiénica de la leche (Hull et al., 1992 citado por Bermúdez y Reginensi, 2001). Sutherland (1993) citado por Silveira et al. (1998) demostró que *B. cereus* es la bacteria esporogénica más importante en la alteración de la leche pasteurizada, almacenada a temperaturas de 6 a 20 °C. *B. cereus* es capaz de crecer en la faja psicotrófica siendo responsable de enfermedades de origen alimentario (Sutherland y Limond, 1993 citado por Silveira et al., 1998).

Investigadores australianos determinaron que *B. circulans* fue la única especie aislada en leche pasteurizada almacenada a 3 °C durante 8 semanas. Mientras que *B. circulans* y *B. cereus* se encontraron en muestras almacenadas durante 10 días a 12 °C. Estas especies fueron también las únicas aisladas de productos lácteos comerciales. *B. cereus* no apareció en las muestras a la temperatura correcta (3 °C), lo que es importante ya que se trata de una especie que puede deteriorar la leche (Cromie, 1994).

Tabla 3. Microorganismos termodúricos de la leche cruda fresca.

Géneros Termodúricos
<i>Microbacterium</i>
<i>Micrococcus</i>
Esporos de <i>Bacillus</i>
Esporos de <i>Clostridium</i>
<i>Alcaligenes</i>
<i>Streptococcus</i>

(Cousins y Bramley, 1987)

2.6.3 Microorganismos psicrótrofos

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

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

2.6.3.1 Aspectos taxonómicos

Los psicrótrofos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, no constituyen un grupo taxonómico específico de microorganismos. Los principales géneros de bacterias psicrótrofas aisladas en la leche y sus subproductos incluyen bacterias Gram negativas y/o Gram positivas; bastones, cocos o vibrios; esporiformes o no esporiformes; y aerobias o anaerobias. También, existen otros microorganismos psicrótrofos (mohos y levaduras) capaces de producir defectos en productos lácteos (Cousin, 1982).

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

Tabla 4 Bacterias psicrótrofas Gram negativas aisladas de leche y productos lácteos.

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

(Cousin, 1982.)

Los psicrótrofos que con mayor frecuencia se encuentran 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 detecta *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 Cousins y Bramley, 1987).

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

Tabla 5 Bacterias psicrótrofas Gram positivas aisladas de leche y productos lácteos

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

(Cousin, 1982.)

2.6.3.2 Temperatura de crecimiento

Los psicrótrofos crecen a bajas temperaturas y a pesar de producir un mayor crecimiento a temperaturas más elevadas se caracterizan por tener una fase lag larga y una fase logarítmica corta en condiciones de

refrigeración. La fase lag es breve a la temperatura óptima de crecimiento y aumenta a medida que disminuye la temperatura. Por tanto la temperatura óptima puede ser obtenida determinando la temperatura a la cual el tiempo de generación es el más corto (Cousin, 1982). Yano et al. (1974) citado por Cousin (1982) estudio el tiempo de generación de bacterias psicrótrofas en la leche refrigerada y encontró un rango de 6,6 a 12,7 horas a 5 °C y 12,2 a 26,1 horas para una temperatura de 0 °C. Debido a esto el periodo en que la leche mantuvo una buena calidad fue de 2 a 5 días a 5°C y aproximadamente 4 a 13 días a 0 °C, estos valores fueron obtenidos en un trabajo con leche de vaca.

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

2.7.1 Contaminación del interior de la glándula mamaria

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

Según Alais (1985), se ha señalado que las leches de cabra y oveja son más frecuentemente estériles a la salida de la mama que la leche de vaca.

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

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

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

2.7.2.1 Contaminación proveniente de la máquina de ordeño

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

2.7.2.2 Contaminación proveniente del tanque de frío

En un estudio realizado por Thomas y Thomas (1976) citado por Cousin (1982), estudiaron la incidencia de la flora bacteriana en tanques de frío y encontraron una alta cantidad de bacterias Gram negativas,

especialmente en aquellos tanques que estaban mal lavados y desinfectados. Las especies *Streptococcus*, *Micrococcus* y *Corynebacterium* fueron encontradas en pequeñas cantidades y los bacilos esporiformes constituían alrededor del 10% de la población total. En varios estudios realizados se obtuvieron muestras a nivel de la superficie interior del tanque de frío (hisopado), indican que el biofilm puede ser uno de los principales focos de contaminación a atacar. El biofilm no es detectable a simple vista y esto lleva a que su control durante la limpieza sea deficiente principalmente durante los meses del invierno (Carballo et al., 1999). El biofilm se forma cuando los microorganismos forman un puente entre la superficie celular con el sustrato, mediante: fimbrias, flagelos o exopolisácaridos. La mayoría de las bacterias son capaces de sobrevivir frente a condiciones adversas ambientales, así como también pueden crecer en medios mal higienizados y desinfectados (Sasahara y Zottola, 1993). Algunos géneros atrapados en el biofilm como es el caso de *Ps. fragi* permite el crecimiento y adhesión de otros microorganismos patógenos para animales y humanos como por ejemplo *Listeria*.

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

2.7.2.3 Contaminación proveniente del ordeñador

Cuando el ordeño se realiza manualmente, es probable que las operaciones del ordeñador destinadas a la limpieza del lugar den lugar a un incremento de la contaminación aérea en el entorno de la ubre. Por otra parte el contacto de las manos puede originar una adicción de microorganismos a la leche. Los riesgos de contaminación de la leche a partir del ordeñador son mucho menores que los de las máquinas ordeñadoras (Cousins y Bramley, 1987). El personal responsable de ordeño no constituye desde el punto de vista cuantitativo una fuente importante de contaminación de la leche. Sin embargo, cualitativamente esta posibilidad de contaminación puede tener importancia. En ciertos casos se ha

comprobado la presencia de gérmenes patógenos de origen humano en la leche, como por ejemplo: *Corynebacterium diphtheriae* (difteria), *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculosis), *Streptococcus pyogenes* (escarlatina), *Salmonella* (tifus, infecciones intestinales) (Champagne y Goulet, 1991).

2.7.2.4 Contaminación proveniente del agua

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

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

2.7.2.5 Contaminación proveniente del ambiente

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

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

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

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

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

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

En Uruguay los estudios realizados en leche de vaca en diferentes estaciones del año indican un predominio de psicrótrofos desde abril a octubre y en los meses de junio y julio presentaron un mayor porcentaje de del género *Pseudomonas*. En los meses de verano predominan el género termodúrico *Microbacterium* sin incidencia en el deterioro de la leche (Bermúdez et al., 2000). Según Hull et al. (1992) citado por Viejo (2000) la proporción del género *Microbacterium* durante el invierno y verano es baja, y no tiene capacidad para deteriorar la leche por no tener efectos proteolíticos ni lipolíticos. Sin embargo, su importancia radica en sus

condiciones de especie termodúrica con 100% de supervivencia respecto a otras especies termodúricas. Normalmente no se multiplican en forma apreciable en la leche cruda, aún a temperatura ambiente, por lo cual su presencia responde a la mala higiene de los equipos utilizados en el ordeño.

2.9 ALMACENAJE EN FRÍO

La refrigeración es sin duda el sistema de conservación más utilizado en la producción lechera. En los tambos ovinos y caprinos luego de obtenida la leche, esta puede seguir diferentes caminos. Ser directamente procesada en el propio establecimiento, vendida directamente como leche fluida; o ser vendida a la industria como materia prima. Si la leche no es procesada todos los días o la recolección no es realizada diariamente; es necesario la refrigeración de esta leche. El almacenaje de la leche en tanque de frío presenta ventajas y desventajas. Con respecto a las primeras: desde un punto de vista técnico la aplicación de bajas temperaturas (4 – 6 °C) permite conservar la calidad original de esa leche producida al evitar el deterioro producto de un menor crecimiento de bacterias ácido lácticas y otros patógenos; debido a que en condiciones de refrigeración se reduce el tiempo de generación de los microorganismos.

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

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

En cuanto a algunas desventajas podemos citar: este método de conservación produce un crecimiento selectivo de bacterias psicrotóficas. Estas bacterias producen enzimas proteolíticas y lipolíticas (Driessen, 1983 citado por Picard et al., 1994). Muchas de estas enzimas extracelulares son termorresistentes y soportan el proceso de pasteurización y UHT (Mottar, 1981 citado por Picard et al., 1994). Este efecto de las proteinasas afecta la

vida útil de los productos elaborados a partir de dicha materia prima (Auclair y Lenoir, 1980 citado por Picard et al., 1994). Las lipasas y proteasas, aún a bajas concentraciones son capaces de degradar la grasa y la proteína respectivamente, provocando un sabor rancio y amargo en la leche, y productos lácteos conservados en frío (Collins, 1981 citado por Silveira et al., 1998). Estas proteasas pueden, aún en bajas concentraciones, hidrolizar las proteínas de la leche causando un sabor amargo y gelificación en la leche UHT almacenada (Gómez, 1996 citado por Silveira et al., 1998).

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

2.9.1 Efecto del almacenaje en frío en las propiedades fisicoquímicas

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

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

En un trabajo realizado por Raynal y Remeuf (2000), el contenido inicial de β -caseína soluble a 20 °C fue mayor en leche de oveja y cabra que en la leche de vaca y el incremento de caseína soluble a 4 °C fue menos pronunciado con respecto a esta especie. Las concentraciones de caseína soluble en leche fresca fueron mayores en leche caprina (1,99 g/l) y leche ovina (2,44 g/l) con respecto a la leche bovina (1,77 g/l).

Los cambios más importantes observados por el almacenaje en frío fueron observados en leche de vaca comparada con leche de oveja y cabra. La concentración de calcio soluble no fue afectada en leche de oveja, pero aumento un 10% en leche de vaca y 7% en leche de cabra. Con respecto a las caseínas, la leche de vaca presenta un aumento de un 300% en la fracción soluble de las caseínas; mientras que para leche de cabra el incremento representó un 100% y en leche de oveja no se produjeron cambios para un periodo de 48hs a 4°C (Raynal y Remeuf, 2000). La leche ovina aparece como la menos susceptible al almacenaje en frío, ya que no se encontraron cambios significativos tanto en la caseína como el calcio soluble. Con respecto al tamaño de la micela esto autores no encontraron evidencia de que el frío provoque una disminución en el tamaño medio de la misma. Estos resultados son similares a los obtenidos por Downey y Murphy (1970); Puhan (1989), citados por Raynal y Remeuf (2000), para leche bovina.

Raynal y Remeuf (2000), encontraron que las propiedades fisicoquímicas y las propiedades de coagulación de la leche de pequeños rumiantes fueron sólo levemente modificadas por el almacenaje a 4 °C. Las propiedades de leche ovina fueron prácticamente inalteradas por el almacenaje en frío. Esta aparente estabilidad de la leche de oveja, puede ser explicada tanto por el comportamiento global que tal vez incluye fuertes lazos en la micela o una diferente proporción de calcio intercambiable o por cambios tan pequeños que no aparecen como significativos cuando son expresados como valores relativos. Como consecuencia, las propiedades de cuajado de la leche de oveja permanecieron inalteradas. Mientras que para leche de cabra se vio un pequeño incremento de la caseína y el calcio soluble, pero las propiedades reológicas y el desuerado de la cuajada no fueron alteradas. A partir de estos resultados concluyeron, que en contraste con la leche de vaca, el almacenaje en frío de leches de cabra y oveja tuvieron muy pocas consecuencias en la elaboración de quesos.

2.9.2 Efecto del almacenaje en frío sobre la flora microbiana

La temperatura y la duración del almacenamiento, la cantidad inicial y el tipo de bacterias presentes y en menor medida, los sistemas naturales de

inhibición de la leche influyen en la multiplicación de las bacterias que tiene lugar en la leche almacenada (Cousins y Bramley, 1987). El frío impide por ejemplo la germinación de microorganismos esporulados (Cromie, 1994). La conservación de la leche a bajas temperaturas provoca una selección de las bacterias psicrótróficas y en particular de algunas de ellas como las *Pseudomonas* (Mahieu, 1991). En un trabajo realizado por Bloquel y Veillet-Poncet (1980), encontraron que en leche de vaca refrigerada a 4°C durante 4 días, esta tiene una modificación importante en la composición de la flora bacteriana original. Al 4^{to} día de almacenaje, vieron una disminución en la proporción de especies mesófilas Gram positivas y un aumento de manera significativa de la flora psicrótrofa Gram negativas, 73% pertenecían al género *Pseudomonas*. Las especies *P. fluorescens* y *P. putida* son las que se identificaron en una mayor frecuencia.

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

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

2.9.3 Cambios bioquímicos causados por los psicrótrofos

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

Dichas enzimas (proteasas, lipasas y fosfolipasas) son segregadas por estas bacterias al final de la fase exponencial y comienzo de la fase estacionaria de la curva de crecimiento (Driessen, 1983 citado por Picard et al., 1994). Según Miranda y Grippon, (1986) citado por Picard et al. (1994), esta segregación posiblemente se deba a la lisis celular de dichas bacterias. Por lo tanto el número de psicrótrofos no es un buen indicador de la proteólisis en la leche, ya que esta depende no solo de la cantidad sino también del tiempo y el tipo de cepa actuante (Picard et al., 1994). Según Adams et al. (1975), citado por Cousin (1982), un alto número de psicrótrofos no es necesario para producir una cantidad significativa de enzimas termoestables. Sin embargo Puhan (1989), sostiene que para que exista una actividad proteolítica debido a la acción de los microorganismos psicrótrofos, es necesario conteos en el rango de 5×10^5 a 10^6 para que la degradación de la caseína solubilizada en el suero sea significativa.

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

Dado los objetivos de este trabajo se va a hacer referencia exclusivamente a la actividad proteolítica.

2.9.3.1 Degradación de proteínas

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

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

Según McKellar, la producción de proteinasas por *P. fluorescens* es alta a 20 °C, mientras que Juffs et al. (1968), citado por Mottar (1989); encontró un descenso en la producción de proteinasas cuando la temperatura de incubación bajaba de 20 a 5 °C. Las proteinasas producidas por *Pseudomonas* son mayormente activadas en rangos de temperatura entre 37 y 45 °C. Stepaniak et al. (1982), citado por Mottar (1989), encontró que algunas proteinasas producidas por *P. fluorescens* mantuvieron aproximadamente el 30% de su máxima actividad a 7 °C y el 16% a 4 °C. Las proteinasas producidas fueron muy estables y luego de tres meses de almacenamiento de cultivo, leche o productos a temperatura ambiente, se encontró una actividad considerable de proteinasas producidas por *Pseudomonas*. En la tabla 6 se muestran las principales bacterias productoras de proteinasas termorresistentes.

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

Tabla 6. Bacterias productoras de proteinasas termorresistentes.

<i>P. fluorescens</i>	<i>Achromobacter spp.</i>
<i>P. putida</i>	<i>Flavobacterium spp.</i>
<i>P. fragi</i>	<i>Aeromonas spp.</i>
<i>P. putrefasciens</i>	<i>Serratia marcescens</i>

(Mottar, 1989)

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

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

2.9.3.2 Efecto de la degradación en la micela de caseína

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

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

Los resultados de diversos estudios que se han realizado sobre la degradación de caseína por proteinasas psicrótróficas muestran, que κ , β y α_{s1} -caseínas son preferencialmente degradadas, dependiendo de que

microorganismo proviene dicha proteínasa. Mucho de estos estudios indican que κ -caseína es degradada en primera instancia, esto puede deberse a que la κ -caseína se encuentra ubicada en la superficie de la micela, lo cual la hace más susceptible a la acción de las proteínasas psicrotróficas. Esta degradación puede tener implicancias en el uso de esta leche para la elaboración de quesos, donde la κ -caseína es esencial en la formación de la cuajada. La degradación de β y α_{s1} -caseínas también pueden afectar la elaboración de quesos y otros productos lácteos (Cousin, 1989).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente trabajo fue generar conocimientos relacionados con la calidad microbiológica de leche ovina y caprina almacenada en tanque de frío, y el efecto del tiempo en el deterioro de la fracción de caseína.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el grado de contaminación bacteriana (UFC/ml) de la leche almacenada en tanque de frío por 96 h.
- Aislar e identificar los géneros de psicrótrofos predominantes durante el período de lactancia.
- Analizar el deterioro de las caseínas por electroforesis durante los 4 días de almacenaje en tanque de frío.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

La obtención de muestras se realizó en el tambo de la estación experimental del INIA, Las Brujas (Canelones) y el trabajo de análisis microbiológico se proceso en el laboratorio de la Unidad de Tecnología de Alimentos de la Facultad de Agronomía, mientras que la técnica de electroforesis se efectuó en laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria.

4.1 PERIODO Y FRECUENCIA DE MUESTREO

El período de muestreo se extendió desde octubre del 2000 a marzo del 2001. La frecuencia de muestreo fue de 4 días seguidos, cada 14 días.

4.1.1 Toma de muestras

Las muestras fueron obtenidas asépticamente de los tanques de frío, en recipientes de plástico de 50 ml., previamente esterilizados a 121 °C durante 15 minutos. Estas fueron transportadas al laboratorio en condiciones de refrigeración y procesadas inmediatamente después de su arribo.

4.2 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

4.2.1 Análisis microbiológico

Las muestras antes de ser procesadas fueron homogeneizadas en Vortex a 35 °C. Se realizó el método de conteo viable en placa por diluciones seriadas decimales en tubo (10^{-1} a 10^{-6}) utilizando 9 ml de solución salina fisiológica (0,85 ClNa, p/v). Las muestras preparadas fueron transferidas a placas de Petri por el método de siembra en superficie, con distintos medios de cultivos, con el propósito de:

- Conteo de mesófilos aerobios totales sobre Agar Caseína (1%)
- Conteo de enterobacterias, sobre Agar Mac Conkey
- Conteo de *Staphylococcus*, sobre Agar Sales Manitol

Se incubaron durante 48 horas a 37 °C .

- Conteo de psicrótrofos en Agar Caseína

Se incubaron por un período de 10 días a 7 °C.

Luego de cumplido los plazos establecidos se procedía al recuento de bacterias viables (UFC/ml).

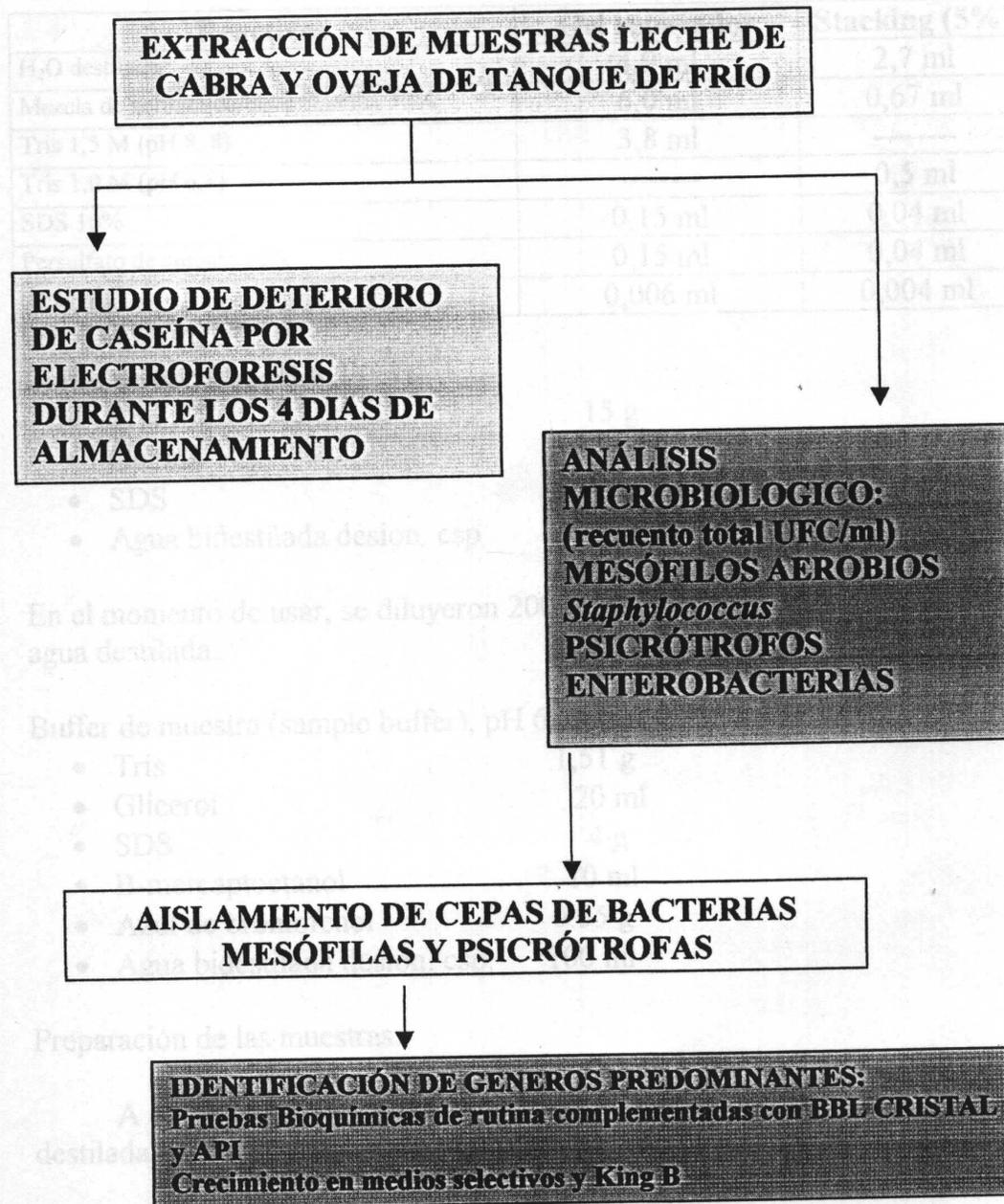
4.2.2 Aislamiento e identificación

Se realizaron aislamientos de las colonias características en el medio de cultivo ASM por fermentación del manitol. Se realizó tinción de Gram de las colonias seleccionadas, los aislamientos presuntivos pertenecientes al género *Staphylococcus* se sometieron a pruebas bioquímicas primarias y secundarias para la identificación de las cepas.

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

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

Figura 1 Diagrama del procedimiento para el análisis de las muestras



4.3 ELECTROFORESIS EN GEL

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

Buffer de corrida, pH 8,3 (x5)

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

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

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

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

Preparación de las muestras:

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

Condiciones de corrida:

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

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

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

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

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

Los geles se conservaron en esta solución hasta el momento de secado, el cual se realizo con un secador de geles BIO-RAD modelo 583 (Robyt y White, 1990).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 ANÁLISIS DEL CONTEO BACTERIANO

En la tabla 7 se presentan los resultados obtenidos de los recuentos promedios bacterianos en leche de cabra y oveja en el periodo Octubre-Marzo.

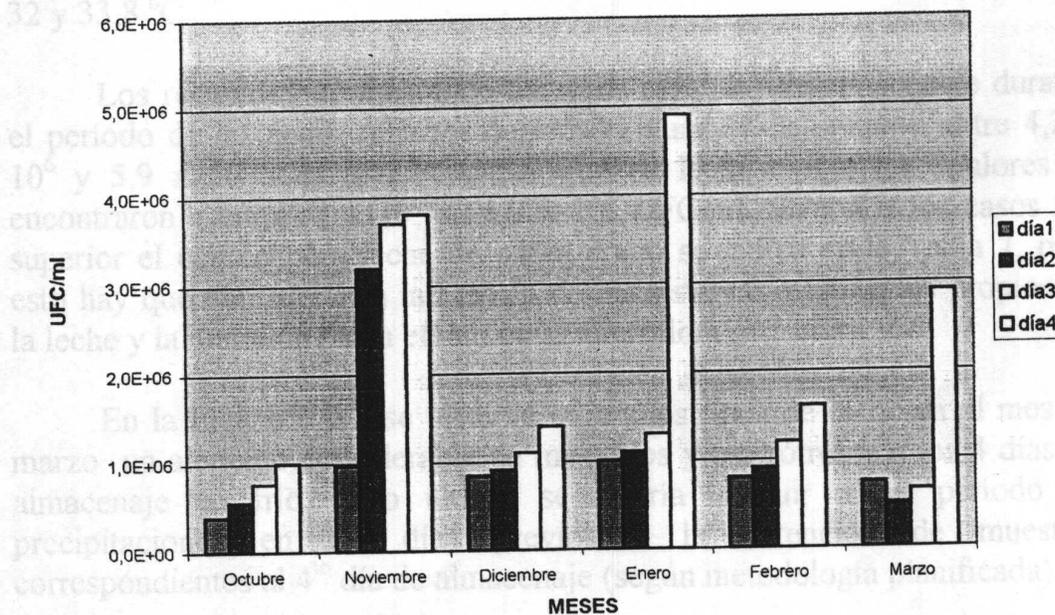
Tabla 7. Promedios de recuentos mesófilos aerobios y psicrótrofos en leche de cabra y oveja almacenada en tanque de frío.

<i>Grupos bacterianos</i>		<i>Día *</i>		<i>Recuento Celular (UFC/ml)</i>					
				Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo
<i>Cabra</i>									
<i>Aerobios mesófilos</i>	1	$1,2 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
	2	$1,3 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
	3	$1,8 \times 10^6$	$3,7 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
	4	$4,8 \times 10^6$	$4,8 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$	$5,9 \times 10^6$	$5,5 \times 10^6$	$5,4 \times 10^6$	$5,4 \times 10^6$	$5,4 \times 10^6$
<i>Psicrótrofos</i>	1	$2,3 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$
	2	$2,8 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$
	3	$1,1 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$	$4,3 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	$4,2 \times 10^5$	$4,2 \times 10^5$	$4,2 \times 10^5$
	4	$3,6 \times 10^6$	$4,4 \times 10^5$	$6,8 \times 10^5$	$5,5 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$
<i>Oveja</i>									
<i>Aerobios mesófilos</i>	1	$4,0 \times 10^5$	$9,7 \times 10^5$	$8,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^6$	$8,0 \times 10^5$	$7,4 \times 10^5$	$7,4 \times 10^5$	$7,4 \times 10^5$
	2	$5,6 \times 10^5$	$3,2 \times 10^6$	$9,1 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$9,1 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$
	3	$7,7 \times 10^5$	$3,7 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$6,5 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$
	4	$1,0 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$
<i>Psicrótrofos</i>	1	$2,6 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$
	2	$7,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$6,0 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$
	3	$9,0 \times 10^4$	$1,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$
	4	$9,0 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$	$6,7 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$

*= días de almacenamiento en el tanque de frío

Los conteos de mesófilos aeróbicos realizados en leche de cabra durante el primer día de almacenamiento en el período muestreado, siempre fueron mayores o iguales a 1×10^6 UFC/ml. Mientras que para leche de oveja, fueron siempre menores en dicho periodo; sólo en el mes de enero se alcanzo un nivel de 1×10^6 UFC/ml.

Figura 2. Conteo de mesófilos totales viables en leche ovina almacenada en tanque de frío.



El máximo conteo de mesófilos en ambos tipos de leche se presentó en el mes de enero a los 4 días de almacenaje. En un trabajo realizado por Tirad-Collet, *et al.* (1991), ellos atribuyen como una posible causa de este incremento a la mayor temperatura ambiental durante el ordeño en los meses de verano. En este mes el cuarto muestreo se realizó con días previos de lluvia y temperaturas máximas entre 31 a 32° C.

En la Figura 2 se observa un marcado aumento de mesófilos en leche ovina en el mes de noviembre al igual de lo que ocurre en leche caprina (Figura 3) esto se debió a que dos días antes de la extracción de muestras

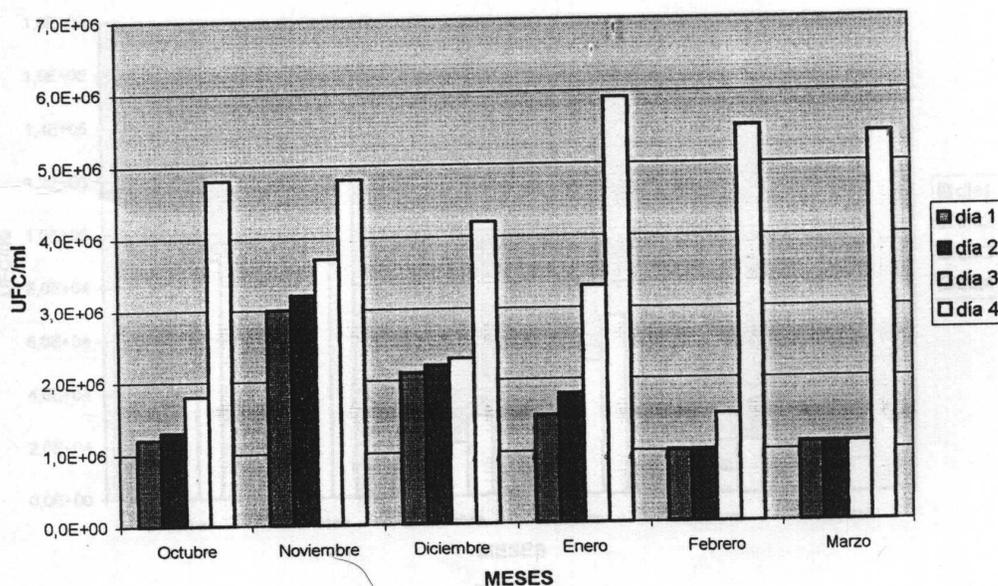
llovió 33.5 mm, afectando de esta manera el conteo de bacterias al 4^{to} día de almacenaje.

Los menores conteos iniciales de mesófilos para ambos tipos de leche fueron en el mes de febrero, esto podría deberse a que no llovió en el período de muestreo a pesar de que en el mes de febrero los niveles de precipitaciones fueron mayores que en enero, 172 mm y 139 mm respectivamente; en cuanto a las temperaturas máximas registradas durante el mes de febrero en los días que se realizó el muestreo, se ubicaron entre 32 y 33,8 °C .

Los recuentos de mesófilos aerobios al 4^o día de almacenaje durante el período de lactancia en leche caprina (Figura 3), se situaron entre $4,2 \times 10^6$ y $5,9 \times 10^6$ UFC/ml. Mientras que en leche ovina, los valores se encontraron entre 1×10^6 y $4,9 \times 10^6$ UFC/ml. En todos los casos fue superior el conteo para leche de cabra como se indica en la Tabla 7, para esto hay que considerar la influencia de los sistemas inhibitorios propios de la leche y la duración de su efecto en la microflora.

En la Figura 2 y 3 se observa en ambos tipos de leche en el mes de marzo un aumento considerable de mesófilos y psicrótrofos a los 4 días de almacenaje en frío. Esto último se podría atribuir a un período de precipitaciones en los días previos a la obtención de muestras correspondientes al 4^{to} día de almacenaje (según metodología planificada).

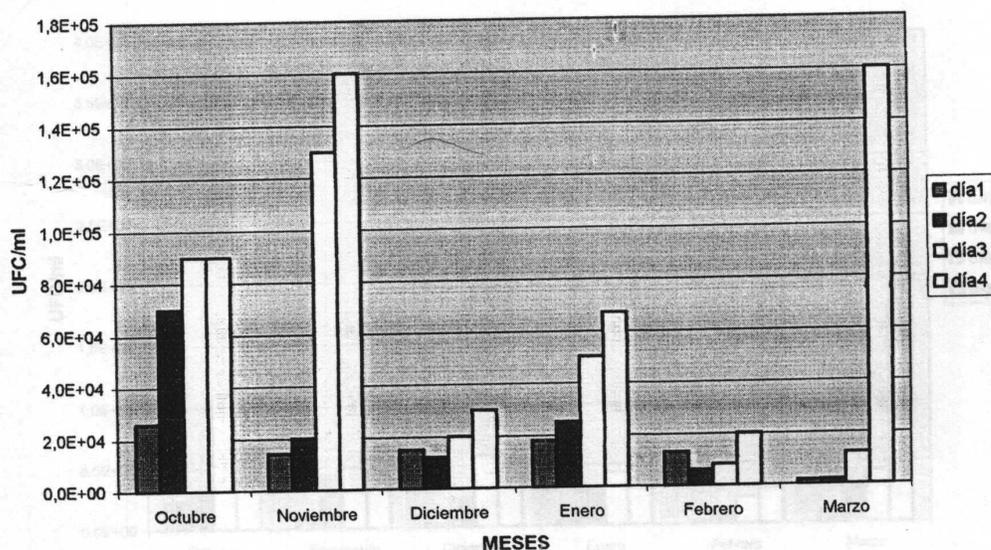
Figura 3. Conteo de mesófilos totales viables en leche caprina almacenada en tanque de frío.



Se debe considerar que un porcentaje de bacterias mesófilas aerobias pertenecen a un grupo de microorganismos que son indicadores de condiciones higiénico-sanitario de producción y manejo, y que su presencia en número alto indican riesgos sanitarios y también incremento del contenido enzimático (proteólisis y lipólisis). Esto último probablemente conduzca a problemas tecnológicos en la elaboración de productos lácteos, como son: disminución de rendimiento quesero, sabores amargos y rancios.

En la Tabla 7 se detallan los conteos de psicrótrofos, en el primer día en la leche de cabra en todos los muestreos presentaron valores mayores con respecto a la leche de oveja. Los porcentajes más altos de la flora psicrótrofa con respecto a los conteos totales se presentaron durante el mes de octubre. Al 4º día de almacenaje los niveles para leche de cabra fueron $2,8 \times 10^5$ a $3,6 \times 10^6$ UFC/ml y para leche de oveja los niveles de psicrótrofos fueron más bajos, de $2,0 \times 10^4$ a $1,6 \times 10^5$ UFC/ml (figura 4 y 5).

Figura 4. Conteo de psicrótrofos en leche ovina almacenada en tanque de frío.

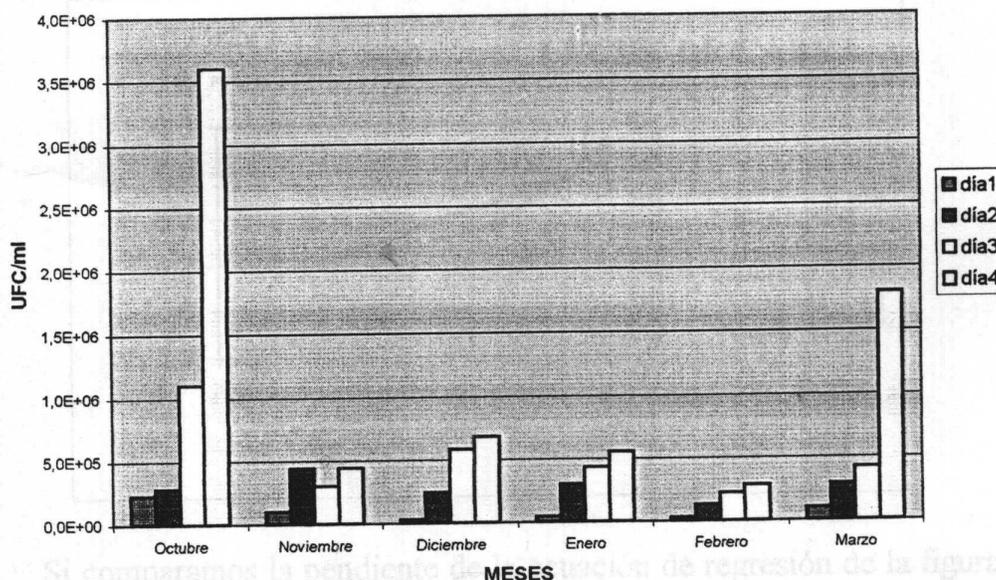


En la Figura 4 se indica que los conteos de psicrótrofos fueron bajos en leche ovina desde diciembre a febrero con cuatro días de almacenamiento, mientras que en los restantes meses, las temperaturas más bajas podrían haber incidido en el incremento de éstos a los cuatro días de almacenaje.

En los meses de febrero y marzo el conteo de enterobacterias y *Microbacterium* se incrementó, disminuyendo el conteo de psicrótrofos en los 2 tipos de leche en relación a los meses anteriores.

El recuento de psicrótrofos a los 4 días de almacenaje en leche caprina supera a los de leche ovina, el porcentaje de éstos en relación a la presencia de mesófilos totales fue: en el mes de octubre 9 y 5,5 % en el mes de marzo en las muestras de leche ovina, y de 75 y 33 % respectivamente en leche caprina. El mayor porcentaje de microflora psicrótrofa en leche caprina es al inicio de la lactancia, las especies bacterianas predominantes en este período presentaron alta actividad proteolítica hasta el mes de diciembre.

Figura 5. Conteo de psicrótrofos en leche caprina almacenada en tanque de frío.

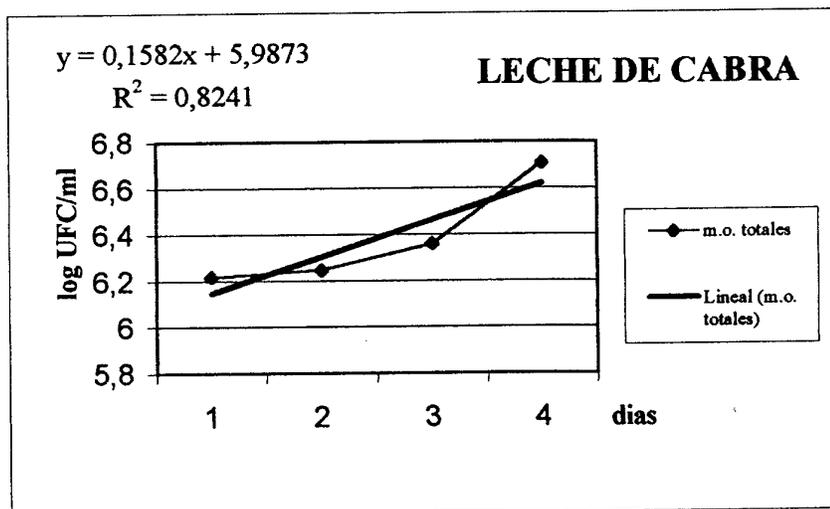


Los niveles de psicrótrofos en leche de cabra a partir del mes de noviembre aumentan considerablemente a partir del segundo día de almacenaje. En el mes de marzo con cuatro días de almacenaje el conteo de los mismos en leche comienza a aumentar (Figura 5) y en este caso la variación de temperatura y lluvia influyó en la selección de la microflora actuante.

5.2 ANALISIS DE LOS CONTEOS DURANTE LA LACTANCIA

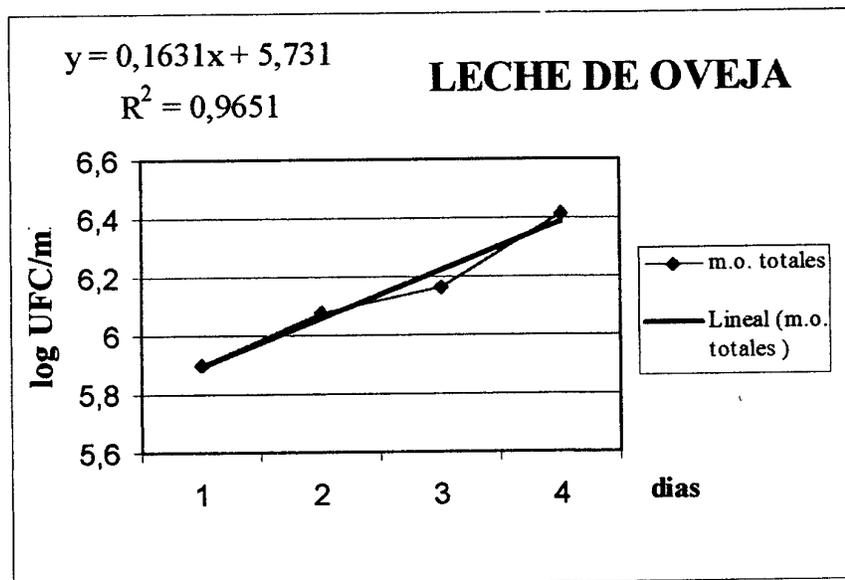
De los conteos obtenidos a lo largo de la lactancia se realizó el promedio para las 24, 48, 72 y 96 hs. de almacenaje. Con los valores obtenidos se graficaron y se obtuvo la ecuación de regresión.

Figura 6 Promedio de conteos durante la lactancia de mesófilos totales en leche caprina.



Si comparamos la pendiente de la ecuación de regresión de la figura 6 con la de la figura 7, podemos ver que tanto para leche de cabra como para leche de oveja, dicho valor es similar. Por lo que para ambos tipos de leche la tasa de aumento en el número de mesófilos totales es igual. Sin embargo si vemos la cantidad inicial de microorganismos totales presentes, en la leche de cabra el grado de contaminación inicial es mayor con respecto a leche de oveja. La menor carga microbiana inicial de la leche de oveja podría ser debido a las propiedades intrínsecas de esta leche en inhibir el crecimiento microbiano. La mayor contaminación inicial en leche de cabra puede haber sido afectada por la rutina de ordeño realizada en el tambo donde se ordeñan primero a las ovejas y luego a las cabras.

Figura 7 Promedio de conteos durante la lactancia de mesófilos totales en leche ovina.



Con respecto a la flora psicrótrofa (figuras 8 y 9) podemos ver que existen diferencias tanto para la tasa de crecimiento como para el nivel inicial de microorganismos presentes en ambos tipos de leche. La leche de cabra presenta un tasa de crecimiento mayor que la leche de oveja y a su vez el grado de contaminación inicial también es mayor en este tipo de leche. La menor tasa de crecimiento que se evidencia en la leche de oveja puede ser atribuida a la mayor actividad del sistema lactoperoxidasa en dicha leche (Alichanidis y Polychroniadou, 1996) el cual tiene un efecto bactericida sobre los microorganismos Gram negativos.

Figura 8 Promedio de conteos durante la lactancia de psicrótrofos en leche caprina.

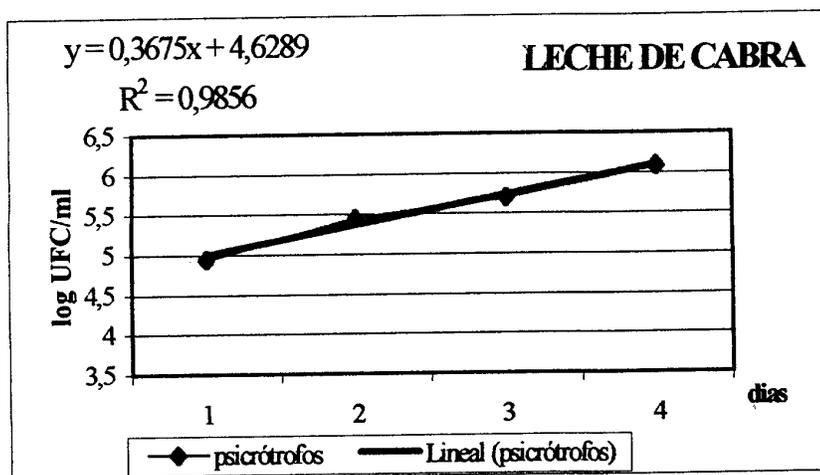
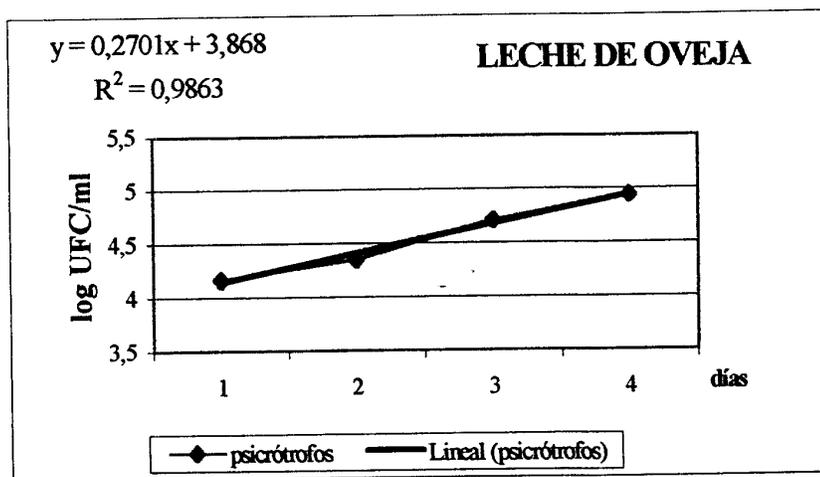


Figura 9 Promedio de conteos durante la lactancia de psicrótrofos en leche ovina.



5.1.1 Géneros de bacterias psicrótrofas de leche ovina y caprina refrigerada

La leche de cabra fue más sensible al deterioro enzimático, predominando los géneros de bacterias psicrótrofas con alta actividad proteolítica. En el mes de octubre al 4^{to} día de almacenaje, el nivel de psicrótrofos llegó a representar el 75 % de la flora microbiana total, mientras que el nivel de enterobacterias disminuyó.

En los meses de octubre a noviembre las especies predominantes fueron *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas fragi* (45 %), *Enterobacter aerogenes* (10 %) y *Acinetobacter* (15 %) con alta actividad proteolítica en leche de cabra. En diciembre aunque el nivel de psicrótrofos fue mayor que en el mes de noviembre las especies bacterianas predominantes en este período no tienen alta actividad proteolítica a los tres días de almacenamiento.

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

5.2 DEGRADACIÓN DE CASEÍNAS

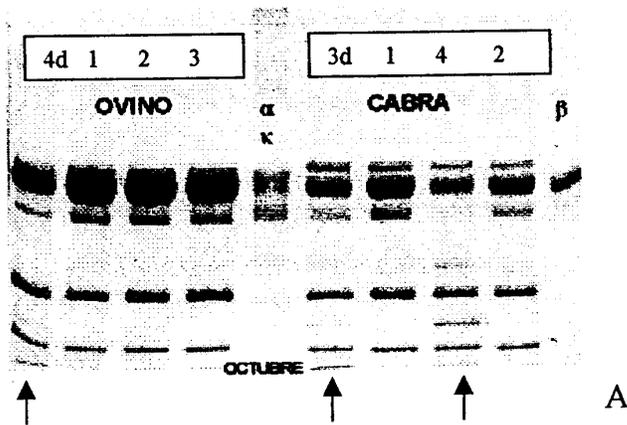
En la Figura 10 se observan los geles de electroforesis en los diferentes meses de lactancia para leche de oveja y cabra. Se puede observar que luego de 72 h de almacenamiento en tanque de frío hay un deterioro de las diferentes fracciones de caseínas. La actividad proteolítica desarrollada por bacterias psicrótrofas en leche de cabra en los meses de octubre y noviembre con 3 y 4 días de almacenaje en frío fue alta debido al incremento del recuento de este tipo de microorganismos en ese período. La fracción que fue más fuertemente degradada en estos meses fue la κ -caseína. Esto podría deberse a que κ -caseína es más susceptible a una degradación inicial por las proteinasas de los distintos tipos de microorganismos psicrótrofos ya que se encuentra ubicada en la superficie de la micela (Cousin, 1989).

Cuando se almacena a bajas temperaturas las cantidades de β -caseína disociada de la micela aumentan en leche de cabra, mientras que en leche de oveja los niveles de β -caseína soluble permanecen constantes por el efecto del frío (Raynal y Remeuf, 2000). Las bajas temperaturas en el tanque de frío provocan un aumento en los niveles de caseína soluble en leche caprina haciéndola más susceptible a la proteólisis microbiana. El frío también provoca un aumento en los niveles de Calcio soluble en leche caprina, lo cual podría hacer más susceptible a las α_s -caseína ya que la estructura micelar se ve alterada.

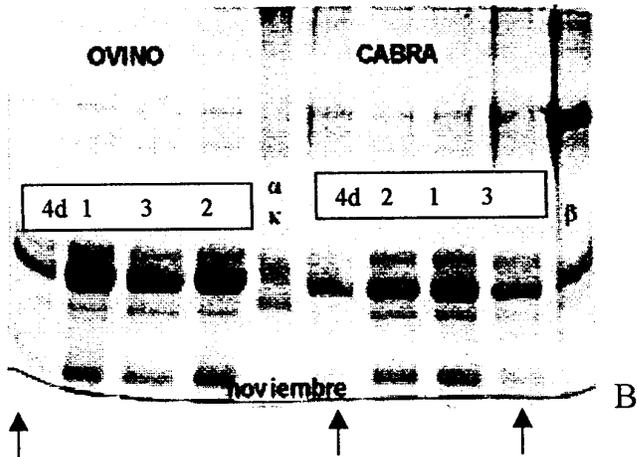
En la Figura 10 se observan los geles de electroforesis con muestras de leche refrigerada durante 4 días, a continuación se detallan:

α, β, κ = caseína estándar
 1,2,3,4d = días de almacenamiento de leche en tanque de frío
 ↑ = deterioro de caseínas por enzimas en tanque de frío

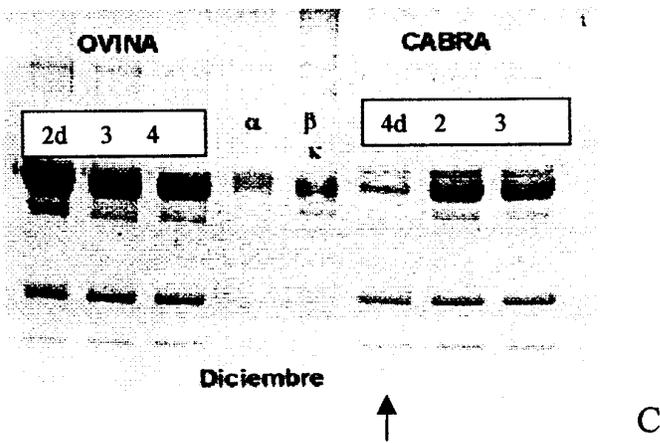
Figura 10 Estudio de deterioro de caseínas por electroforesis en leche ovina y caprina durante 4 días de almacenaje en el tanque de frío a lo largo de la lactancia.



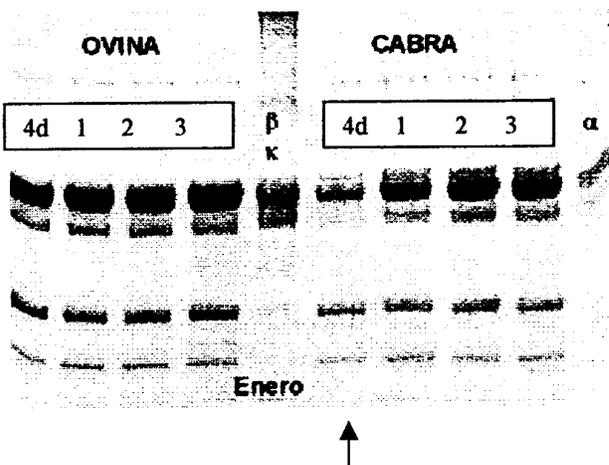
En la Figura A se observa el deterioro en la leche ovina, el mismo se evidencia al 4° día; mientras que en la leche caprina ocurre a partir del 3^{er} día de almacenamiento.



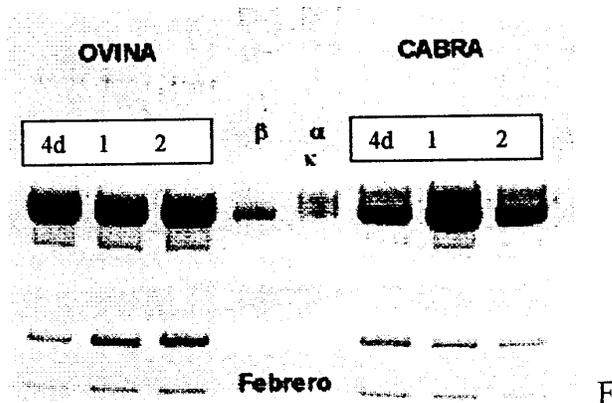
En la Figura B se observa un cierto grado de proteólisis en leche ovina al 4° día en el mes de noviembre, mientras que en leche caprina ocurre lo mismo que en el mes anterior.



En la Figura C, la flecha indica un marcado deterioro de las caseínas en leche de cabra a partir del 4° día de almacenamiento. En leche ovina a partir de este mes no se detectó un grado de proteólisis importante.

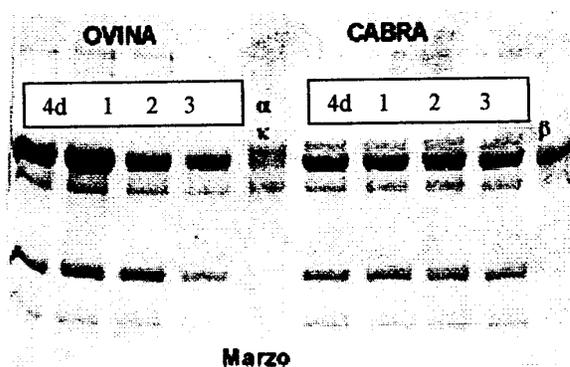


En la Figura D, los análisis por electroforesis presentan resultados similares al mes anterior.



En las Figuras F y G se observan que en la leche caprina y ovina luego de 96 hs. en el tanque, no se presentaron importantes cambios por el efecto de almacenaje (proteólisis).

F



G

La leche caprina fue más susceptible a la proteólisis como se evidencia en los distintos geles. En el mes de noviembre se comienza a observar cierto grado de proteólisis a partir de las 72hs. Mientras que en los meses de diciembre y enero se observa recién al 4^{to} día de almacenaje.

En la leche ovina el deterioro por actividad proteolítica se comienza a observar al 4^o día, con degradación en κ -caseína. Esta menor actividad podría deberse como ya fue citado anteriormente a que la leche ovina presenta una elevada resistencia a la proliferación de bacterias en las primeras horas y que se puede atribuir en parte a su alta actividad inmunológica. La leche de oveja presenta el doble de minerales que la leche

de vaca y por lo tanto desarrolla una capacidad tampón mayor (Assenat, 1991).

Para ambos tipos de leche la degradación enzimática de las caseínas se correspondió con el siguiente orden $\kappa > \alpha > \beta$. En el caso de almacenar en el tanque de frío por 3 o 4 días se debe considerar que en la leche caprina hay un deterioro importante en la fracción κ -caseína en los primeros meses de lactancia a partir de las 72 hs. de almacenamiento.

En la leche ovina se observó un deterioro de las fracciones de caseínas en los 2 primeros meses de producción láctea luego de haber permanecido 96 hs. en el tanque de frío. A partir del mes de diciembre los géneros bacterianos predominantes son termodúricos y fueron identificados como *Microbacterium*. Este género se caracteriza por no desarrollar una actividad proteolítica importante en la leche.

6. CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación permitió realizar consideraciones que pueden conducir a mejorar la calidad química de la leche caprina y ovina en relación a la actividad microbiana y el tiempo de almacenaje en tanque de frío.

Los resultados indican que en el periodo de lactancia en ambos tipos de leche el recuento de mesófilos aerobios varió considerablemente, el máximo conteo se registro en el mes de enero al 4° día de almacenaje. Esto podría ser explicado por una mayor temperatura ambiental durante el ordeño y asociado a esto una mayor oscilación de la temperatura de la leche en el tanque debido a un aumento en el tiempo necesario en alcanzar la temperatura optima de refrigeración (4 ° C).

La composición de la flora microbiana presente en ambos tipos de leche no fué homogénea a lo largo de la lactancia. En los meses de octubre a noviembre, la leche caprina a las 96 hs en el tanque de frío las especies predominantes fueron *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas fragi* (45 %), *Enterobacter aerogenes* (10 %) y *Acinetobacter* (15 %) con alta actividad proteolítica. En diciembre aunque el nivel de psicrótrofos fue mayor que en el mes de noviembre las especies bacterianas predominantes en este período no producen deterioro proteolítico a los tres días de almacenaje.

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

La actividad proteolítica desarrollada por mesófilos aerobios se detecta sólo en el mes de enero en leche de cabra, mientras que en la leche de oveja no se evidenció. Esto último se puede explicar por los géneros bacterianos predominantes en ambas especies y también debido a la mayor actividad inhibitoria natural de la leche ovina.

Los recuentos de mesófilos aerobios al 4^{to} día de almacenaje durante el período de lactancia en leche caprina, fueron entre $4,2 \times 10^6$ y $5,9 \times 10^6$ UFC/ml. Mientras que en leche ovina, los valores se encontraron entre 1×10^6 y $4,9 \times 10^6$ UFC/ml.

Los conteos de psicrótrofos al 4^{to} día de almacenaje en leche de cabra en tanque de frío fueron de $2,8 \times 10^5$ a $3,6 \times 10^6$ UFC/ml y para leche de oveja los niveles de psicrótrofos fueron de $2,0 \times 10^4$ a $1,6 \times 10^5$. Los porcentajes de estos en relación a los mesófilos totales fueron más altos en los meses de octubre y marzo en ambos tipos de leche.

Los conteos totales (mesófilos y psicrótrofos) realizados al 4^{to} día durante el periodo de muestreo, fueron superiores en leche de cabra con respecto a leche de oveja, esto podría explicarse por la alta actividad inmunológica y al poder buffer propia de esta leche.

Los resultados indican que en los meses comprendidos entre octubre y diciembre en la leche de oveja el deterioro proteico se evidencia al 4^o día de almacenaje con degradación de la κ -caseína. Mientras que en leche de cabra durante los primeros meses de lactancia, la actividad proteolítica se evidencia a partir de las 48 hs en el tanque de frío, y durante los meses de verano el deterioro se detecta luego de transcurridas 72 hs de refrigeración.

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

De acuerdo a los resultados obtenidos se recomienda refrigerar la leche caprina y ovina máximo 48 hs. Este tiempo puede incrementarse

hasta las 72 horas dependiendo de la estación del año, condiciones ambientales particulares del año en cuestión y el manejo general del tambo.

El análisis de los resultados de la frecuencia de microorganismos predominantes durante el periodo de lactancia indican el efecto estacional y de el manejo sobre la calidad de la leche ovina y caprina.

7. RESUMEN

Los objetivos generales del presente trabajo fueron: abordar los aspectos relacionados con la calidad microbiológica de leche de oveja y cabra almacenada en tanque de frío por un periodo de 96 hs.; y el efecto de los microorganismos sobre la fracción caseína. Las muestras fueron obtenidas asépticamente de los tanques de frío en el tambo del INIA, Las Brujas (Canelones). El período de muestreo se extendió desde octubre a marzo y la frecuencia de muestreo fue de 4 días seguidos, cada 14 días. Las muestras se transportaron refrigeradas y se le determinaron recuentos por el método de dilución en caja (UFC/ml) la presencia de mesófilos aerobios (MC, ASM y PCA) y psicrótrofos (A. Caseína). Se identificaron y asilaron cepas bacterianas mesófilas y psicrótrofas mediante pruebas bioquímicas primarias y secundarias (API 20E, API20EN, APISTAPH, BBL cristal NF, BBL cristal G+), producción de pigmentos en medios selectivos. También se estudio el deterioro de las caseínas por electroforesis en gel (SDS-PAGE) durante los 4 días de almacenamiento. La flora microbiana presente en ambos tipos de leche no es constante a lo largo de la lactancia, y los máximos conteos ocurrieron durante el mes de enero al 4° día de almacenaje. En todos los casos los conteos para leche de cabra fueron superiores a los de leche de oveja. Durante la primavera las especies predominantes fueron *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas fragi* (45 %), *Enterobacter aerogenes* (10 %) y *Acinetobacter* (15 %) con alta actividad proteolítica en leche de cabra. En diciembre las especies bacterianas predominantes no tienen alta actividad proteolítica a los tres días de almacenamiento. Mientras que en leche de oveja la actividad proteolítica detectada es menor a la leche caprina durante la primavera, predominando los géneros *Pseudomonas* (35 %) y *Enterobacter* (10 %) con menor conteo de psicrótrofos en el tanque de frío. Durante el verano predominan termodúricos como *Microbacterium* y *Enterobacter* en leche de oveja y cabra. Con respecto a la degradación enzimática en las caseínas es κ -caseína a partir del primer ordeño y a las 96 hs. de almacenamiento en tanque de frío para ambos tipos de leche, la κ -caseína es deteriorada con mayor rapidez. La conservación de la leche en ambas especies durante los dos primeros días es adecuada y posteriormente (3-4 días) el incremento de psicrótrofos determina una disminución en la vida útil.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. ALAIS, C. 1985. Ciencia de la leche. Principios de Técnica lechera. Barcelona, Reverté. 873p.
2. ALICHANIDIS, E.; POLYCHRONIADOU, A. 1996. Special features of dairy products from ewe and goat milk from the physicochemical and organoleptic point of view. *In*: Proceedings, production and utilization of ewe and goat milk. Crete, Greece, Oct. 19-21, 1995, International Dairy Federation Publ., Brussels, Belgium, pp. 21-43.
3. ANIFANTAKIS, E. 1993. Bacteriological quality of raw goat's milk in Greece. *Lait*. 73: 465-472.
4. ASSENAT, L. 1991. Composición y propiedades. *In*: Leche y productos lácteos Vol. 1. Luquet, F. Zaragoza, Acribia. pp. 277-313.
5. BANKS, W.; DALGLEISH, G.; ROOK, J. 1989. La leche y su procesado. *In*: Microbiología lactológica Vol. 1. Robinson, R. K. Zaragoza, Acribia. pp. 1-32.
6. BERMÚDEZ, J.; REGINENSI, S. 2001. Ponencia Magistral. Calidad de la leche para la producción de productos lácteos diferenciados de alto valor en pequeños rumiantes. 2º Congreso Latinoamericano de Especialistas en Producción Ovina. Mérida, Yucatán, México 2001.
7. BERMÚDEZ, J.; REGINENSI, S.; VIEJO, J. 2000. Géneros bacterianos asociados al deterioro de la leche y productos lácteos. Jornada "Evolución, presente y futuro de calidad". Conaprole. Facultad de Agronomía, Montevideo, Uruguay. 25 p.
8. BLAKE, M.; KOKA, R.; WEIMER, B. 1996. A semiautomated reflectance colorimetric method for the determination of lipase activity. *Journal of Dairy Science*. 79: 1164 -1169.

9. BLOQUEL, R.; VEILLET-PONCET, L. 1980. Évolution et détermination de la flore bactérienne d' un lait cru réfrigéré paucimicrobien en fonction du temps. *Lait*. 60: 474-486.
10. BONASSI, I.; KROLL, L.; VIEITES, R. 1996. Composição protéica do leite de cabra. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. 17 (1): 57-63.
11. BONASSI, I.; MARTINS, D.; ROÇA, R. 1997. Composição química e propriedades físico-químicas do leite de cabra. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*. 16 (3): 218-222.
12. CARBALLO, A.; ILUNDAIN, M.; INCIARTE, J.; LATASTE, J. 1999. Estudio de la contaminación microbiana de la leche en seis tambos del departamento de Flores en dos épocas del año. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay, Facultad de Agronomía. 60 p.
13. COTTIER, H. 1991. Producción de leche de oveja. In: Leche y productos lácteos. Vol. 1 Luquet, F. Zaragoza, Acribia. pp. 315-329.
14. COUSIN, M. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. *Journal of Food Protection*. 45 (2): 172-207.
15. COUSIN, M. 1989. Physical and biochemical effects on milk components. In: Enzymes of psychrotrophs in raw food. Mc Kellar, R. Florida, CRS Press. pp. 205-224.
16. COUSINS, C.; BRAMLEY, A. 1987. Microbiología de la leche cruda. In: Microbiología lactologica Vol. 1. Robinson, R. K. Zaragoza, Acribia. pp. 109-150.
17. CRAVEN, H.; MACAULEY, B. 1992. Microorganism in pasteurized milk after refrigerated storage 1. Identification of types. Research paper. *The Australian Journal of Dairy Technology*. 47: 38-45.
18. CROMIE, S. 1994. Spoilage by heat-resistant, cold-tolerant bacteria. www.drdc.aust.com.
19. CHAMPAGNE, C.; GOULET, J. 1991 In: Ciencia y tecnología de la leche: principios y aplicaciones. Amiot, J. Zaragoza, Acribia. pp. 77-95.

20. FURTADO, M.; WOLFSCHOON-POMBO, A. 1978. Leite de cabra: Composição e industrialização. Revista do Instituto de Laticíneos Candido Tostes. Julio-Agosto, 1978. pp. 15-17.
21. GOURSAUD, J. 1991. Composición y propiedades fisico-químicas. In: Leche y productos lácteos Vol. 1. Luquet, F. Zaragoza, Acribia. pp. 3-92.
22. HADDADIN, M.; IBRAHIM, S.; ROBINSON, R. 1996. Preservation of raw milk by activation of the natural lactoperoxidase systems. In: Production and utilization of ewe and goat milk. Crete, Greece, Oct. 19-21, 1995, International Dairy Federation Publ., Brussels, Belgium, pp. 89-94.
23. HAENLEIN, G. 1996. Nutritional value of dairy products of ewes and goats milk. Proceedings, Production and utilization of ewes and goat milk, Crete, Greece, Oct. 19-21, 1995, International Dairy Federation Publ., Brussels, Belgium.
24. HAENLEIN, G. 1992. Lipids And Proteins In Milk, Particulary Goat Milk. <http://ag.udel.edu/extension/information/goatmgt/gm-08.htm>.
25. JENNESS, R. 1980. Composition and characteristics of goat milk: Review 1968-1979. Journal of Dairy Science. 63 (10): 1605-1630.
26. KING, E.; WARD, M.; RANEY, D.; 1954. Two simple media for the determination of pyocyanin and fluorescin. Journal Laboratory Clinical Medicine. 44: 301-309.
27. KONEMAN, E.; ALLEN, S.; DOWELL, V.; SOMMERS, H. 1989. Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana 533p.
28. LE MENS, P. 1991. Propiedades fisico-químicas, nutricionales y químicas. In: Leche y productos lácteos Vol. 1. Luquet, F. Zaragoza, Acribia. pp 343-360.
29. MAC FADDIN. 1990. Identificación de bacteria Gram negativas. In: Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana. pp. 227-259.

30. MAHIEU, H. 1991. Modificaciones de la leche después de su recogida. In: Leche y productos lácteos Vol. 1. Luquet, F. Zaragoza, Acribia., pp. 181-227.
31. MANFREDINI, M.; MASSARI, M. 1989. Small ruminant milk. Technological aspects: Storage and processing. Options Méditerranéennes –Séries Séminaires-. nº 6, 191-198.
32. MOTTAR, J. 1989. Effects on the quality of dairy products. In: Enzymes of psychrotrophs in raw food. Mc Kellar, R. Florida, CRS Press. pp. 227-243.
33. PICARD, C.; PLARD, I.; RONGDAUX-GAIDA, D.; COLLIN, J. 1994. Detection of proteolysis in raw milk stored at low temperature by an inhibition ELISA. Journal of Dairy Research. 61: 395-404.
34. PLA, R.; CARRETERO, C.; MOR-MUR, M.; GUAMIS, B. 1992. Refrigeración de la leche de oveja en la granja. Influencia de la conservación a baja temperatura sobre los recuentos de flora total y sicrotíofa. Revista Española de Lechería. 42: 42-44.
35. PUHAN, Z. 1989. Influence of cold storage on milk chemical aspects. Scienza e Técnica Lattiero-Caesaria. 40: 340-363
36. RESBANI, J. 1997. Seminario regional de calidad de leche. Atlántida. 248p.
37. RAYNAL, K.; REMEUF, F. 2000. Effect of storage at 4 °C on the physicochemical and renneting properties of milk: a comparison of caprine, ovine and bovine milks. Journal of Dairy Research. 67: 199-207.
38. ROBYT, J.; WHITE, B. 1990. Electrophoretic Techniques. In: Robyt, J.; White, B. Biochemical Techniques. Theory and Practice. Iowa State University. Waveland Press, Inc. pp 129-157.
39. SASAHARA, K.; ZOTTOLA, E. 1993. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. Journal of Food Protection. 56 (12): 1022-1028.

40. SILVEIRA, I.; PINHEIRO, E.; TEIXEIRA, D. 1998. Influencia de microorganismos psicotróficos sobre a qualidade do leite refrigerado. *Higiene Alimentar*. 12 (55): 21-27.
41. SUHREN, G. 1989. Producer microorganisms. In: *Enzymes of psychrotrophs in raw food*. Mc Kellar, R. Florida, CRS Press. pp. 3-34.
42. TIRARD-COLLET, P.; ZEE, J.; CARMICHAEL, L.; SIMARD, R. 1991. A study of the microbiological quality of goat milk in Quebec. *Journal of Food Protection*. 54 (4): 263-266.
43. VIEJO, J. 2000. Importancia de los psicrótrofos en la leche y sus productos. Monografía del primer año del Master en Ciencia e Ing. de los Alimentos. Colonia, Uruguay. Centro Politécnico del Cono Sur. 120 p.