

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

EVALUACIÓN DEL CO₂ EN EL CONTROL DE MICROORGANISMOS
PSICRÓTROFOS Y TERMODÚRICOS EN LA LECHE CRUDA REFRIGERADA

por

Amyra RUIZ DEL RÍO
Isabel TOLEDO PINO

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

MONTEVIDEO
URUGUAY
2007

Tesis aprobada por:

Director:

Dr. Stella REGINENSI

Ing Agr. Jorge BERMUDEZ

Ing Agr. Andrés GANZABAL

Fecha:

Autor:

Amyra RUIZ DEL RÍO

Isabel TOLEDO PINO

AGRADECIMIENTOS

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

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

A Juan Pablo Damián y María Noel Pérez por el apoyo recibido en los análisis de electroforesis.

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

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1 LA LECHERÍA EN EL URUGUAY	1
1.2 OBJETIVOS	3
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	5
2.1 DEFINICIÓN DE LECHE	5
2.2 CARACTERISITICAS DE LA LECHE	5
2.3 COMPOSICIÓN DE LA LECHE	7
2.3.1 <u>Composición química de la leche</u>	7
2.3.1.1 Carbohidratos	10
2.3.1.2 Proteínas	10
2.3.1.3 Lípidos	11
2.3.1.4 Vitaminas y minerales.....	12
2.3.2 <u>Propiedades físicas y organolépticas de la leche.</u>	13
2.3.2.1 Color.....	13
2.3.2.2 Sabor.....	13
2.3.2.3 Olor.....	13
2.3.2.4 Textura	14
2.3.2.5 Densidad	14
2.3.2.6 Punto de congelamiento	14
2.3.2.7 Punto de ebullición	14
2.3.2.8 pH.....	14
2.4 CALIDAD	15
2.4.1 <u>Pago por calidad de leche</u>	17
2.5 MICROBIOLOGÍA DE LA LECHE CRUDA.....	18
2.5.1 <u>Microorganismo psicrótrofos</u>	21
2.5.2 <u>Microorganismos termodúricos y termofílicos</u>	22
2.5.3 <u>Bacterias Coliformes</u>	23
2.6 FUENTES DE CONTAMINACIÓN DE LA LECHE CRUDA	24

2.6.1	<u>Interior de la glándula mamaria</u>	24
2.6.2	<u>Exterior de la glándula mamaria</u>	24
2.7	OTROS FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD DE LA LECHE	28
2.7.1	<u>Condiciones de almacenamiento en el establecimiento lechero</u>	28
2.7.2	<u>Condiciones de transporte</u>	30
2.7.3	<u>Lipólisis</u>	31
2.7.3.1	Lipólisis espontánea	33
2.7.3.2	Lipólisis inducida.....	34
2.7.4	<u>Proteólisis</u>	36
2.8	MÉTODOS DE CONTROL (HIGENIZACIÓN DE LA LECHE)	38
2.8.1	<u>Tratamiento térmico</u>	38
2.8.2	<u>Activación de sistema Lactoperoxidasa</u>	39
2.8.3	<u>Inoculación con Lactococcus Lactis</u>	39
2.8.4	<u>Adición de Dióxido de carbono</u>	40
3	<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	45
1.1	PROCEDIMIENTO	45
3.1.1	<u>Análisis microbiológico</u>	45
3.1.2	<u>Análisis del deterioro proteico (SDS - PAGE)</u>	48
4	<u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	50
4.1.	RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ANALISIS MICROBIANO	50
4.2.	RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ANALISIS DE DETERIORO PROTEICO	59
5	<u>CONCLUSIONES</u>	64
6	<u>RESUMEN</u>	65
7	<u>SUMMARY</u>	66
8	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	67

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Composición promedio de leches de varios mamíferos	6
2. Composición de la leche en porcentaje	7
3. Composición química de la leche según raza	8
4. Composición de carbohidratos en la leche	10
5. Composición de proteínas en la leche	11
6. Composición de los lípidos de la leche	12
7. Composición de minerales en la leche	12
8. Bonificaciones de CONAPROLE por calidad	18
9. Clasificación de microorganismos según temperaturas de crecimiento	21
10. Composición de la solución gel para realizar la electroforesis	49
11. Resultado de los recuentos totales	51
12. Variación promedio del pH de la leche en el tiempo	58
 Diagrama No.	
1. Componentes de la leche	9
2. Principales mecanismos que pueden intervenir en la lipólisis de la leche	32
3. Procedimiento para el análisis de las muestras	47
4. Preparación de las muestras para la realización de la electroforesis	48
 Gráfico No.	
1. Remisión de leche (millones de litros) según año	2
2. Evolución de la exportaciones (millones de dólares) según producto	3
3. Crecimiento bacteriano en leches inoculadas con 50000 bacterias en función del tiempo para diferentes temperaturas	29
4. Recuento de Mesófilos aerobios totales en relación al tiempo	52
5. Recuento de termófilos totales en relación al tiempo...	53
6. Recuento de termodúricos en relación al tiempo	55
7. Recuento de Psicrótrofos totales en relación al tiempo	56

1. INTRODUCCIÓN

El gran cambio sufrido en los últimos años por los sistemas de ordeño, conservación y recolección de leche, de aquellos tradicionales de ordeño a mano y recogida de la leche sin refrigerar, a los modernos sistemas de ordeño mecánico, refrigeración y almacenamiento de la leche refrigerada, con la posterior recolección en cisternas, ha provocado un marcado cambio, no sólo en las características físico-químicas de la leche, sino también en relación a la microflora producida.

Estos cambios se refieren a aquellos provocados por microorganismos que conservan su actividad a bajas temperaturas. Ellos, o sus enzimas, pueden causar daños considerables a la leche y, en consecuencia, a los productos lácteos.

Las enzimas generadas por psicrotrofos son termoestables y soportan temperaturas de pasteurización y hasta de tratamientos con altas temperaturas como UHT.

Por esta razón es importante evaluar métodos que pueden contribuir a conservar la leche de una manera más higiénica, minimizando las pérdidas que estas enzimas causan en los productos terminados como leches en polvo, UHT, manteca y otros.

Dado que estos productos constituyen la mayoría de los productos exportados y que las exportaciones de productos lácteos en nuestro país representan más de la mitad de la producción total, es necesario considerar las diferentes alternativas tecnológicas.

Para poder ser competitivos en los mercados intencionales se deben generar productos de excelente calidad, que contemplen las necesidades de los clientes cada vez más exigentes.

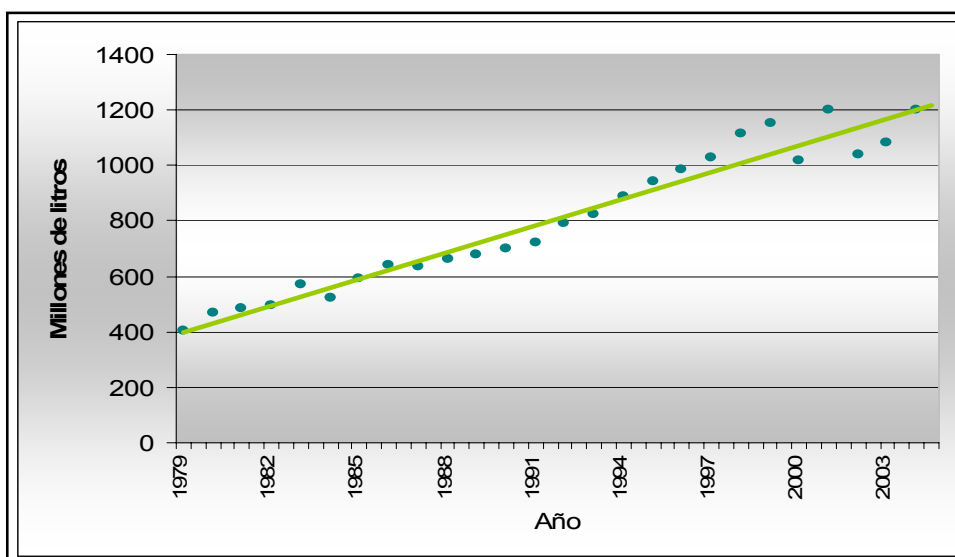
1.1 LA LECHERÍA EN EL URUGUAY

Desde mediados de la década del setenta la lechería en Uruguay ha sufrido una evolución que la ha llevado a duplicar su producción de 723 millones de litros en 1975 y 1.592 millones en el 2004. Este progreso es debido a la adopción de diferentes tecnologías que ha permitido al sector productivo a presentar una mayor eficiencia en la producción y a la generación de los sistemas de pago por calidad que han favorecido no sólo el crecimiento productivo, sino la mejora de la calidad higiénica y de la composición de la leche.

Desde 1996 en el país quedó establecido que toda la leche que fuera a bonificarse por calidad debería ser medida y clasificada mediante análisis de laboratorio (recuento microbiano y células somáticas). La leche calidad "A" constituía el 64,9 % de la leche total remitida, esta fue adquiriendo mayor proporción hasta alcanzar el 94 % en el año 2001.

Uruguay presenta 2.2 % de la producción mundial de leche y tiene la mayor producción de leche por habitante de Latinoamérica 450 litros /hab./año.

GRAFICO 1 Remisión de leche (millones de litros) según año

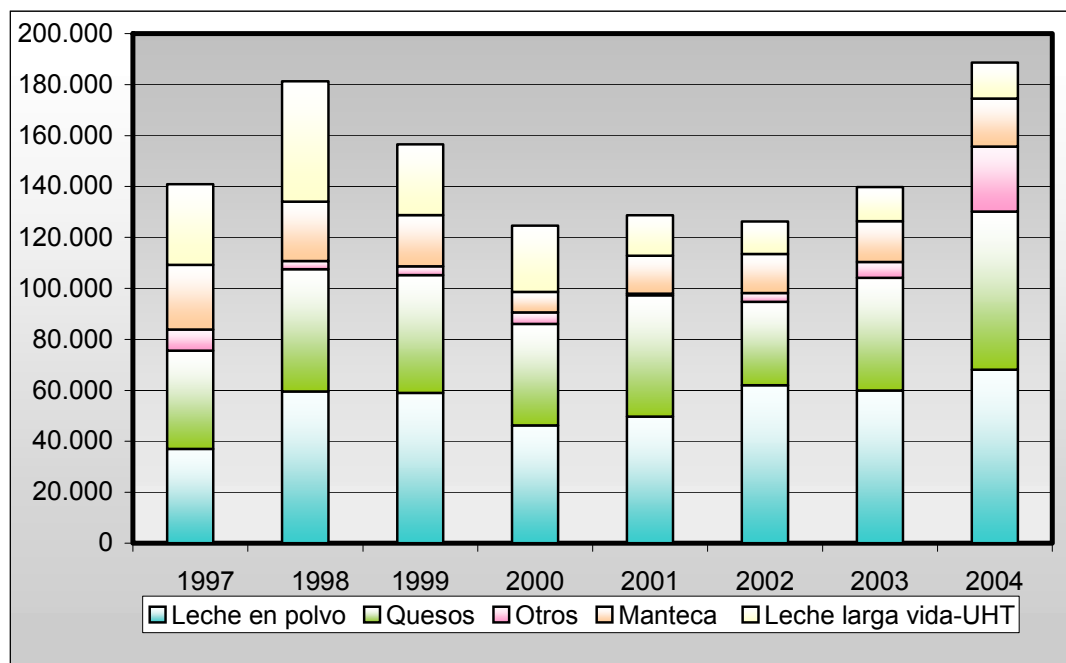


Fuente: URUGUAY. MGAP. DIEA (2005)

La evolución sostenida en el tiempo a provocado un dinamismo en las industrias lácteas que han tenido que adaptarse para poder procesar cada vez mas grandes volúmenes de leche. Las industrias procesan el 80 % de la leche producida en el país y esta proviene del 56 % de los tambos.

Esto produjo cambios importantes en los productos elaborados y más específicamente en el destino de los mismos. La lechería se consolidó en exportaciones y adquirió un rol importante como generador de divisas (Hernández, 2003).

GRAFICO 2 Evolución de la exportaciones (millones de dólares) según producto



Fuente: URUGUAY. MGAP. DIEA (2005)

Es importante destacar que no sólo las exportaciones aumentaron sino que la lechería ha pasado a ser un rubro exportador por excelencia ya que más del 50% de su producción se destina a mercados extranjeros.

Uruguay se ubica como el quinto país exportador del mundo y el primer exportador de lácteos de latino América.

Este perfil exportador nos pone de cara a las cada vez más elevadas exigencias de los mercados internacionales, en cuanto a la calidad de nuestros productos y la creación de nuevos productos que pueden responder a las necesidades específicas de los consumidores.

1.2 OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo pretende analizar la dinámica de contaminantes bacterianos y el efecto del uso de anhídrido carbónico sobre el deterioro de la leche refrigerada.

Los objetivos específicos son:

- Evaluar el nivel de contaminación bacteriana (ufc/mL) de la leche proveniente del tanque de frío y refrigerada a 7° C durante 144 horas.
- Determinar el efecto de la aplicación de anhídrido carbónico sobre el recuento microbiano.
- Analizar el deterioro de las caseínas por electroforesis a las 48, 72 y 144 horas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 DEFINICIÓN DE LECHE

La secreción láctea proveniente de las glándulas mamarias de los mamíferos es un líquido de composición compleja, de color blanquecino y opaco, con un pH cercano al neutro y de sabor dulce. Su propósito natural es la alimentación de la cría durante sus primeros meses de vida (Magariños, 2000).

Desde un punto de vista legal la leche es el producto integro procedente del ordeño completo, ininterrumpido de una hembra lechera en buen estado de salud, bien alimentada y no cansada; por consiguiente se consideran impropias para el consumo humano las leches procedentes de animales enfermos y mal nutridos, así como las que contengan calostros (Congreso Internacional de la Represión de los Fraudes Alimentarios, citado por Alais, 1985).

2.2 CARACTERISITICAS DE LA LECHE

Las principales características de la leche son la variabilidad, alterabilidad y complejidad.

La variabilidad de la misma se debe a las diferencias existentes entre las diferentes especies y razas, así como las variaciones dentro del transcurso del ciclo de la lactación, la alimentación y el ambiente en general.

CUADRO 1 Composición promedio de leches de varios mamíferos

COMPOSICIÓN PROMEDIO DE LECHE DE VARIOS MAMÍFEROS* (PORCENTAJE)						
	GRASA	PROTEINA	LACTOSA	CENIZAS	S.N.G.**	S.T.***
Humana	3,75	1,63	6,98	0,21	8,82	12,57
Vaca	3,70	3,50	4,90	0,70	9,10	12,80
Cabra	4,25	3,52	4,27	0,86	8,75	13,00
Oveja	7,90	5,23	4,81	0,90	11,39	19,29
Búfalo	7,38	3,60	5,48	0,78	9,86	17,26
Yegua	1,59	2,69	6,14	0,51	9,37	10,96
Burra	2,53	2,01	6,07	0,41	8,44	10,97
Reno	2,46	10,30	2,50	1,44	14,24	36,70

* Weeb and Johnson, 2a. ed.
 ** Sólidos no grasos
 *** Sólidos totales

Fuente: Magariños (2000)

Respecto a la alterabilidad, por su composición, la leche es un adecuado medio para el desarrollo de microorganismos que provocan cambios en sus componentes.

En general, puede decirse que los riesgos a que está sometida la leche entre su síntesis en la glándula mamaria y su llegada al consumidor incluyen:

- Contaminación y multiplicación de microorganismos,
- Contaminación específica por gérmenes patógenos,
- Alteración fisicoquímica de sus componentes,
- Absorción de olores extraños,
- Generación de malos sabores,
- Contaminación con sustancias químicas (pesticidas, antibióticos, metales, detergentes, desinfectantes) y partículas de suciedad (Magariños, 2000).

La complejidad de la leche se debe a su compleja composición fisicoquímica que incluye:

- Suspensiones coloidales de pequeñas partículas sólidas de caseína (micelas)

- Una emulsión de glóbulos de grasa de la leche y de vitaminas liposolubles que se mantienen en suspensión;
- Una solución de lactosa, proteínas solubles en agua, sales minerales y otras sustancias (Homan et al., 1998).

2.3 COMPOSICIÓN DE LA LECHE

2.3.1 Composición química de la leche

La leche vacuna esta compuesta por un 85 – 90 % de agua el resto son sólidos integrados por:

CUADRO 2 Composición de la leche en porcentaje

	%
Lactosa	4.5 – 4.8
Grasa butirosa	3.0 – 5.0
Proteína Bruta	2.6 – 4.0
Minerales	0.6 – 0.7
Sólidos Totales	10.0 – 14.0

Fuente: Homan et al. (1998)

Estos valores representan los rangos dentro de los cuales se encuentran los sólidos más importantes en las razas lecheras, dichos rangos señalan a la genética como uno de los factores más importantes que afectan la composición química de la leche. En el siguiente cuadro se muestran estas diferencias para las razas lecheras más comunes.

CUADRO 3 Composición química de la leche según raza

RAZA	GRASA	PROTEINA	LACTOSA	CENIZA	SNG*	ST**
Ayrshire	4,00	3,53	4,67	0,68	8,90	12,90
Brownswiss	4,01	3,61	5,04	0,73	9,40	12,41
Guernsey	4,95	3,91	4,93	0,74	9,66	14,61
Holstein F.	3,40	3,32	4,87	0,68	8,86	12,26
Jersey	5,37	3,92	4,93	0,71	9,54	14,91

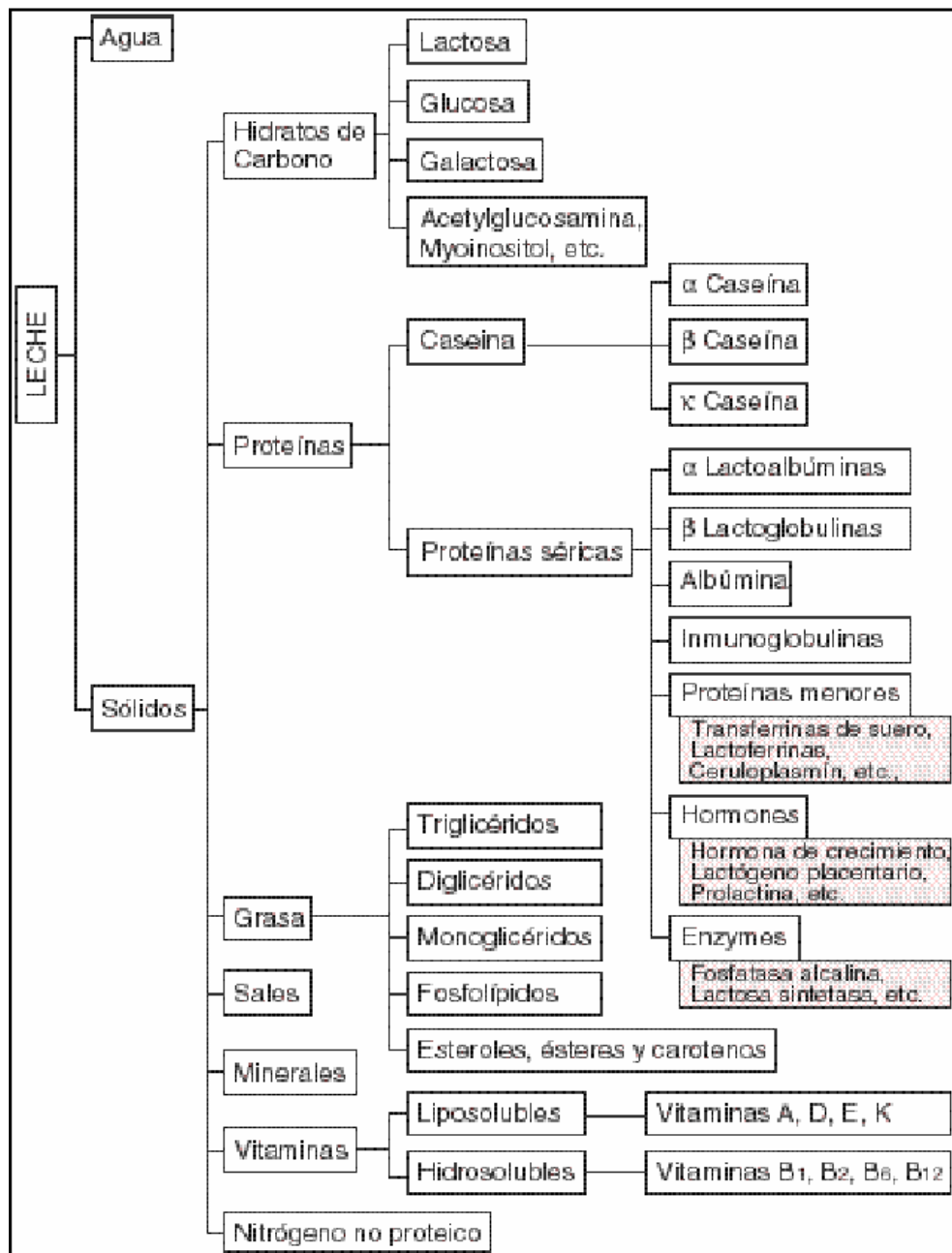
* Sólidos No Grasos

** Sólidos Totales

Fuente: Magariños (2000)

A continuación se presenta un diagrama ejemplificando los componentes de la leche.

DIAGRAMA 1 Componentes de la leche



Fuente: Homan et al. (1998)

2.3.1.1 Carbohidratos

El principal hidrato de carbono de la leche es la lactosa, representa el 52 % del total de sólidos de la leche y el 70 % de los sólidos del suero. Posee el doble de valor calórico que la glucosa. Los demás carbohidratos se encuentran en cantidades muy pequeñas en comparación con este, como se puede visualizar en el cuadro siguiente.

CUADRO 4 Composición de carbohidratos en la leche

HIDRATOS DE CARBONO	mg/ 100 mL
Lactosa	5000
Glucosa	14
Galactosa	12
Myoinositol	4 - 5
N-acetylglucosamina	11
Acido N-acetylneuraminic	4 - 5
oligosacaridos de la lactosa	0 - 10

Fuente: Homan et al. (1998)

La lactosa determina la producción de leche, ya que en función de la presión osmótica define el volumen producido (Homan et al., 1998).

2.3.1.2. Proteínas

El nitrógeno se encuentra en la leche de dos maneras como proteína verdadera y como nitrógeno no proteico.

Existe una estrecha relación entre la cantidad de grasa y la de proteína, cuanto mayor cantidad de grasa existe, habrá mayor cantidad de proteína.

Las proteínas se clasifican dentro de dos grandes grupos: caseínas y proteínas séricas.

CUADRO 5 Composición de proteínas en la leche

PROTEINAS	%
Proteínas séricas	19
A – caseínas	45
β – caseínas	24
K – caseínas	12

Fuente: Homan et al. (1998)

Las caseínas representan el 80 % de la proteína de la leche. Se encuentran en forma de micelas que no se ven afectadas por el calentamiento y permanecen bastante estable a lo largo de la pasteurización, aún así, cambios en la acidez de la leche rompen la estructura de las micelas y hacen que la caseína se precipite y forme un coágulo. Las caseínas son ricas en aminoácidos esenciales.

Las proteínas séricas se encuentran en solución en la fracción acuosa de la leche, estas generalmente se encuentran más afectadas por el calor y menos afectadas por los cambios de acidez que las caseínas. A medida que la leche se calienta, las proteínas séricas tienden a adherirse a las micelas de caseína.

Las enzimas presentes en la leche desempeñan un gran número de funciones. Las lipasas y proteasas pueden atacar la grasa y proteína de la leche y son responsables de la pérdida de sabor y el cambio de las características a medida que estas sustancias se degradan (Homan et al., 1998).

2.3.1.3 Lípidos

Los lípidos forman entre 3.5 % a 5.25 % de la leche, las variaciones dependen de la nutrición y la razas. La grasa se encuentra presente en la leche como pequeños glóbulos en suspensión en el agua; el tamaño de dichos glóbulos es una característica de la raza, a medida que la lactancia progresa, el tamaño de los glóbulos tiende a decrecer. Cada glóbulo se encuentra rodeado por una capa de fosfolípidos, que tienden a impedir que se unan entre sí, atrayendo el agua.

La mayor parte de lípidos de la leche se encuentran en forma de triglicéridos. La leche contiene predominantemente ácidos grasos de cadena corta unidos por un ácido acético. Los ácidos grasos de cadena larga son principalmente insaturados siendo el oleico el predominante y los polinsaturados el linoleico y linolénico. A continuación se presenta los porcentajes de los diferentes lípidos en la leche

CUADRO 6 Composición de los lípidos de la leche

LIPIDOS	%
Triglicéridos	97
Diglicéridos	0,3 -0,5
Monoglicéridos	0,02 -0,04
Fosfolípidos	1
esteroles, esterolésteres, etc	0,3 - 0,8

Fuente: Homan et al. (1998)

La fracción grasa de la leche sirve como transportador de las vitaminas liposolubles, colesterol y otras sustancias liposolubles como los carotenoides que le otorgan a la grasa de la leche su color cremoso amarillento.

2.3.1.4 Vitaminas y minerales

Las vitaminas presentes en la leche, además de las liposolubles A, D, E y K, son las del complejo B y la vitamina C.

Los minerales de la leche se determinan en sus cenizas. Los más importantes son el calcio, fósforo, sodio, potasio y cloro. En pequeñas cantidades se encuentran presentes hierro, yodo, cobre, manganeso y zinc. La proporción de los diferentes minerales se presenta a continuación en el cuadro 7

CUADRO 7: Composición de minerales en la leche

MINERALES	Mg/100 mL
Calcio	125
Magnesio	12
Sodio	58
Potasio	138
Cloro	103
fósforo	96
Citrato	175
Sulfato	30
Otros *	< 0,1

Fuente: Homan et al. (1998)

* Incluye arsénico, boro, cobalto, cobre, hierro, magnesio, molibdeno, sílice, zinc, bromo, yodo y otros

2.3.2 Propiedades físicas y organolépticas de la leche.

2.3.2.1 Color

El color normal de la leche es blanco, el cual se atribuye a reflexión de la luz por las partículas del complejo caseinato - fosfato – cálcico en suspensión coloidal y por los glóbulos de grasa en emulsión. Aquellas leches que han sido parcial o totalmente descremadas o que han sido adulteradas con agua, presentan un color blanco con tinte azulado. Las leches de retención o mastíticas presentan un color gris amarillento. Un color rosado puede ser el resultado de la presencia de sangre o crecimiento de ciertos microorganismos. Otros colores pueden ser producto de contaminación con sustancias coloreadas o de crecimiento de ciertos microorganismos. Una leche adulterada con suero de quesería puede adquirir una coloración amarilla – verdosa debido a la presencia de riboflavina (Universidad de Zulia, 2006).

2.3.2.2 Sabor

El sabor natural de la leche es difícil de definir, normalmente no es ácido ni amargo, sino más bien ligeramente dulce gracias a su contenido en lactosa. A veces se presenta un cierto sabor salado por la alta concentración de cloruros que tiene la leche de vaca que se encuentra al final del período de lactancia o que sufren estados infecciosos de la ubre (mastitis), otras veces el sabor se presenta ácido cuando el porcentaje de acidez en el producto es superior a 22-33 ml de NaOH 0.1 N/100 ml (0.2-0.3% de ácido láctico). Pero en general, el sabor de la leche fresca normal es agradable y puede describirse simplemente como característico (Universidad de Zulia, 2006).

2.3.2.3 Olor

El olor de la leche es característico y se debe a la presencia de compuestos orgánicos volátiles de bajo peso molecular, entre ellos, ácidos, aldehídos, cetonas y trazas de sulfato de metilo. La leche puede adquirir con cierta facilidad sabores u olores extraños, derivados de ciertos alimentos consumidos por la vaca antes del ordeño, de sustancias de olor penetrante o superficies metálicas con las cuales ha

estado en contacto o bien de cambios químicos o microbiológicos que el producto puede experimentar durante su manipulación (Universidad de Zulia, 2006).

2.3.2.4 Textura

La leche tiene una viscosidad de 1.5 a 2.0 centipoises a 20 °C, ligeramente superior al agua (1.005cp). Esta viscosidad puede ser alterada por el desarrollo de ciertos microorganismos capaces de producir polisacáridos que por la acción de ligar agua aumentan la viscosidad de la leche (leche mastítica) (Universidad de Zulia, 2006).

2.3.2.5 Densidad

La densidad de la leche entera depende del contenido de grasa y proteína. El agua posee una densidad de 1 gr / mL., pero la densidad de la grasa es menor que la del agua y la de los sólidos no grasos es superior a la del agua. El mantener la leche a diferentes temperaturas puede afectar la medición de la densidad. A medida que la leche se calienta, su estructura globular cambia y la densidad decrece (Homan et al., 1998).

2.3.2.6 Punto de congelamiento

El punto de congelamiento de la leche varía muy poco; es de -0,555 ° para la leche de vaca. Es una de las características mas constantes y su determinación se utiliza para revelar el fraude, se ha señalado variaciones normales entre 0.530 y 0.575 estas diferencias se explican por las variaciones estacionales y la influencia del contenido en sales de la ración.

Sobre el punto crioscópico tienen influencia diversos tratamientos industriales como la pasteurización o de tipo UHT (Alais, 1985).

2.3.2.7 Punto de ebullición

La leche hierve por encima de los 100 °C entre 100.15 °C y 100.17 °C En el curso del calentamiento se producen cambios en el equilibrio de los estados (iones, moléculas y micelas) (Alais, 1985).

2.3.2.8 pH

La leche de vaca tiene una reacción iónica cercana a la neutralidad comprendido entre (6.6 - 6.8) como consecuencia de la presencia de caseína y de

los aniones fosfóricos y cítrico principalmente. El pH no es un valor constante, sino que puede variar en el curso del ciclo de la lactación y bajo la influencia de la alimentación. Con todo, la amplitud de las variaciones es pequeña dentro de una misma especie (Alais, 1985).

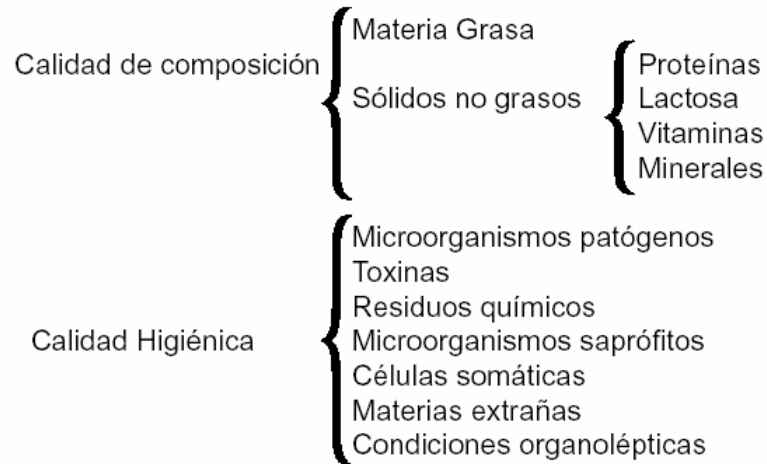
2.4 CALIDAD

En la definición de la calidad de la leche existen diferentes enfoques, lo cual demuestra lo amplio del concepto. En algunos casos se prefiere definir a la calidad de acuerdo a la composición química de la leche; en otros casos, la condición microbiológica de la leche cruda, incluso las propiedades físicas.

Desde el punto de vista de la industria láctea, los aspectos de composición química global, las relaciones de sus componentes y el contenido de microorganismos en la leche cruda son los elementos centrales que involucran a este concepto. Una leche cruda de buena calidad puede ser procesada para la obtención de un producto de buena o mala calidad, sin embargo, cuando la leche es de mala calidad únicamente se obtendrán productos de baja calidad (Reginensi et al., 2004).

La simple definición fisiológica común o legal de leche no basta para evaluar la calidad de la materia prima a adquirir desde el momento que se considera la leche como una materia prima para el abastecimiento de unidades industriales.

Para definir el concepto de calidad de leche deben tenerse presente los siguientes factores:



Las variaciones de composición debidas a los factores humanos que influyen en el manejo y la producción o debidas a las condiciones climáticas y factores fisiológicos normales de los animales que intervienen en la secreción determinan, la necesidad de adoptar una clasificación que permita apreciar las leches según sus características propias y según el valor que puedan tener en relación a la utilización que se les pretende dar.

La calidad de la leche es uno de los pilares fundamentales de una industria lechera desarrollada y comprende ganado sano bien alimentado y criado, leche con una capacidad de conservación adecuada para su transporte a la industria, y composición óptima. Las citadas cualidades redundarán en beneficio de todos:

- al productor, ya que recibirá mayores ingresos económicos por una mayor producción de leche, evitando pérdidas de todo orden y en los casos en que exista un pago de leche en base a la calidad, mayores ingresos por este concepto.
- para la industria lechera, debido a que la calidad de la leche resultará de un nivel tal que no será necesario el desvío de suministros insatisfactorios a otros usos, mayor valor de utilización y mejor calidad de los productos terminados,
- para el consumidor porque recibirá un producto de alto valor nutricional y sin riesgo para la salud (Magariños, 2000).

2.4.1 Pago por calidad de leche

Los objetivos de un pago de calidad de la leche son:

- asegurar a los productores un pago equitativo de la leche que suministran a la industria compradora de acuerdo a la calidad real del producto,
- producir, mediante el pago diferenciado por calidad, el estímulo económico necesario para lograr un mejoramiento efectivo de la composición del producto y de sus condiciones higiénicas.

El pago de leche cruda según su calidad ha constituido en todos los países con una actividad lechera desarrollada, una herramienta fundamental para alcanzar niveles de excelencia en cuanto a volumen de producción total, la calidad y éxito comercial de sus productos lácteos.

En nuestro país el sistema de pago fue variando hasta llegar al actual sistema de pago por calidad. Anteriormente desde el año 1976 y hasta el año 1997 fue utilizado el pago de un sobreprecio de 10% según la prueba de reductasa y lactofiltro. Este sistema mejoró sensiblemente la calidad de la leche remitida.

En el año 1995 se elaboró el Decreto del poder ejecutivo N° 21/995, que fija una normativa genérica para el establecimiento de un Sistema Nacional de Calidad de Leche. En el transcurso del primer trimestre de 1997 se empezó a pagar la leche por recuento bacteriano y células somáticas. En la actualidad cada empresa define sus bonificaciones en el caso de CONAPROLE se paga a los productores según el siguiente criterio que fue implantado a partir del año 2004 (cuadro 8).

CUADRO 8 Bonificaciones de CONAPROLE por calidad

		Nº Celulas somaticas				
		0 - 400000	400001 - 700000	700001 - 800000	800001 - 900000	900001 - 1000000
Recuento bacteriano (*)	0 - 50000	18%				
	50001 - 100000	17,9 - 5 %				
	100001 - 120000	7,5 - 2,5 %				
	120001 - 200000	sin bonificación				
	200001 - 500000	-10%				
	500001 - 800000	-20%				
	> 800000	-30%				

(*) Ufc/ ml

2.5 MICROBIOLOGÍA DE LA LECHE CRUDA

La leche constituye un excelente medio de cultivo para determinados organismos, sobre todo para las bacterias mesófilas y, dentro de éstas, las patógenas, cuya multiplicación depende principalmente de la temperatura y de la presencia de otros microorganismos competitivos o de sus metabolitos.

Debe tenerse presente que la leche es un producto biológico obtenido de animales y, por lo tanto, plantea problemas de origen en su contaminación ya que a la salida de la glándula mamaria este producto trae presentes microorganismos que condicionan su posterior manejo. A lo anterior, debe sumarse la contaminación producida durante el manejo en el ordeño, transporte y elaboración, proceso donde la leche pasa por muchas personas y elementos.

Evitar la contaminación y posterior proliferación de los microorganismos en la leche es un constante problema para quienes tienen a su cargo la producción y elaboración de este producto.

Si se pretende obtener leche de buena calidad microbiológica, la atención debe centrarse en los procesos de producción, mantener las vacas con una

adecuada sanidad, muy especialmente en lo que a mastitis se refiere. El origen de la contaminación microbiana de la leche puede provenir tanto de la ubre como del medio ambiente y equipo de ordeño.

El número y los tipos de microorganismos presentes en la leche recién ordeñada, refleja directamente la contaminación microbiana durante su obtención. El recuento de microorganismos de la leche cuando abandona el tambo depende de la microflora inicial, de la temperatura a la cual la leche se ha enfriado, de la temperatura a la que se ha almacenado y del tiempo transcurrido hasta la recolección (Cousins y Bramley, 1987).

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 temperatura de la leche durante su transporte y almacenamiento es uno de los factores más importantes que afectan el crecimiento bacteriano y por lo tanto determinan su tiempo de conservación. Este factor influye igualmente en los tipos de microorganismo que se desarrollan y por ende en los cambios o tipos de descomposición que experimentan el producto.

Cuando la leche se mantiene a temperatura normal, sin refrigeración generalmente experimenta acidificación debido al crecimiento de bacterias lácticas (flora normal) con producción de ácido láctico por fermentación de la lactosa, bajando el pH e inhibiendo así el desarrollo de otros microorganismos y ocasionando la precipitación de la caseína al acercarla a su punto isoeléctrico (pH 4,6). Estos microorganismos reciben el nombre de mesófilos por tener temperaturas óptimas de crecimiento entre la de un ambiente normal y la temperatura corporal (Universidad de Zulía, 2006).

Si la leche cruda se conserva a temperaturas de refrigeración, la velocidad de acidificación se reduce al disminuir el crecimiento de las bacterias lácticas comunes (*Lactococcus lactis*). Es probable que ocurran ciertos cambios en el sabor y olor produciéndose proteólisis láctea por acción de gérmenes capaces de crecer a temperaturas relativamente bajas, estos microorganismos reciben la denominación de psicrófilos y psicrotrofos (Universidad de Zulía, 2006).

Cuando la leche cruda es sometida a la pasteurización comercial, aproximadamente un 95-99% de los microorganismos son destruidos, entre ellos todos los patógenos, pero pueden sobrevivir ciertos gérmenes termorresistentes, no patógenos que se han clasificado en dos grupos: termófilos que son capaces

de reproducirse a temperatura de pasteurización baja (63°C/30 min), y los termodúricos, que resisten la pasteurización por ejemplo *Bacillus* (Universidad de Zulia, 2006).

No todos los microorganismos crecen a la misma temperatura. Según la temperatura óptima de crecimiento se pueden distinguir tres grupos: los mesófilos, los psicrófilos y los termófilos. Al grupo de las bacterias Mesófilas pertenece la mayoría de la flora que se encuentra con mayor frecuencia en la leche, principalmente las bacterias lácticas. Bacterias Psicrófilas son las que crecen a temperaturas de refrigeración. Son bacterias psicrófilas los miembros del género *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*. Bacterias termófilas son aquellas que crecen bien a temperaturas entre 45 a 55 °C, en este grupo están el *Lactobacillus bulgaricus*, *L. fermenti*, *L. Lactis*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*. Otro grupo que merece ser descrito lo constituyen las bacterias termodúricas que son bacterias en su mayoría mesófilas que resisten temperaturas de pasteurización; algunas de ellas son termófilas. Se encuentran en este grupo los *Micrococcus*, *Microbacterium*, esporas de *Bacillus* y *Clostridium* (Universidad de Zulia, 2006).

Los microorganismos psicrotrofos y los termotrofos, son microorganismos mesófilos pero que igualmente pueden crecer a temperaturas bajas o altas, respectivamente (ver cuadro 9).

La temperatura a la cual se encuentra la leche después del ordeño favorece la rápida multiplicación microbiana. La mayor proporción de la flora bacteriana presente, son microorganismos mesófilos, es por ello que la inmediata refrigeración a temperaturas de 4 a 5 °C se hace fundamental para asegurar la calidad de la leche. Pero su almacenamiento no debe ser prolongado (máximo 24 horas) ya que entonces se favorecería el aumento en número de la flora psicrotrofa. Cuando la leche no vaya a ser procesada el mismo día de recepción debe ser sometida a un proceso de termización

A continuación se presenta un cuadro con las temperaturas de crecimiento de los diferentes tipos de microorganismos

CUADRO 9 Clasificación de microorganismos según temperaturas de crecimiento

Grupos	Tª Min	Tª OPTIMA	Tª Máx
Termófilos	40-45	55-75	60-90
Termotrofos	15-20	30-40	45-50
Mesófilos	5-15	30-40	40-47
Psicrófilos	-5-+5	12-15	15-20
Psicrotrofos	-5-+5	25-30	30-35

Fuente: Robinson (1987)

2.5.1 Microorganismo psicrótrofos

En microbiología general se define con el nombre de bacterias psicrótrofos aquellas que crecen “mejor” a temperaturas de refrigeración. En las industrias lácteas, el término se aplica a las bacterias que se desarrollan relativamente rápido a temperaturas por debajo de 15° C, aun cuando su temperatura óptima esta por encima de ese valor. Son gérmenes no patógenos, pero que al crecer lentamente a bajas temperaturas (1-10 °C) ocasionan problemas en el almacenamiento de muchos productos lácteos, originando recuentos bacterianos elevados que a su vez determinan disminución de la calidad de la leche, y a menudo producen sabores u olores extraños descritos corrientemente como “a sucio”, “a frutas”, “rancia”, “agrio”, “pútrido”, etc. Tales alteraciones generalmente ocurren cuando los recuentos de estos microorganismos llegan a 5-20 millones/mL y se deben a su acción sobre los sustratos más importantes de la leche, especialmente sobre las proteínas y las grasas (Universidad de Zulia, 2006), ya que los psicrótrofos producen proteasas extracelulares, lipasas y fosfolipasas: algunas enzimas pueden sobrevivir la pasteurización e incluso el tratamiento UHT (Braun et al., citados por Munsch–Alatossava, 2006).

En estos grupos de bacterias están incluidas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* y *Acinetobacter* e incluso algunas cepas de *Enterobacter*, que pueden encontrarse en el polvo (suelo), agua, vegetales y equipos de ordeño o de la planta mal en mala higienización y sanitización. Se presentan como bacilos Gram negativos, no esporulados que se destruyen fácilmente por el calor (Universidad de Zulia, 2006).

Los microorganismos psicrótrofos, invariablemente contaminan la leche cruda en el tambo o en la planta, ellos constituyen parte de la flora normal de la leche cruda, al igual que los coliformes, termodúricos y termofílicos. Los métodos modernos de conservación de la leche cruda en tanques refrigerados a nivel de tambo, favorecen el crecimiento de estos gérmenes y retardan el desarrollo de las bacterias lácticas (Universidad de Zulia, 2006).

Afortunadamente, bajo buenas condiciones de producción y conservación no alcanzan a desarrollarse en números capaces de ocasionar los problemas mencionados y además se destruyen por la pasteurización, con excepción de algunos, que pueden sobrevivir al tratamiento térmico y crecer luego a temperaturas por encima de 7 °C (Universidad de Zulia, 2006).

2.5.2 Microorganismos termodúricos y termofílicos

Las bacterias termodúricas son microorganismos termoresistentes, generalmente mesofílicos, en su mayoría no esporulados, que frecuentemente se presentan en la leche cruda bajo malas condiciones sanitarias o procesada en plantas mal limpiadas y/o que utilizan malas prácticas de procesamiento. Se incluyen en este grupo el *Streptococcus termophyllus* y otros *Streptococcus* (*S. bovis*, *S. zymogenes*, *S. liquefaciens*, *S. faecalis*) así como el *Microbacterium lacticum*, ciertos *Micrococcus* y algunas especies esporuladas del género *Bacillus* (Universidad de Zulia, 2006).

Las bacterias termofílicas son aquellas que, además de resistir la temperatura de pasteurización baja, son capaces de crecer a esa temperatura. Generalmente son bacilos no esporulados, aunque no necesariamente. No son patógenas, pero su presencia en la leche es indeseable por que producen acidez, sabores desagradables y tendencia de la leche a coagular después de la pasteurización. Además, junto con los termodúricos, son responsables de recuentos bacterianos elevados en leches pasteurizadas. Crecen bien a 55°C pudiendo hacerlo hasta más de 70°C (Universidad de Zulia, 2006).

Bacillus cereus y *Clostridium* son especies capaces de replicarse a bajas temperaturas (psicrótrofos) y formar esporas. Estas son altamente resistentes, pueden sobrevivir a la pasteurización y la replicación puede continuar luego de la misma. Por lo tanto ellos contribuyen a una pobre vida en el producto causando la degradación del mismo luego de la pasteurización (Homan et al., 1998).

Sutherland, citado por Silveira et al. (1998) demostró que *Bacillus cereus* es la bacteria esporogénica mas importante en la alteración de la leche pasteurizada, almacenada a temperaturas de 6 a 20 °C.

2.5.3 Bacterias Coliformes

Dentro del llamado “grupo coliforme” se incluyen todos los bacilos Gram negativos, aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, capaces de fermentar la lactosa con producción de gas y ácido en 48 horas, en medios de cultivo sólidos o líquidos. Los géneros que integran este grupo son *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella* (Flia. *Enterobacteriaceae*), siendo las especies más importantes *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*. El primero en particular es huésped normal del tracto intestinal del hombre y los animales de sangre caliente, por lo cual se encuentra en grandes cantidades en las heces y el estiércol. El segundo (*E. aerogenes*) también se presenta en las heces, pero mas frecuentemente se origina del suelo y materia vegetal en descomposición. La presencia en el agua de estos microorganismos se considera inaceptable, asociándose con contaminación fecal y por ende con la posible presencia de otros microorganismos patógenos de origen intestinal, como por ejemplo las especies del género *Salmonella* productoras de la fiebre tifoidea y disenterías bacilares (Universidad de Zulia, 2006).

La leche cruda se contamina corrientemente con bacterias coliformes, derivadas directa o indirectamente del tracto intestinal de las vacas, animales que afortunadamente no sufren las infecciones entéricas propias del hombre. Esta contaminación puede provenir del estiércol, polvo, suelo, alimentos del ganado, agua, insectos (especialmente moscas) o del contacto con residuos lácteos que quedan en los utensilios de ordeño y tanques de transporte o almacenamiento, mal lavados y saneados; donde esas bacterias suelen desarrollarse con gran facilidad. Por estas razones, es sumamente difícil producir leche cruda libre de coliformes, dándole a su presencia una significación diferente que en el agua, y aunque es indeseable, se tolera. No obstante, altas cuentas bacterianas de coliformes son indicativas de condiciones insanas de producción, transporte o almacenamiento y producen defectos en la leche (sabores desagradables), razones suficientes para evitar su desarrollo, mediante buenas prácticas de producción (Universidad de Zulia, 2006).

En la leche pasteurizada, a diferencia de la leche cruda, la presencia de bacterias coliformes es inaceptable ya que a las temperaturas de pasteurización se destruyen. Por lo tanto, una prueba de coliformes positiva en productos lácteos pasteurizados denota mala pasteurización o contaminación post-pasteurización.

2.6 FUENTES DE CONTAMINACIÓN DE LA LECHE CRUDA

2.6.1 Interior de la glándula mamaria

Aún en el caso de que la glándula mamaria se encuentre sana, se reconoce que las primeras porciones de leche ordeñada contienen microorganismos, disminuyendo su número a medida que el ordeño avanza. Lo anterior puede verse reflejado en el ejemplo de la tabla siguiente

Leche primeras porciones 6 500 gérmenes/ml
Leche a mitad del ordeño 1 350 gérmenes/ml
Leche al final del ordeño 709 gérmenes/ml

Esto se explica porque el canal del pezón se encuentra colonizado por muchos microorganismos, como por ejemplo *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Coliformes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, entre otras.

Esta contaminación se ve acrecentada por el reflujo producido por la ordeñadora de tipo convencional, arrastrando con esto microorganismos que colonizan la punta del pezón, hacia el interior de la ubre (Magariños, 2000). Una máquina ordeñadora operada o mantenida en forma incorrecta puede causar trauma, incrementando el riesgo de infección y mastitis o puede servir como vehículo de transferencia o infección entre vacas (Homan et al., 1998).

Cuando la glándula mamaria se encuentra contaminada, especialmente en los casos de mastitis de tipo agudo, los recuentos de microorganismos pueden ser muy elevados, alcanzando valores de varios millones (Magariños, 2000).

La penetración de gérmenes en la mama ocurre de dos modos:

- Por vía ascendente, a través del canal del pezón
- Por vía “endógena”; algunos gérmenes patógenos pueden llegar a la mama por la circulación sanguínea, por ejemplo los de la tuberculosis y la brucelosis; los *Streptococcus* no pueden llegar a la mama por esta vía (Alais, 1985).

2.6.2 Exterior de la glándula mamaria

En la parte externa de la ubre y pezones, es posible detectar estiércol, barro, paja u otros residuos de la cama del animal. Si bien la flora microbiana del interior de la ubre es, casi en su totalidad, de tipo mesófilo, en el exterior se suman microorganismos psicrótrofos y termófilos, de los cuales los formadores de

esporas, tanto aerobios como anaerobios, provocan serios problemas en la industria.

Entre los microorganismos que pueden llegar a la leche por la vía externa, son importantes de señalar aquellos que son patógenos para el hombre, como el *Bacillus cereus* que tiene la capacidad de generar esporas con cierta termorresistencia y que produce cuadros tóxicos en el hombre, debido a la producción de enterotoxinas. El *Clostridium perfringens*, formador de esporas, anaerobio estricto y termorresistente, provoca problemas a nivel de la industria quesera y en la salud pública, ocasionando problemas de diarrea y fiebre.

Otras bacterias, como *Salmonella typhi*, *Shigella*, *Streptococcus A* y *Corynebacterium diphtheriae*, pueden llegar a la leche a través del hombre. Por otra parte, no se debe descartar la posibilidad de que algunos virus procedentes del hombre lleguen a través de la leche a otros individuos, como también otros microorganismos que no tienen el carácter de zoonosis como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Coliformes*, *Pseudomonas*, *Proteus* y *Corynebacterium* (Magariños, 2000).

2.6.2.1 Contaminación de la piel de la mama

Entre el tiempo que transcurre entre los ordeños los pezones se ensucian de estiércol, barro y otros. Este material constituye una fuente de contaminación para leche que será extraída. El tipo y la cantidad de los microorganismos asociados a este material variarán con el tipo y cantidad del mismo que están adheridos a los pezones. La leche de las vacas con los pezones sucios de estiércol presentará una carga bacteriana próxima a los 100000 ufc/ml, si no se han limpiado previamente en forma adecuada (Cousins et al., 1981).

El lavado de los pezones tiene un efecto positivo más importante cuando los animales se encuentran estabulados, no hallándose frecuentemente este sistema de producción en los tambos del Uruguay.

Según Bergére, citado por Cousins et al. (1981), la superficie de los pezones constituye también una fuente de esporas de clostridios. Su tasa es mucho mas baja en leche cuando los animales están pastando que aquellos que están estabulados. Derivan principalmente del alimento ensilado de pobre calidad y pueden difundirse mediante las heces a la superficie de los pezones de las vacas que lo consumen y de aquí pasar a la leche. Esto ocurre principalmente en invierno cuando los animales consumen ensilajes y cuando existe mas barro para el ingreso al tambo

Para minimizar la incidencia de contaminación de la leche proveniente de la superficie de la ubre se debe intentar tener la menor cantidad de barro posible en

el camino de ingreso a la sala de ordeño y en el corral de espera, así como disminuir los tiempos de espera, respetar las dimensiones recomendados para dicho lugar.

2.6.2.2 Contaminación proveniente del ambiente

Si bien el lavado de los pezones es fundamental para obtener una leche de buena calidad microbiológica, no lo es menos el medio ambiente y el equipo de ordeño. Frecuentemente suelen ser la fuente más importante en cuanto a contaminación microbiana se refiere.

Dentro de lo que es medio ambiente, es importante considerar al ordeñador, el aire y el agua disponible. El ordeñador puede transmitir contaminantes que le sean propios, actuando de vector al tomar contacto con los equipos de trabajo. Por el empleo de malas técnicas de ordeño, como el humedecimiento de las manos con los primeros chorros de leche, no lavar las pezoneras luego de su caída al suelo y previo a su colocación, entre otros.

Debe reconocerse que el ordeñador presenta el principal componente de todas las operaciones de ordeño y por ello, si se quiere alcanzar el éxito en la producción de leche de calidad, la preocupación debe centrarse en asegurar el cabal conocimiento por parte de éste, de todas las operaciones de rutina, de su higiene personal, uso de vestimenta adecuada y el no padecimiento de ninguna enfermedad de tipo infecto-contagiosa.

En cuanto a los microorganismos aportados por el aire a la leche, durante el ordeño, resulta muy pequeña su cantidad, pudiendo tener alguna importancia algunos tipos de bacterias, como *Bacillus cereus*, Clostridios y *Stafilococcus aureus* y hongos. Esto es posible de evitar no dando alimentos durante el ordeño (Magariños, 2000).

El agua puede ser una fuente de contaminación importante de microorganismos muy diverso: pero sobre todo deben rechazarse las bacterias gram negativas, que constituyen la flora psicrótrofa, ya que pueden provocar defectos en la leche y en los productos lácteos conservados a bajas temperaturas (Alais, 1985).

El uso de agua contaminada en la limpieza del tanque, máquina, 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, enterobacterias y clostridios. Además pueden existir en ella una amplia variedad de organismos sáprofitos procedentes del suelo y de la vegetación, entre los que cabe destacar *Pseudomonas ssp.*, coliformes y otros bacilos Gram negativos y esporas de *Bacillus*, etc (Cousins y Bramley, 1987).

2.6.2.3 Contaminación proveniente del equipo de ordeño

Si el equipo tiene un adecuado diseño, correcta instalación y buena higiene, no debe presentar un elemento preocupante en cuanto a contaminación microbiana.

La flora microbiana existente en un equipo de ordeño puede resultar variable, y esto se relaciona con el tipo de detergente y desinfectante, la técnica de limpieza, las temperaturas de lavado y el estado de las partes de caucho. Con respecto a estas últimas, debe tenerse presente que se encuentran inevitablemente en una elevada proporción, lo cual es perjudicial desde el punto de vista higiénico, ya que su superficie puede absorber hasta un 30% de su peso en grasa y tienen una vida útil limitada por la acción de las temperaturas elevadas aplicadas en la limpieza y el uso de detergentes fuertemente oxidantes (Magariños, 2000).

El diseño y montaje del equipo de ordeño es uno de los factores que posteriormente incidirá fuertemente sobre la facilidad de limpieza y, en consecuencia, sobre la multiplicación de microorganismos en la instalación. Por ello, el objetivo primordial en toda instalación y sala de ordeño es la sencillez, evitando en lo posible todo elemento que implique ser desarmado para su limpieza; en el caso en que no sea factible, hay que asegurar que su desarme y montaje resulte fácil (Magariños, 2000).

2.6.2.4 Contaminación proveniente del tanque de frío

Los tanques de frío en su mayoría son de acero inoxidable material que es más fácil de limpiar que los que componen la máquina de ordeño. Además de tener una superficie contaminante menor.

En un estudio realizado por Thomas y Thomas, citados por Cousin (1982) estudiaron la incidencia de la flora bacteriana en tanque de frío y encontraron un alto porcentaje de bacterias gram negativas, especialmente en aquellos tanques que estaban mal lavados. En varios ensayos obtuvieron muestras a nivel de la superficie interior del tanque, la presencia de biofilm puede ser uno de los principales focos de contaminación. Algunos géneros atrapados en el biofilm como es el caso de *Ps. fragi* permiten el crecimiento y adhesión de otros microorganismos patógenos para animales y humanos como *Listeria*.

2. 7 OTROS FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD DE LA LECHE

2.7.1 Condiciones de almacenamiento en el establecimiento lechero

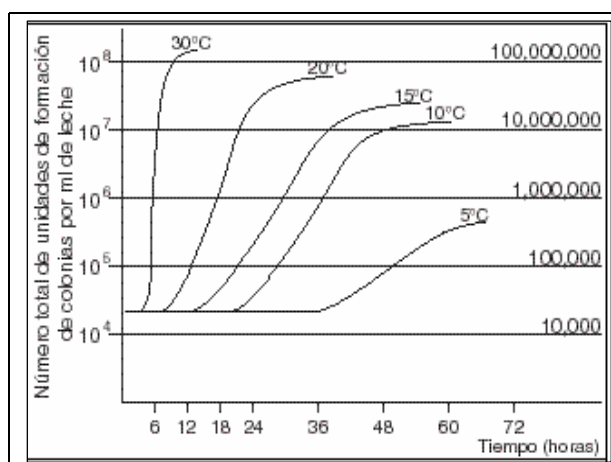
La leche se produce a la temperatura corporal de la vaca, 39°C. La temperatura descenderá en el proceso de ordeño y transferencia al tanque colector. La leche debe de ser enfriada lo más rápido posible luego del ordeño para minimizar el crecimiento bacteriano. El objetivo es el de enfriar la leche rápidamente a temperaturas por debajo de 4,4°C (Homan et al., 1998).

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).

La temperatura en la que se almacena la leche es uno de los factores más importantes, considerándose esencial si el almacenamiento va ser mayor a doce horas. En la mayoría de los casos es posible evitar la acidificación de la leche mediante la refrigeración pero, al mismo tiempo, otros defectos de calidad aparecen con el tiempo (Magariños, 2000). Siempre la refrigeración favorece la multiplicación de bacterias psicrótrofas presentes como contaminantes normales de la leche cruda (Ruas – Madieto et al., 1999).

En el grafico 3 se detalla el efecto de la temperatura y el tiempo de almacenamiento en la calidad microbiológica de la leche

GRAFICO 3 Crecimiento bacteriano en leches inoculadas con 50000 bacterias en función del tiempo para diferentes temperaturas



Fuente: Homan et al. (1998)

Desde el punto de vista económico la refrigeración permite reducir los costos de transporte, debido a que no es necesaria una recolección diaria. Por lo tanto la leche recogida contiene varios ordeñes. De esta manera en el tanque de frío ingresa leche a temperaturas cercanas a los 33°C que se mezclan con la ya existentes que se encuentra a temperatura cercanas a los 4 °C. Los tanques son generalmente fijados para enfriar la leche de 2,8 a 3,3 °C y poseen mezcladores periódicos que aseguran que la temperatura se encuentre pareja en todo el tanque y que el calentamiento superficial no se produzca.

Las demandas de energía pueden reducirse y los índices de enfriado incrementarse preenfriando la leche. Típicamente la leche pasa a través de un inter-cambiador de calor antes de entrar al tanque. Se pueden hacer varias configuraciones. Agua fría corre paralela a la leche en sistemas de tubos separados y el calor es transferido al agua, que puede ser utilizada para limpieza u otros propósitos. La temperatura de la leche es reducida correspondientemente antes de que ingrese al tanque o enfriador.

El problema causado por el almacenaje es el desarrollo de microflora psicrótrofa que puede producir proteinasas (Speck y Adams, 1976) y lipasas que son capaces de reducir la capacidad de la leche para ser procesada para quesos y que altera la fracción de K- caseína (Law et al., citados por Guinot-Thomas et al., 1995).

Dentro de la flora psicrótrófica, se encuentran representados grupos de microorganismos tales como *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, entre otros. Su desarrollo es muy rápido, teniendo un tiempo de

generación a 4 °C de 6 a 8 horas, pudiendo de esta manera multiplicar su población 10 veces, en término de 24 horas (Magariños, 2000).

Desde el punto de vista bioquímica estos microorganismos no atacan activamente a los glúcidos, con producción de ácidos, por el contrario, producen lipasas y proteasas extracelulares que poseen la importante propiedad de ser termorresistentes (Alais, 1985).

Debe quedar claro que la refrigeración no es una técnica que mejora la calidad de la leche, solo produce una conservación de la calidad original a la entrada del tanque de frío (Manfredini y Massari, citados por Caraballo et al., 2002).

2.7.2 Condiciones de transporte

El transporte de la leche desde el tambo hasta la industria se realiza en camiones cisternas que presentan la característica de ser isoterms. Por lo que la leche que no ha sido refrigerada correctamente afectará al resto. Es frecuente que la leche llegue a la industria a temperaturas mayores a la deseada en el entorno de 6° a 9 °C, lo que favorece la multiplicación de la flora microbiana durante el mismo.

La proporción total de psicrótrofos y coliforme en la leche de las cisternas de transporte al llegar a las plantas de procesamiento es demasiado elevada en comparación con la leche procedente de los tanques de frío de los tambos, pero no existe gran diferencia en la proporción de termodúricos (Thomas, citado por Cousins y Bramley, 1981).

Los problemas tanto técnicos como económicos que presenta el transporte de la leche, son menores cuando la densidad de los distritos lecheros es mayor. Cuando la cantidad de leche recogida por kilómetro recorrido es baja, los transportes se hacen muy largos con graves consecuencias sobre la calidad de la leche debido a la agitación prolongada y a la elevación de la temperatura.

Es difícil evaluar cuánto contribuye a la contaminación total de la leche cruda, la que aporta los diferentes componentes del tanque cisterna (mangueras, bombas), ya que los volúmenes transportados son muy grandes y un aumento de ufc /mL indica una elevada contaminación (Carballo et al., 1999).

2.7.3 Lipólisis

La materia grasa de la leche está constituida por aproximadamente un 98% de triglicéridos. La alteración de estos triglicéridos, denominada lipólisis, se traduce en un incremento en la concentración de los ácidos grasos libres (AGL) de la leche. Éstos son los responsables de la aparición de gustos anormales (rancia, jabón, etc.) en ciertos productos terminados (Taverna, 2000).

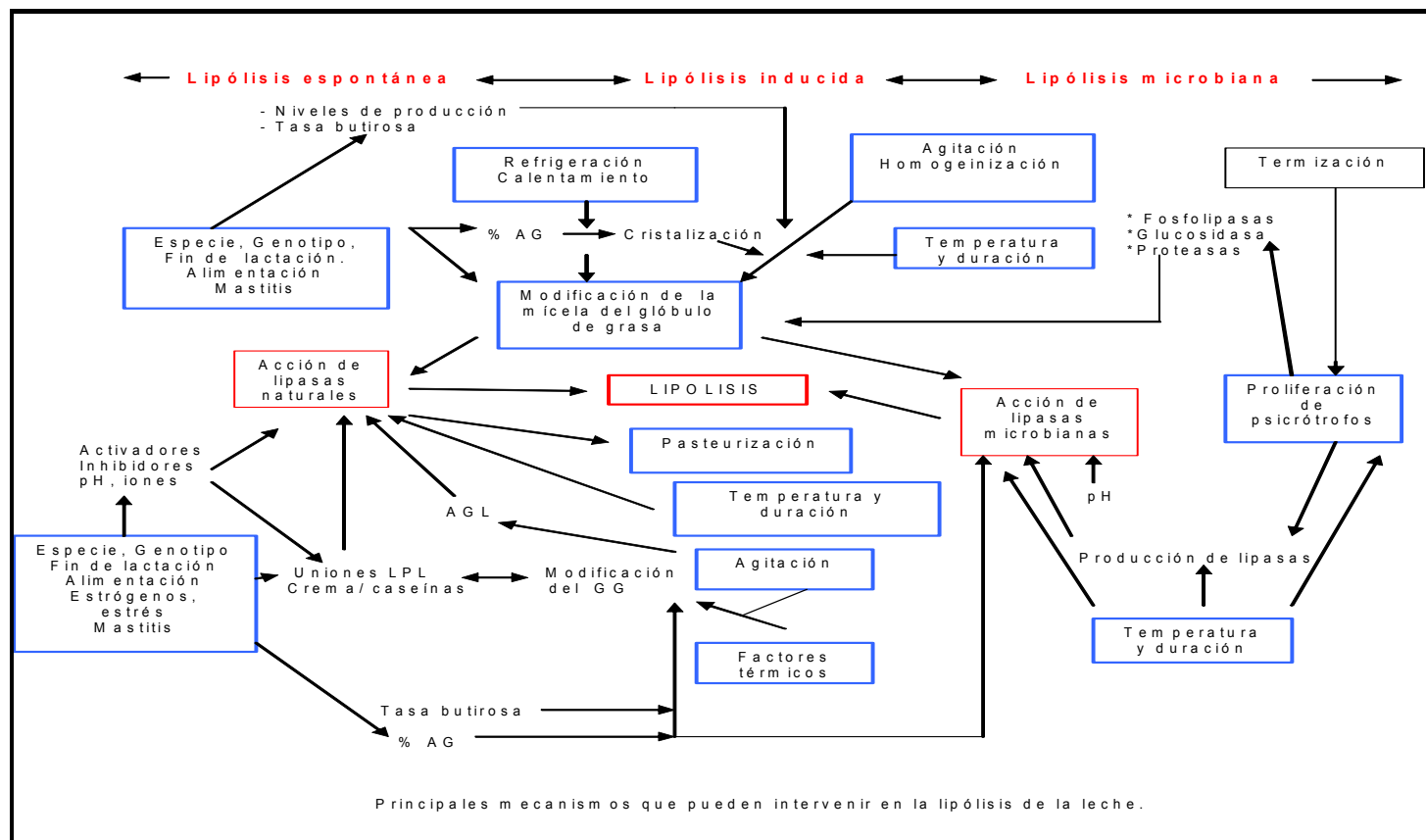
La lipólisis no constituye un criterio de calidad para la industria, sin embargo afecta la calidad de productos como crema, manteca, leche en polvo y otros. Debido a esto en numerosos países se ha incorporado la concentración de AGL en el pago por calidad de la leche.

La concentración final de AGL en la leche resulta de la suma de los naturalmente existentes más los generados por dos tipos de lipólisis denominadas: espontánea, inducida (física y microbiana)

Ambos tipos de lipólisis, inducida y espontánea progresan durante el almacenaje, con mas ocurrencia durante las primeras 24 horas, cuando la leche es refrigerada (Ouattara et al., citados por Deeth, 2006).

A continuación se muestra un diagrama con los principales mecanismos que afectan la lipólisis de la leche:

DIAGRAMA 2 Principales mecanismos que pueden intervenir en la lipólisis de la leche



AGL: ácidos grasos libres; AG: ácidos grasos; LPL: lipoproteína lipasa; GG: glóbulo de gras

En condiciones normales existen dos factores que limitan y evitan el ataque y la degradación de la materia grasa por las lipasas:

La membrana del glóbulo de la materia grasa que aísla y protege a los triglicéridos.

Las uniones que adhieren las enzimas a las caseínas en la fase acuosa y que impiden el contacto con la fase grasa.

2.7.3.1 Lipólisis espontánea

La lipólisis espontánea es definida como aquella que esta directamente asociada al potencial lipolítico de la leche naturalmente por lo que en esta influyen diferentes factores (Taverna, 2000). Esta comienza simplemente por el hecho de refrigerar la leche a menos de 10° C después de haber sido ordeñada (Deeth, 2006).

Existen tres factores bioquímicos que afectan la susceptibilidad de leche a la lipólisis espontánea: la cantidad de actividad de la lipasa; la integridad de la membrana del glóbulo de grasa de la leche; y el equilibrio de la actividad lipolítica y los factores de inhibición (Cartier et al., Deeth et al., Sundheim, citados por Deeth, 2006).

De estos factores la actividad de la lipasa es la que presenta menor correlación con la lipólisis espontánea (Cartier et al., citados Deeth, 2006). Sin embargo en la leche cruda existe suficiente cantidad de actividad lipasa como para causar una lipólisis extensiva en condiciones favorables. Correlaciones similares ocurren con la integridad o fragilidad de la membrana del glóbulo de grasa, este parecería ser un factor que predispone a la leche a la lipólisis espontánea, aunque este no se puede explicar la mayor diferencia entre la leche susceptible y la normal.

La leche contiene componentes inhibidores y activadores, el balance entre activador – inhibidor determina en gran parte la susceptibilidad de la leche a la lipólisis espontánea (Deeth et al., citados por Deeth, 2006).

Los activadores promueven el enlace entre la lipasa y la membrana del glóbulo de grasa y los inhibidores lo previenen. La refrigeración en la leche luego del ordeño es el disparador de dicho enlace ya que esto no ocurre con leches susceptibles que no han sido refrigeradas, no existiendo lipólisis (Deeth, 2006).

Los factores productivos asociados con la lipólisis espontánea son la lactación tardía (Chazal et al., 1986), la pobre-calidad alimentaría (Jellema, 1980) y la mastitis (Downey, citado por Deeth, 2006). La lipólisis espontánea se encuentran en mayor incidencia en leches de tambos con mayoría de vacas en lactación tardía y con planes nutricionales bajos (Deeth, 2006).

La lipólisis espontánea ocurre en leches con mastitis y esta contribuye a los niveles finales de ácidos grasos libres, es importante distinguir entre los elevados niveles de ácidos grasos iniciales y los ácidos grasos desarrollados durante el almacenaje.

La variación de temperatura induce la lipólisis espontánea. Esto ocurre cuando se preenfria la leche entre 25 – 35 ° y se reenfría a menos 10 °C. En la práctica esto ocurre cuando la leche templada sale de la vaca y es mezclada con la leche preenfriada. La leche susceptible a la lipólisis espontánea es más propensa a la inducción de la lipólisis por bajas temperaturas que la leche normal. (Deeth y Fitz-Gerald, citados por Deeth, 2006). Mientras que la extensión de la ruptura de la membrana del glóbulo de grasa es similar en los dos casos. La extensión de la lipólisis resultante del último tipo es mucho mayor ya que el área accesible para la lipasa también lo es (Deeth, 2006).

2.7.3.2 Lipólisis inducida

1) Lipólisis inducida física

A partir del momento en que la leche es extraída de la ubre se la somete a agitaciones, tratamientos mecánicos y cambios térmicos que dañan y, en ciertos casos, rompen la membrana del glóbulo de grasa. Por otra parte, estos procesos también liberan las Lipoproteína lipasa que estaban unidas a las micelas de caseínas posibilitando el ataque a los glóbulos grasos. El incremento en la concentración de ácidos grasos de cadena larga de la leche que aparece como consecuencia de estos mecanismos se lo define como lipólisis inducida (Taverna, 2000).

La agitación de la leche tiene dos efectos en la grasa de la leche y tiene implicancias en la cantidad de lipólisis inducida. La baja velocidad de agitación hace que el glóbulo de grasa colapse (esto ocurre cuando se hace manteca). Mientras que en altas velocidades el glóbulo de grasa se dispersa y genera muchos glóbulos de grasa pequeños, similar a lo que ocurre en la homogenización. La temperatura de agitación también tiene un efecto influyente en el glóbulo de grasa, el colapso se ve favorecido a bajas temperaturas y la homogenización a altas (Deeth, 2006).

En cadena de producción – industrialización la lipólisis puede ocurrir en el tambo, durante el transporte o en la fábrica. Las causas más posibles son:

- La agitación y el bombeo, especialmente con aire incorporado
- Homogenización
- Mezcla de leche cruda con homogenizada
- Congelado y descongelado de leche

La agitación ocurre durante el ordeño y el almacenamiento como también durante el transporte y en la industria, la leche hasta llegar a planta es sometida a varios bombeos que contribuyen a la ruptura del glóbulo de grasa.

El movimiento de la leche en una máquina de ordeñar es sumamente complejo puesto que dos fluidos, el aire y la leche, deben circular a la vez dentro de la tubería y el tanque de frío. Normalmente, el glóbulo de grasa está sometido sólo a presiones simétricas. Contrariamente, al encontrarse dentro de la interfase aire-leche, estas fuerzas se transforman en asimétricas, provocando su deformación con el riesgo de rotura de la membrana. Este mecanismo representa la principal causa de la lipólisis inducida por el material de ordeño. Un segundo mecanismo, tal vez menos importante que el precedente, corresponde a la fricción de la leche contra las paredes de la tubería. Este roce también daña la membrana e incrementa los riesgos de rotura (Taverna, 2000).

Estos mecanismos pueden acentuarse según el tipo de instalación de ordeño, los defectos de diseño y mantenimiento y por las prácticas de ordeño aplicadas por el ordeñador (Taverna, 2000).

La homogenización es muy efectiva para inducir la lipólisis en la leche cruda (Mulder et al., citados por Deeth, 2006). Sin embargo en la industria la homogenización es realizada inmediatamente antes o después de la pasteurización, esta inactiva a la lipasa por lo que no ocurre lipólisis.

El congelado y descongelado destruye la membrana del glóbulo de grasa y permite el acceso a la grasa por la lipasa (Willart et al., citados por Deeth, 2006).

2) Lipólisis inducida microbiana

Durante el almacenaje en frío las bacterias psicrótrofas crecen y producen enzimas tales como lipasa y proteasas. Que presentan un efecto importante en la calidad de la leche y sus productos (Sorhaug et al., citados por Deeth, 2006). Las lipasas producidas por estas bacterias presentan diferentes características con la lipoproteína lipasa. La mas grande diferencia es entre los diferentes modos de acción es que la membrana del glóbulo de grasa no parece ser una barrera para la

lipasa bacteriana para acceder a la grasa en un glóbulo de grasa intacto, y esto es así para lipasas producidas por bacterias psicrótrofas.

La otra diferencia es que el tratamiento con altas temperaturas en bajo tiempo (HTST) de pasteurización inactiva la lipoproteína lipasa, pero la mayor parte de la lipasa bacteriana es resistente a las altas temperaturas (Fitz - Gerald et al., citados por Deeth, 2006).

Los efectos pueden ser observados en productos tales como leche UHT, manteca, queso y leche en polvo, después de periodos de almacenaje. Desarrollan rancidez, sabores y pueden transformarse en inaceptables para el consumo humano (Deeth, 2006).

2.7.4 Proteólisis

La proteólisis es la hidrólisis de las proteínas causada por las enzimas proteinasas que provocan la ruptura de la misma y la transformación en péptidos de menor tamaño.

La proteólisis en la leche tiene dos orígenes: el primero mediante los microorganismos que pueden secretar proteasas exógenas resistentes al calor y muchas de ellas se desarrollan durante el almacenamiento en frío de la leche (Fairbairn y Law, citados por Guerrero et al., 2003); el segundo está relacionado con el deterioro de la ubre enferma lo que incrementa la cantidad de proteasas endógenas, especialmente aquellas del sistema plasmina-plasminógeno (Le Roux et al., citados por Guerrero et al., 2003).

La leche refrigerada disminuye el crecimiento bacteriano, pero las bacterias psicrótrofas pueden producir proteasas termorresistentes que pueden provocar cambios indeseables en la leche y productos lácteos (Adams, citado por Carballo et al., 1999).

Estas proteasas están asociadas con el sabor amargo en leche, gelificación en leches UHT, y bajo rendimiento quesero. La mayoría de las proteasas son capaces de degradar la κ , α 1, β caseínas. Estas son notablemente estables a las altas temperaturas (Griffiths, citado por Munsch - Aatossava et al., 2006). Las caseínas que sufren mas rápida degradación son las κ caseínas, luego las β caseínas, las α caseínas prácticamente no sufren degradación. Muchos estudios indican que κ -caseína es degradada en primera instancia, esto puede deberse a que la κ -caseína se encuentra ubicada en la superficie de la micela, lo cual la hace más susceptible a la acción de las proteinasas psicrotróficas. Esta degradación

puede tener implicancias en el uso de esta leche para la elaboración de quesos, donde la κ -caseína es esencial en la formación de la cuajada (Cousin, 1989).

La refrigeración de la leche puede producir un incremento en la forma soluble de las distintas fracciones de caseína y las hace más susceptibles a la proteólisis (Cousin, 1989). Este provoca cambios en las propiedades fisicoquímicas, éstos incluyen disociación de las caseínas, especialmente β -caseína, de la micela (Ceameer et al., citados por Raynal et al., 2000), solubilización del fosfato de calcio y una reducción del tamaño de la micela (Lenoir et al., citados por Raynal et al., 2000).

La influencia que tienen estas enzimas sobre las características organolépticas de la leche y los productos lácteos, es muy superior en algunos casos a la que pueden ejercer las enzimas nativas de la leche (Hernández, citado por Guerrero et al., 2003).

Respecto a las enzimas endógenas, Hernández et al., citados por Guerrero et al. (2003) reportan que en la leche cruda la más importante es la proteasa alcalina análoga a la plasmina del suero sanguíneo.

Numerosos estudios tienen implicado la plasmina y su zimógeno, plasminógeno, en la degradación de la proteína de la leche. La plasmina actúa principalmente en α s1, α s2 y en β caseínas pero la κ caseína es resistente a la hidrólisis proteolítica, la γ caseína se forma de esta última hidrólisis y el resultado son pequeños fragmentos de β caseína que reducen el proporción de caseínas en la leche (Ballou et al., 1995).

La presencia de células somáticas en una concentración de 500000 cel /ml resulta en la conversión de cantidades significativas de plasminógeno en plasmina incrementándose la proteólisis de las proteínas (Guerrero et al., 2003). Sin embargo la proteólisis en la muestras de leche ocurre con menos 250000 cel/ml. La calidad de la proteína decrece inevitablemente durante la lactación sean cuales sean la cantidad células somáticas (Le Roux et al., 1995).

Por lo que la mastitis tiene gran implicancia en la proteólisis en la leche. Un estudio realizado por Murphy et al. (1989) mostró que la leche fresca que provenía de vacas mastíticas presentaban alta actividad proteasa, Luego de la infección la actividad permanecía elevada, mientras que el número de células somáticas regresaba a los niveles de antes de la infección diez días antes.

Estudios sugieren que un incremento de la actividad proteolítica se debe a la respuesta a la inflamación tal vez responsable por los cambios en la fracción de proteína de la leche (Murphy et al., 1989).

2.8 MÉTODOS DE CONTROL (HIGENIZACIÓN DE LA LECHE)

En la actualidad existen variedad de métodos para lograr una mejor calidad microbiológica de la leche, estos métodos se basan en diferentes principios físicos, químicos, y biológicos teniendo en cuenta la diversidad de grupos microbianos que se encuentran en ella. Ninguno de estos tratamientos permite alcanzar una solución total ya que:

- No destruyen la totalidad de los microorganismos
- No inactivan la totalidad de las enzimas
- Y no conservan todas las propiedades y cualidades de la leche cruda.

2.8.1 Tratamiento térmico

Los tratamientos térmicos empleados pueden dividirse en pasteurización y esterilización.

La pasteurización clásica consiste en elevar la temperatura de la leche a 62 °C durante 30 minutos (pasteurización baja) o 72 °C durante 15 segundos (pasteurización alta), con este tratamiento se asegura la destrucción de todos los microorganismos patógenos, por lo que la leche es absolutamente segura desde el punto de vista sanitario. Sin embargo, en esta leche permanecen las formas esporuladas bacterianas y algunas formas vegetativas de bacterias no patógenas por lo que debe ser obligatoriamente mantenida en refrigeración durante toda su vida útil. Existen otras combinaciones de temperaturas y tiempo eficaces que pueden ser usadas con el mismo fin.

La esterilización significa la destrucción total de los gérmenes, patógenos o no, y de las esporas. Puede obtenerse a diferentes temperaturas por encima de los 100°C, siendo la duración del calentamiento tanto más corta cuanto más elevada es la temperatura.

El método clásico de esterilización consiste en calentar la leche a 118 – 121 °C durante 15 -20 minutos. Este tratamiento es insuficiente para asegurar la destrucción de las esporas cuando la leche tiene gran número de estas inicialmente. El método UHT permite obtener leche esterilizada sin mayores modificaciones que la leche pasteurizada. Este tratamiento consiste en elevar la temperatura entre 140 y 150 °C durante 1 a 5 segundos.

Los tratamientos térmicos tienen efectos negativos sobre las propiedades nutritivas y organolépticas de la leche, cuanto menos intenso el tratamiento más se conservan estas propiedades, por lo tanto las leches esterilizadas con el tratamiento clásico son las que presentan pérdidas nutritivas mayores.

2.8.2 Activación de sistema Lactoperoxidasa

Este sistema está formado por la enzima lactoperoxidasa, tiocianato (SCN^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Naidu, 2000). En presencia de estos dos últimos, el sistema genera los iones hipotiocianato (OSCN^-) como principal producto antimicrobiano ($\text{pH}=2.35$). Los iones hipotiocianato existen en equilibrio con el ácido hipotiocianoso (HOSCN) con pK_a de 5.3 (Aune y Thomas, 1978). El mecanismo de acción de este sistema se asocia al efecto de los iones OSCN^- y HOSCN , quienes son agentes fuertemente oxidantes de los grupos sulfidrilos constituyentes de la membrana citoplasmática de bacterias. Se inhiben con ellos varias enzimas claves del metabolismo celular e interfiriendo en el transporte de nutrientes como la glucosa, la síntesis de ADN y ARN; la captación de oxígeno, y la cadena respiratoria. Además provocan un debilitamiento de los iones potasio, aminoácidos y péptidos (Reiter, citado por Soler, 2005). Esta reacción provoca la inhibición reversible de numerosas bacterias gram positivas y una inhibición irreversible de bacterias gram negativas (Alais, 1985).

El efecto antibacteriano es proporcional a la formación de los productos de la oxidación del tiocianato (Björck et al., FAO/ ONU, citados por Packe, 2005). Este es activado cuando la concentración de tiocianato está entre 10 -15 mg/l y la H_2O_2 está entre 8 – 10 mg/l (Mee, Medina et al., Santos et al., Zapico et al., citados por Packe, 2005).

El Sistema de Lactoperoxidasa para la preservación de Leche Cruda es actualmente el único método aprobado para la conservación de la leche cruda, además de la refrigeración en el Codex Alimentario. Éste es promocionado por FAO como medio efectivo de extensión de la vida de almacenamiento de la leche cruda en los países en vías de desarrollo, donde "razones técnicas, económicas y/o prácticas", no permiten el uso de facilidades de enfriamiento para el mantenimiento de la calidad de la leche cruda. El uso del sistema LP en áreas en las cuales falta actualmente una adecuada infraestructura para la recolección de leche líquida, aseguraría la producción de leche como un producto alimentario completo y saludable, que de otra manera hubiera sido virtualmente imposible." (FAO, 2000).

2.8.3 Inoculación con *Lactococcus Lactis*

El uso de bacterias ácido lácticas para prevenir el crecimiento de flora psicrótrofa ha sido demostrado. En un estudio realizado por Guinot-Thomas et al. (1995) con dos leches con diferente carga microbiana. Una de 4×10^3 y otra con $2,8 \times 10^4$ psicrótrofos/ mL. La inoculación con 0.5 % de *Lactococcus Lactis subsp.*

lactis se observó una inhibición del crecimiento en las leches con baja cargas no resultando igual para las de mayor carga.

Juffs y Babel (1975) demostraron que en las leches con mayor contaminación, la inhibición causada por las bacterias lácticas disminuye y que en leches con $10^2 - 10^3$ microorganismos/ml el nivel de funcionamiento de la inhibición es 100 %. Champagne et al. (1990) agregó que las bacterias ácido lácticas tienen un efecto inhibitorio sobre los psicrótrofos de un 35 % cuando los mismos varían en el orden de $10^3 - 10^5$ microorganismos/ml.

Las bacterias ácido lácticas pueden fermentar la lactosa y otros azúcares a ácido láctico, esto provoca el decrecimiento del pH y esto explica la inhibición sobre la flora psicrótrofa (Griffiths et al., citados por Guinot -Thomas et al., 1995).

2.8.4 Adición de Dióxido de carbono

La adicción de CO₂ en la leche refrigerada tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de psicrótrofos y extiende la vida media de la leche cruda (King y Mabbitt, 1982).

Las investigaciones han mostrados que el CO₂ es efectivo en alargar la fase lag y disminuir la fase de crecimiento, principalmente en bacterias Gram – y otras células bacterianas vegetativas (Hendricks et al., King et al., Roberts et al., citados por Werner et al., 2002). El CO₂ influencia la fase log, lag y estacionaria; pero no igual en todos los organismos.

En un estudio realizado por Martin et al. (2003) se investigó el efecto causado por la disolución de dióxido de carbono en leche esterilizada inoculada con microorganismos simples, en todos los monocultivos se observó una inhibición del crecimiento influenciando la fase lag, exponencial y estacionaria.

Roberts et al., citados por Hotchkiss et al. (1999) realizaron experimentos al inocular leche estéril con bacterias psicrótrofas proteolíticas que se encontraban en leche cruda e investigaron el efecto de la adición de 20 a 30 mM CO₂ en el crecimiento a 7 °C. Los autores hallaron un aumento en el tiempo de generación debido a un incremento en el tiempo de la fase lag en la presencia de CO₂. En este ensayo no existió evidencia de un incremento en el crecimiento de anaerobios y bacterias facultativas por la adición de CO₂. Se concluyó que el almacenaje de la leche cruda refrigerada puede incrementarse de 1 a 3 días por la adición de CO₂.

El modo de acción del CO₂ como preservativo envuelve una complejidad de interacciones, mecanismos investigados incluyen el desplazamiento del oxígeno,

la influencia del pH, la rotura de las membranas celulares y las interferencias metabólicas (Daniels et al., citados por Werner et al., 2002).

Cuando se inyecta CO₂ en un líquido se produce un desplazamiento del oxígeno, volviendo al medio más anaerobio. Los psicrotrófos más alterantes son aerobios, de modo que aumentando la anaerobiosis del medio se favorece el control de los mismos. La influencia sobre el pH es explicada por la formación de ácido carbónico, que provoca la disminución del mismo. Un medio más ácido contribuye a reprimir el crecimiento de las bacterias psicrotrofas. En el caso de la industria láctea, esto debe controlarse ya que si el pH desciende demasiado podrían ocurrir problemas tecnológicos. El CO₂ se acumula como gas en la membrana celular de las bacterias, alterando la permeabilidad de la misma. Al pasar ácido carbónico al interior de la célula se reduce el pH intracelular, lo que lleva a una inhibición de enzimas claves, entre ellas las decarboxilasas (Reinheimer, 2001).

Cuando el CO₂ es disuelto en la leche, el pH de la leche decrece (Ma et al., citados por Ma y Barbano, 2003). Aunque el efecto antimicrobiano del CO₂ es no dependiente del pH (King et al., 1982). Algunos lácteos procesados en pasos son pH dependientes (Smits et al., Corredig et al., Beaulieu et al., citados por Ma y Barbano, 2003).

El alcance de la reducción del pH es explicado por la cantidad de CO₂ disuelto, hidratado y protonizado en la fase acuosa de la comida y por esta razón depende de las propiedades intrínsecas de esta fase, tal es capacidad buffer y el pH inicial (Gill, Devlieghere et al., citados Ma y Barbano, 2003).

Amigo citado por Hotchkiss et al. (1999) investigó el efecto de la acidificación a pH 6.2 y 6.0 con CO₂ en el crecimiento microbiano en leches estériles inoculadas y leches crudas. Concluyó que el tratamiento incrementa el tiempo de generación y disminuye la tasa de crecimiento de muchas *Pseudomonas spp.*

Algunos de los efectos directos ejercidos por el CO₂ incluyen la capacidad de cambiar las propiedades de la membrana microbiana (Rowe, 1988), disminuir el pH intracelular (Hong et al., 1999), e interfiere con la reacción enzimática celular (King et al., 1975).

King y Marbit (1982) mostraron que dosis de 10 a 40 mM CO₂ inhiben el desarrollo microbiano en la leche cruda almacenada a 4.7 y 10 °C. Ambas dosis de concentración de CO₂ y el descenso de la temperatura dieron como resultado una gran reducción de la tasa de crecimiento, que cuando se hicieron dichos tratamientos por separado.

Ma y Barbano (2003) concluyeron que la adición de 1500 ppm de CO₂ pero no de HCl, produjo un efecto positivo en la disminución del crecimiento bacteriano en leche cruda almacenada durante 21 días a 4 °C. La adición de CO₂ decrece la proteólisis a través de dos mecanismos: la reducción de las proteasas microbianas debido a la disminución del crecimiento microbiano y a la posible reducción en la actividad plasmina debido a la disminución del pH. El efecto de CO₂ reduce la lipólisis debido a la reducción del crecimiento microbiano, no se ha comprobado la reducción de la lipólisis por una acción sobre la lipasa nativa.

En un ensayo realizado por Ruas - Madiedo (1999) se observó que, el tratamiento con CO₂ reduce la degradación de la glucosa debido al efecto de este sobre la actividad metabólica de los microorganismos presentes en la leche. De acuerdo a los resultados obtenidos se concluyó que, la concentración de CO₂ extiende la vida media de la leche pasteurizada sin modificar la fracción de monosacáridos libres.

Durante el calentamiento en leche sin adición de CO₂, el pH de la leche decrece linealmente en función del incremento de temperatura, pero es independiente de la presión. En general el pH de la leche con adición de CO₂ decrece con el incremento de la concentración de CO₂ y presión. Para leches con CO₂ agregado, para una concentración de CO₂ fija, el efecto de la presión en la disminución del pH es mejor cuanto mas alta es la temperatura. La muerte térmica que ocurre durante la pasteurización de leche sin adición de CO₂ es probable que se deba no solo a la temperatura sino también al descenso del pH durante el proceso. Disminuciones en el pH con altas concentraciones de CO₂ y altas presiones pueden mejorar aun más el efecto de la pasteurización (Ma y Barbano, 2003).

La degasificación por vacío previo a la pasteurización permite que la leche sea aceptable para su consumición (Amigo et al. 1995, Ruas - Madiedo et al. 1996). El residuo de CO₂ no removido por degasificación puede extender la vida media de la leche pasteurizada e inhibir los sobrevivientes durante el almacenaje en frío (Ruas - Madiedo et al. 1998, Hotchkiss et al. 1999) sin causar efectos de deterioro en los componentes volátiles, ácidos orgánicos, caseína, proteínas del suero (Ruas - Madiedo et al., 1996) y vitaminas liposolubles (Sierra et al. 1996, Ruas-Madiedo 1998). Olano et al. (1992) reporta el decrecimiento de la lactulosa y la epilactosa formada durante los tratamientos a altas temperaturas con leche tratada con CO₂.

Un trabajo realizado por Ruas – Madiedo et al. (1996) con 200 litros de leche a los cuales se le agregó suficiente CO₂ para disminuir el pH entre 6.2 y 6.0. Se mantuvo la leche a 4 °C durante 4 días luego se eliminó por vacío el CO₂ residual y pasteurizó. Las leches fueron evaluadas sensorialmente, microbiológicamente y químicamente. No detectándose diferencias significativas

en las propiedades sensoriales. La única diferencia importante que presentó la leche tratada con respecto a la no tratada fue los menores recuentos de coliformes, psicrótrofos, psicrótrofos proteolíticos y psicrótrofos lipolíticos. Los autores concluyen que CO_2 puede ser agregado a la leche cruda para inhibir el deterioro microbiológico y que el mismo puede ser removido durante el procesamiento sin tener efectos perjudiciales.

La fiabilidad del uso del CO_2 para mejorar la calidad de la leche pasteurizada no ha sido investigada en detalle, probablemente por que se asume que las concentraciones de CO_2 requeridas para obtener un efecto significante en la vida media, producen un efecto negativo en la calidad sensorial de la leche (Mabbitt, 1982).

Estudios realizados por Duthele, citado por Hotchkiss et al. (1999) y otros realizados por el mismo autor en 1985 sugieren que las concentraciones de CO_2 que son menores al umbral organoléptico deberían inhibir el crecimiento microbiano. Ellos agregaron 1.8 y 3.2 mM CO_2 en leche cruda pasteurizada y la almacenaron mas de 14 días a 6 °C. Panelistas entrenados sensorialmente no encontraron diferencias entre el control y el tratamiento. Sin embargo en el día 14 las muestras de leche con el tratamiento con alta concentración de CO_2 mostraron una puntuación significativamente mayor que las no tratadas. Las muestras control sufrieron coagulación durante los días del ensayo, mientras que las tratadas no. El umbral sensorial en dicho estudio fue de 16.8 mM de CO_2 el cual fue superado ampliamente por las muestras tratadas con alta dosis de CO_2 . Por lo que los investigadores concluyeron que bajas concentraciones de CO_2 en leche pasteurizada puede mejorar el mantenimiento de la calidad.

En un estudio realizado por Werner et al. (2002) sobre los efectos causados por la adición de dióxido de carbono sobre las esporas de *Bacillus cereus* concluye que niveles moderados de CO_2 (11,9 mM CO_2) no tiene efecto ni estimulador, ni inhibitorio en la iniciación de la germinación y en las subsiguientes consecuencias de altas o bajas concentraciones de esporas en la leche durante un periodo extenso de almacenaje a temperaturas de refrigeración. Trabajos previos con *Clostridium botulinum* dieron conclusiones similares (Glass et al., 1999).

Existen dos requerimientos fundamentales para que el uso CO_2 incremente la vida media de la leche pasteurizada. Primero la acidificación con CO_2 debe ser controlada cuidadosamente para que la cantidad adicionada reduzca el crecimiento microbiano y que la misma no sea detectada por los consumidores. Segundo requerimiento es que la tasa de permeabilidad del embalaje debe ser lo adecuadamente baja para mantener una efectiva concentración por suficiente tiempo para incrementar la vida media (Hotchkiss et al., 1999).

Para lo antes expuesto se podría concluir que el la adición de CO₂ en la leche cruda y su efectos combinados con la refrigeración podrían ser una manera apropiada de controlar el crecimiento microbiano, no existiendo evidencia que este tratamiento cause un efecto sobre las esporas de diferentes psicrótrofos.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

La obtención de la muestra se obtuvo del tambo del Centro Regional Sur de la Facultad de Agronomía, y el análisis de las muestras se realizó en el laboratorio de la Unidad de Tecnología de los Alimentos.

3.1 PROCEDIMIENTO

La muestra fue obtenida en el mes de diciembre del 2006, directamente del tanque de frío (4 °C), se transportó al laboratorio en condiciones de refrigeración.

Una vez en el laboratorio se acondicionó la leche en cuatro matraces Erlenmeyer, colocando en cada uno de ellos 400 mL de leche. Dos de los mismos se tomaron como control, y a los restantes se le agregó una dosis de CO₂ hasta llegar a pH 6.3.

La gasificación se realizó con un tanque con manómetro regulable con el cual se introdujo el gas en las muestras a través de un tubo estéril directamente a la leche.

Todas las muestras fueron refrigeradas a 7 °C durante los días del ensayo y agitadas manualmente durante unos minutos, antes de realizar los análisis del deterioro de las mismas.

Los muestreos se realizaron a las 0, 48, 72 y 144 horas, a dichas muestras se les realizó recuento de mesófilos aerobios, psicrotrofos totales, termófilos y termodúricos.

Se monitoreo el pH de los matraces a las 0,24, 48, 72, 144 horas, luego de la homogenización.

3.1.1 Análisis microbiológico

Las muestras antes de ser procesadas fueron homogenizadas mediante el uso de vortex. Se realizó el método de recuento viables en placa por diluciones seriadas decimales en tubo (10^{-1} a 10^{-3}) utilizando 9 mL de solución salina fisiológica, las muestras preparadas fueron trasferidas a placa de Petri por el método de siembra en superficie. Se sembraron en diferentes medios según el grupo de microorganismo a cuantificar y se incubaron a diferentes temperaturas:

- Recuento de mesófilos aerobios totales en PCA (Plate Count Agar, OXOID) a 37 ° C
- Recuento de termófilos aerobios en PCA a 55 ° C
- Recuento de termodúricos en PCA a 37 ° C
- Recuento de psicrótrofos en Agar Caseína a 5 ° C

Las muestras se incubaron por un período de 48 horas en incubadoras a excepción de los psicrótrofos los cuales se incubaron durante 144h en refrigerador a 7 °C.

Una vez cumplido dichos períodos se procedió al recuento de bacterias viables (ufc/ml).

Los datos obtenidos de dichos recuentos fueron procesados utilizando la fórmulas según la Norma ISO/ FDIS 8199: 2004 (E).

$$Cs = \frac{Z}{A}$$

Donde:

Cs = Recuento total (ufc/ml)

z = $\sum$ de todas las diluciones

A = Volumen total

$$A = R \times V \times D$$

Donde:

R = N ° de repeticiones (2)

V = Volumen sembrado (1 ml)

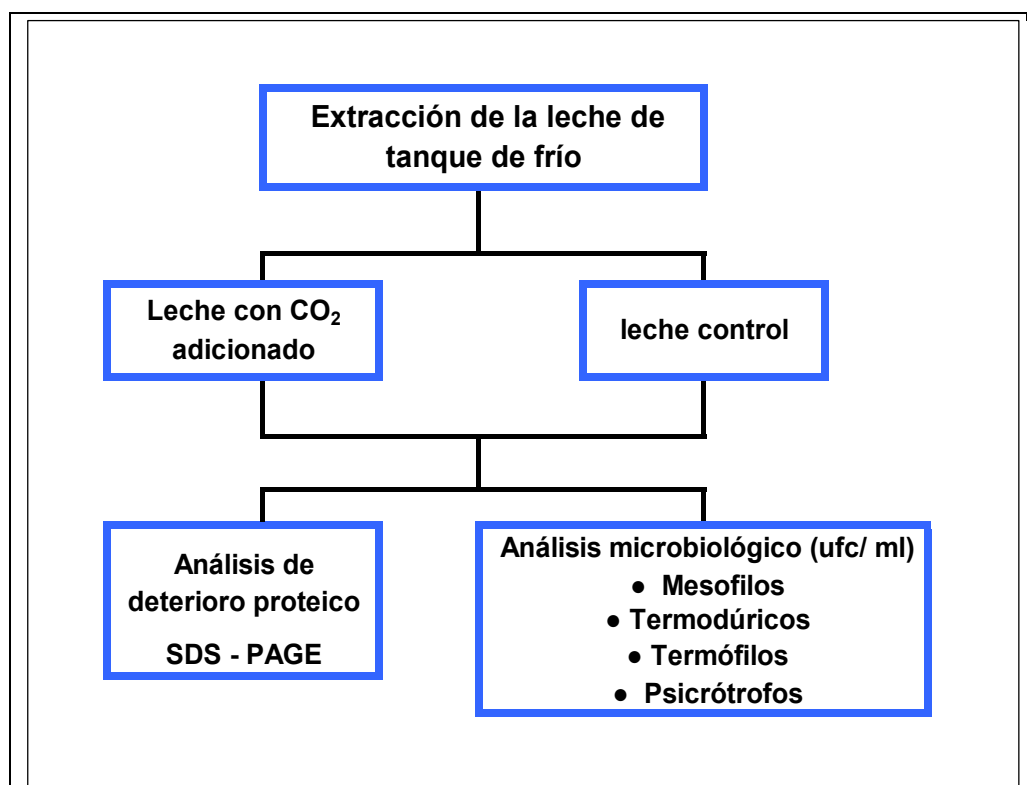
D = Diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3})

Los valores utilizados para el cálculo de Volumen total (A) se ejemplifican inmediatamente

$$\mathbf{A = (2 \times 1 \text{ ml} \times 0,1) + (2 \times 1 \text{ ml} \times 0,01) + (2 \times 1 \text{ ml} \times 0,001)}$$

A continuación se muestra un diagrama que ejemplifica el procedimiento para el análisis de las muestras

DIAGRAMA 3 Procedimiento para el análisis de las muestras

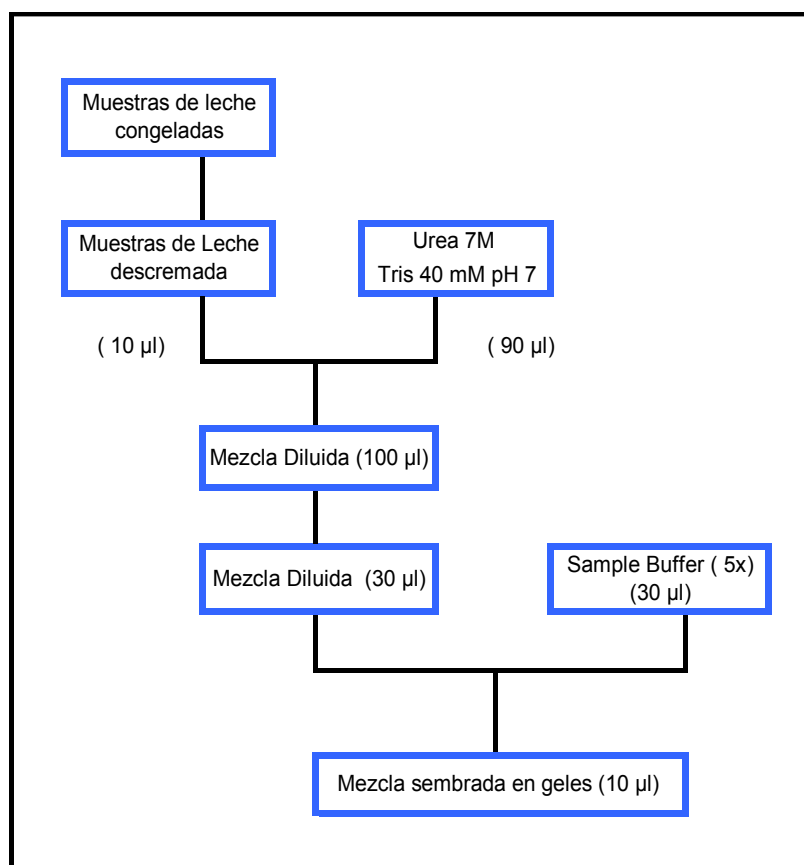


3.1.2 Análisis del deterioro proteico (SDS - PAGE)

Las muestras para el análisis de deterioro proteico fueron tomadas en el mismo momento que para el análisis microbiológico, las mismas fueron realizadas a las 48, 72 y 144 horas, y congeladas durante los días del ensayo para luego ser analizadas conjuntamente.

La leche descremada obtenida se le adicionó una solución buffer de urea 7 M con Tris 40 mM a pH 7. La mezcla se realizó con 10 µl de leche descremada y 90 µl de solución buffer; de esta mezcla se tomaron 30 µl a los que se les añadió 30 µl de Sample Buffer (5x).

DIAGRAMA 4 Preparación de las muestras para la realización de la electroforesis.



La electroforesis se realizó con una solución gel que se observa en el siguiente cuadro.

CUADRO 10 Composición de la solución gel para realizar la electroforesis.

Reactivos	Volumen (ml)	
	Gel separados (15 %)	Stacking (2%)
Agua destilada	2,3	1,4
Acrilamida mix 30%	5	0,33
Tris 1,5 M (pH 8,8)	2,5	
Tris 1,0 M (pH 6,8)		0,25
SDS 10 %	0,1	0,02
Persulfato de amonio 10%	0,1	0,02
TEMED	0,004	0,002
	10,0	2,0

Una vez obtenido el gel se procedió a sembrar en el mismo con 10 µl de las mezclas pretratadas con las muestras de leche, conjuntamente con dos estándares (β lactoglobulina y κ caseína).

Las muestras se evaluaron por electroforesis en gel SDS – PAGE al 15 %, a temperatura ambiente y voltaje constante 150 V durante una hora, en un equipo Power Pac 300 (BIO – RAD)

Luego los geles fueron colocados en una solución colorante fijadora 60:40 Distain Solution Comassie R- 250 1 x Solution (BIO – RAD) C.70217A durante 30 minutos y sometidos a agitación lenta constante mediante una agitador Roto mix Type 50800, una vez transcurrido dicho tiempo se procedió a decolorar los mismos mediante una solución 60:40 de Distain Solution Comassie R- 250 1 x Solution (BIO – RAD) C.70217A durante 24 horas. Inmediatamente se sustituyó el decolorante por uno nuevo y se dejó actuar durante 20 minutos en el agitador y se repitió nuevamente la acción.

Para finalizar se acondicionaron los geles para ser secados. La operación se realizó en un secador Modelo 583 Gel Dryer (BIO – RAD) durante 1 hora 20 minutos a 80° C de temperatura.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ANÁLISIS MICROBIANO

En el cuadro 11 se muestran los resultados obtenidos luego de realizado el cálculo según la metodología descripta ISO/ FDIS 8199: 2004 (E).

Se denota un mayor recuento microbiano en el control al transcurrir las horas, mientras que en el tratamiento presenta recuentos más estables a través del tiempo.

El grupo de los Mesófilos es el que presenta mayores conteos a lo largo de todo el ensayo y donde se puede observar la mayor disminución debida al tratamiento, este ocurre a las 144 horas donde se puede ver que los recuentos para el control son 26 veces más que para el tratamiento.

El segundo grupo de importancia en donde se encontraron altos recuentos fueron los Psicrótrofos, los valores son del orden de 10^3 desde las cero horas., para estos las disminuciones de los recuentos son menores que las encontradas para el primer grupo. Los recuentos de Psicrótrofos disminuyen orden del 50 % para el tratamiento a las 72 y 144 horas.

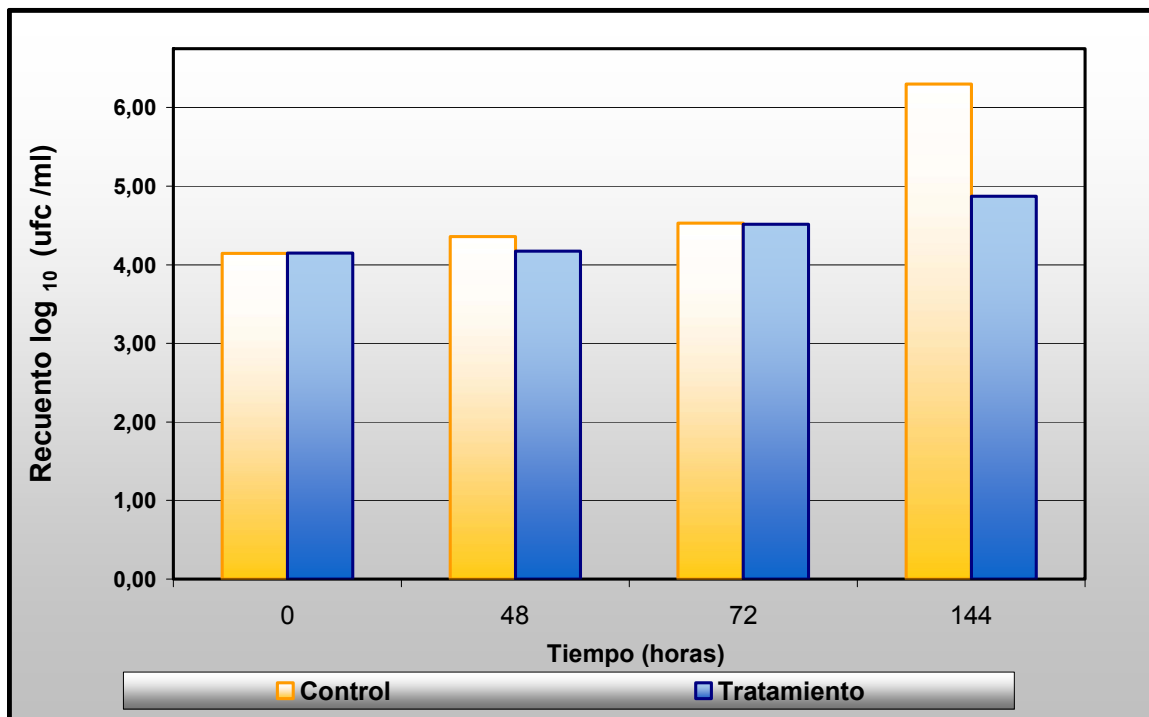
Los grupos de termodúricos y termófilos se encontraron en menor cantidad, disminuyendo el recuento a la mitad en el tratamiento con CO₂

CUADRO 11 Resultado de los recuentos totales

	TIEMPO (horas)			
	0	48	72	144
Mesofilos aerobios totales (ufc/ml)				
<i>Control</i>	$1,4 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$3,4 \times 10^4$	$2,0 \times 10^6$
<i>Tratamiento</i>		$1,5 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$	$7,5 \times 10^4$
Termófilos (ufc/ml)				
<i>Control</i>	$1,5 \times 10^2$	$5,9 \times 10^2$	$3,5 \times 10^4$	$6,0 \times 10^4$
<i>Tratamiento</i>		$8,1 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$
Termodúricos (ufc/ml)				
<i>Control</i>	0	$7,0 \times 10^1$	$3,5 \times 10^1$	$3,0 \times 10^1$
<i>Tratamiento</i>		$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$
Psicrótrofos (ufc/ml)				
<i>Control</i>	$4,7 \times 10^3$	$6,9 \times 10^3$	$2,7 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$
<i>Tratamiento</i>		$6,0 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$

En la gráfica siguiente se puede observar el recuento de Mesófilos aerobios totales.

GRÁFICA 4 Recuento de Mesófilos aerobios totales en relación al tiempo



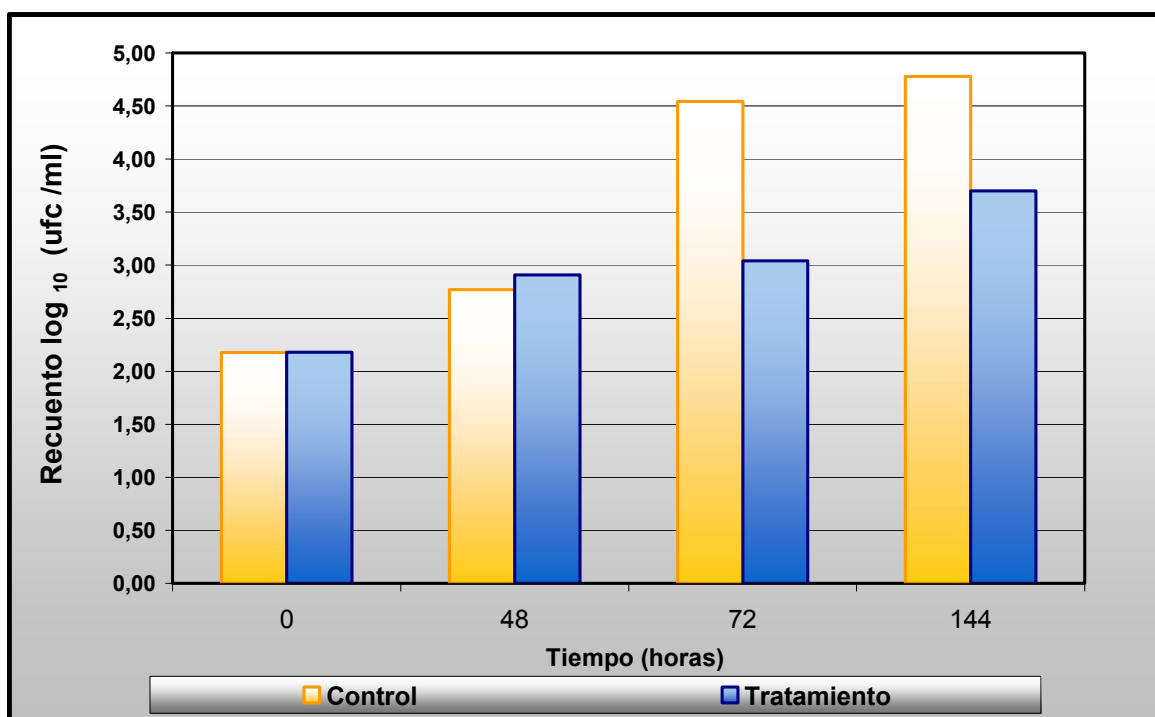
Fuente: elaboración en base a los datos obtenidos

El recuento de mesófilos aerobios se eleva luego de transcurrir las 48 horas. Se observa que el tratamiento con CO₂ tiene un efecto positivo a las 144 horas, disminuyendo el recuentos de mesófilos 7.5×10^4 ufc/mL.

Los diferentes mesófilos encontrados en el ensayo se muestran en la fotografía que se presenta a continuación:



GRÁFICA 5 Recuento de termófilos totales en relación al tiempo



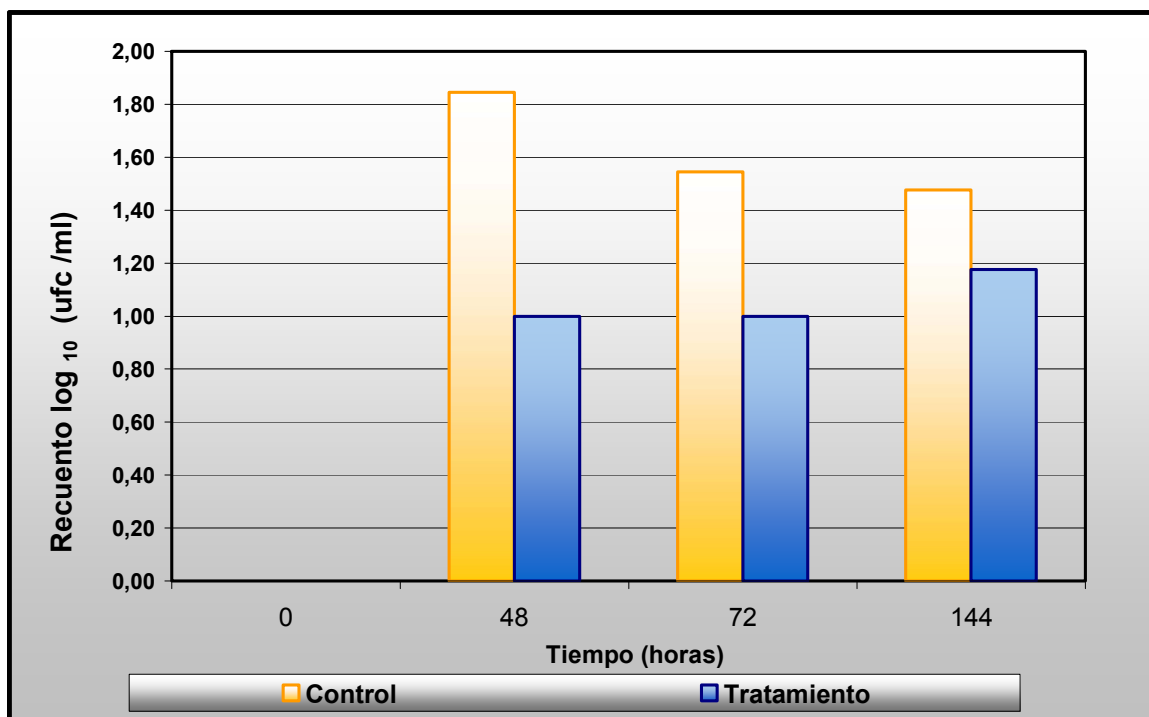
Fuente: elaboración en base a los datos obtenidos

Como se muestra en la gráfica el tratamiento mostró menores recuentos de termófilos en todos los tiempos evaluados.

En el caso del control existe un rápido crecimiento luego de las 48 horas llegando a 6×10^4 ufc/mL a las 144 horas, mientras que el tratamiento con CO_2 , no llega a los recuentos antes citados y a las 144 horas se encuentran en 5×10^3 ufc/mL demostrando que el tratamiento mantiene más estable los recuentos iniciales.

Los termófilos que crecieron durante el ensayo se muestran en la siguiente fotografía:



GRÁFICA 6 Recuento de termodúricos en relación al tiempo

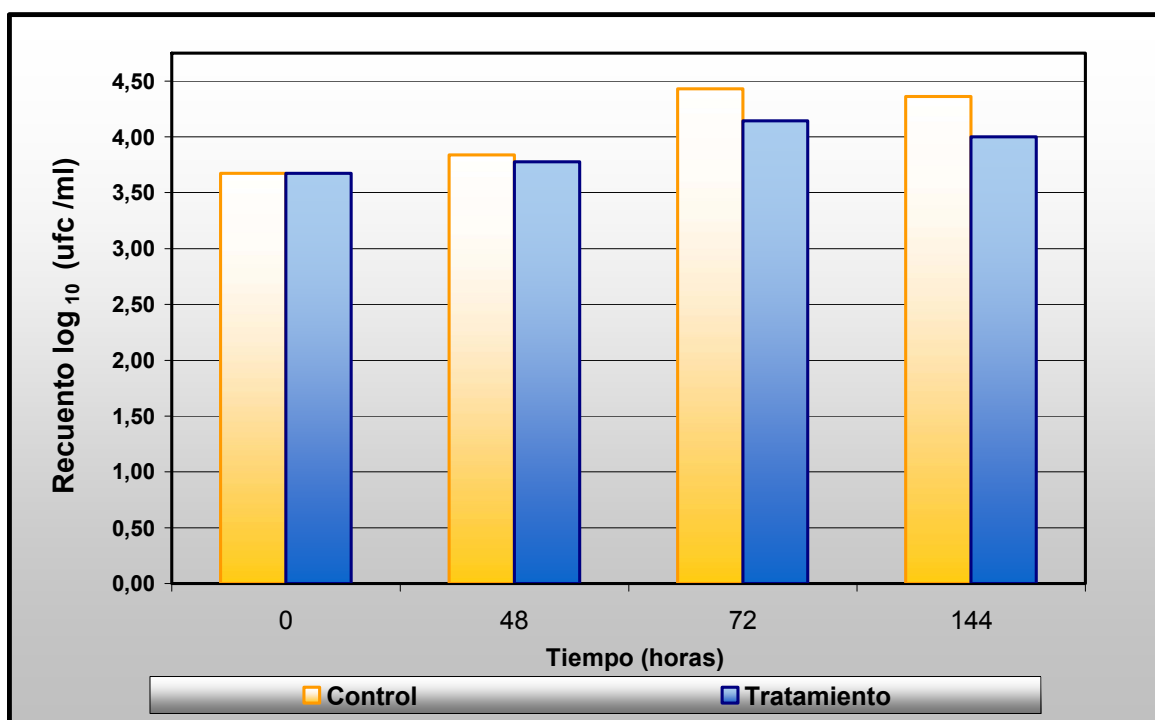
Este grupo bacteriano presentó una disminución del recuento en el tiempo en el control, y un efecto contrario en los matraces con tratamiento con CO₂.

A pesar del comportamiento no esperado en el control, se puede observar siempre una menor carga microbiana para el tratamiento, mostrando una vez más la eficacia de la utilización del dióxido de carbono para el control bacteriano.

El crecimiento de las bacterias termodúricas en placa durante el ensayo se puede apreciar claramente en la siguiente fotografía:



GRÁFICA 7 Recuento de Psicrótrofos totales en relación al tiempo



En el análisis del grupo de los psicrótrofos se puede observar una menor diferencia entre los recuentos del control y el tratamiento, aunque este último presenta recuentos menores.

El recuento de psicrótrofos aumenta hasta las 72 horas (2.7×10^4 ufc/mL), manteniéndose más estable hasta las 144 horas.

En todos los casos el control es mayor con respecto al tratamiento, pero las diferencias encontradas son menores que en los demás grupos de microorganismos.

En la siguiente fotografía se muestra una placa representativa del crecimiento de psicrótrofos durante el transcurso del trabajo en laboratorio.



CUADRO 12. Variación promedio del pH de la leche en el tiempo

	<i>pH</i>				
	<i>0 hrs</i>	<i>24 hrs</i>	<i>48 hrs</i>	<i>72 hrs</i>	<i>144 hrs</i>
<i>Control</i>	6,52	6,52	6,47	6,40	6,37
<i>Tratamiento</i>	6,30	6,36	6,36	6,27	6,23

Los datos en el cuadro 12 muestran los promedios de pH de las dos repeticiones tanto para control como para el tratamiento. Se observa la evolución del pH durante los días del ensayo.

En el caso del control la disminución del pH es sostenida a lo largo de los días. Cuando la leche es incubada a 7 °C la acidificación es menor debido a la disminución del crecimiento de los microorganismos.

La adición de CO₂ en el tratamiento causa una disminución del pH con respecto al control, dicha disminución es la causante del efecto indirecto que provoca el CO₂ en el control de los microorganismos. En la leche se genera un medio más hostil para la sobrevivencia de las bacterias y beneficiando algunas especies en particular.

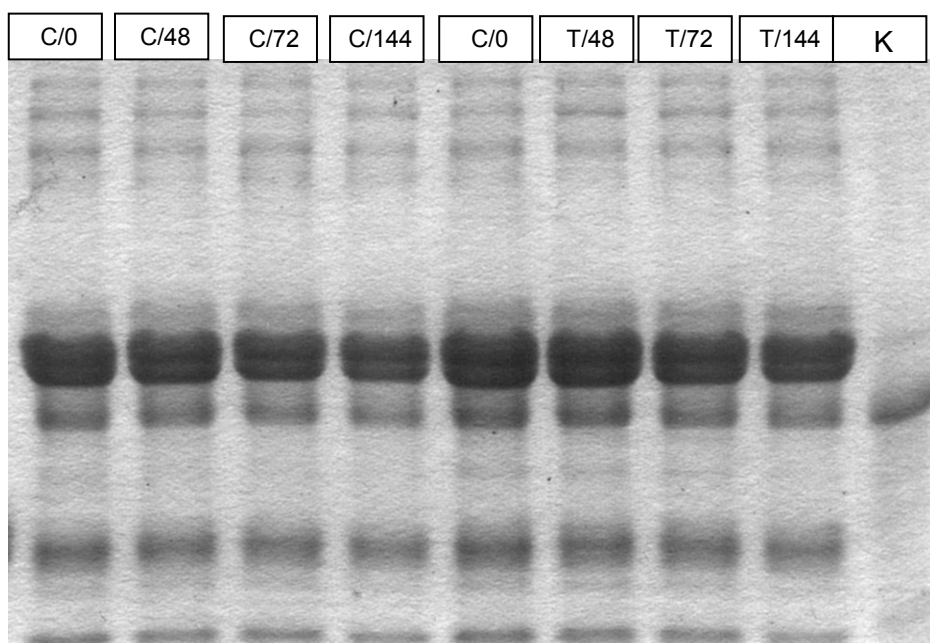
El tratamiento comienza con un pH menor que el Control y sufre una elevación a las 24 horas que se mantiene hasta las 48 horas para luego descender hasta las 144 horas, dicha disminución puede deberse al crecimiento diferencial de algún grupo bacteriano que provoque la acidificación del medio.

La mayor diferencia de pH entre el control y el tratamiento se percibe al comienzo del ensayo, cuando la gasificación recién se ha realizado. En el transcurso de los días y al agitar y manipular los matraces existe una pérdida a las 24 horas del gas provocando una elevación del pH. Entre las 48 y 72 horas se constata la mayor caída del pH para ambos casos, siendo mayor en el tratamiento.

Este dato coincide con el aumento del crecimiento bacteriano. Entre las 48 y 72 horas en todos los grupos menos en el de Termodúricos los recuentos se incrementan, lo que hace suponer que la caída del pH se deba al crecimiento bacteriano y con el mismo a la producción de sustancias que acidifican el medio.

4.2 RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ANALISIS DE DETERIORO PROTEICO

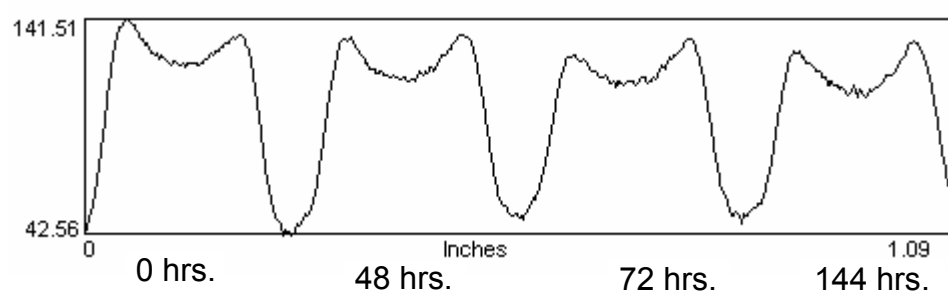
Los datos obtenidos en la electroforesis y analizados mediante el programa Scion. Image (compañía scion) no mostraron diferencias entre el tratamiento y el control.



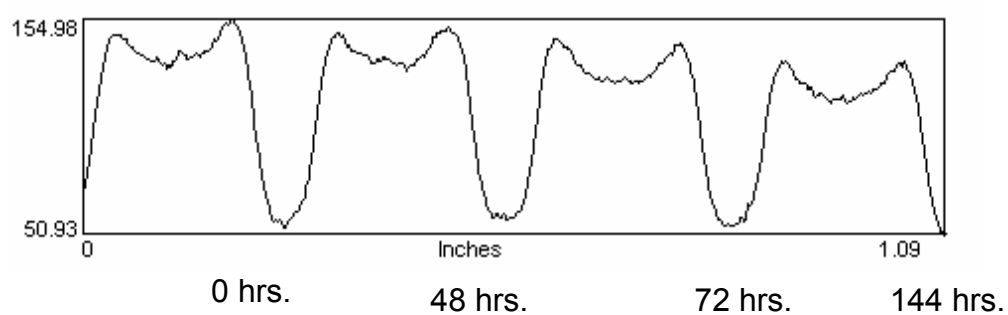
Donde: T es el tratamiento, C es el control y los números indican las horas de ensayo

A continuación se muestran las bandas de degradación de proteína, donde se cuantificó la degradación de las caseínas β , α_1 , α_2 y κ para el control y el tratamiento con CO_2 .

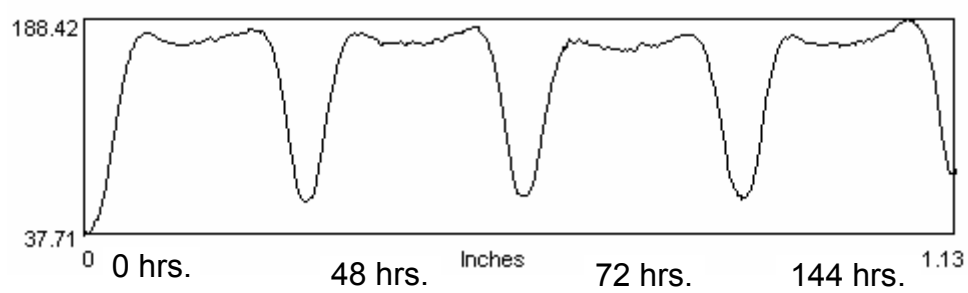
- Perfil proteico de k-Cn de control



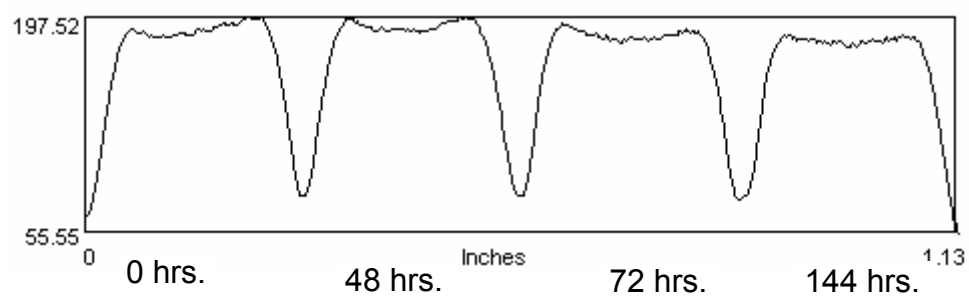
- Perfil proteico de k-Cn de CO₂



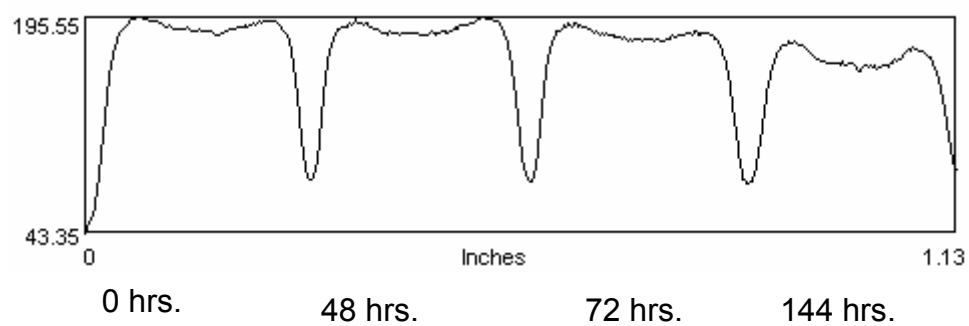
- Perfil proteico de β -Cn control



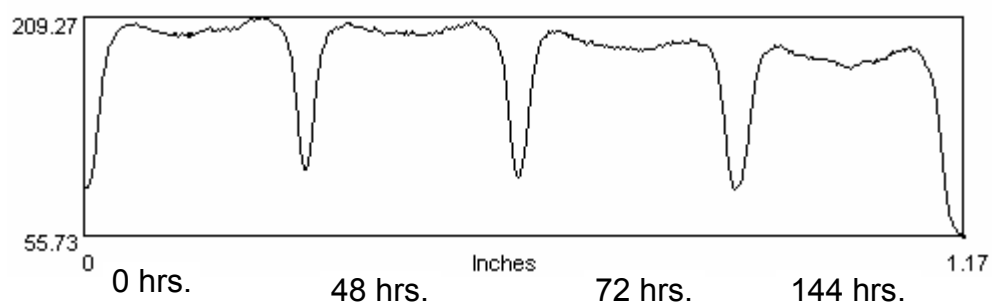
- Perfil proteico de β - Cn CO2



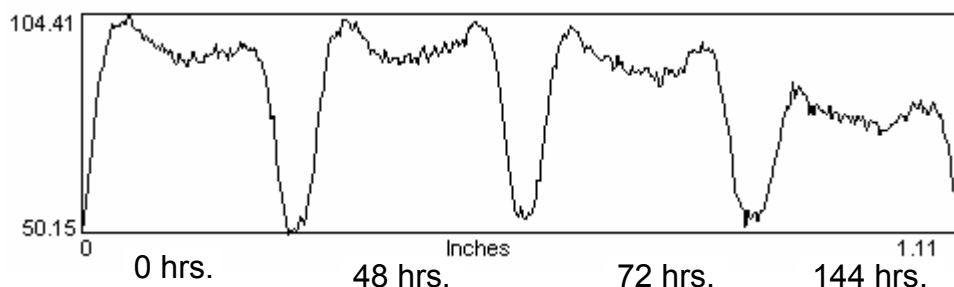
- Perfil proteico de α 1-Cn control



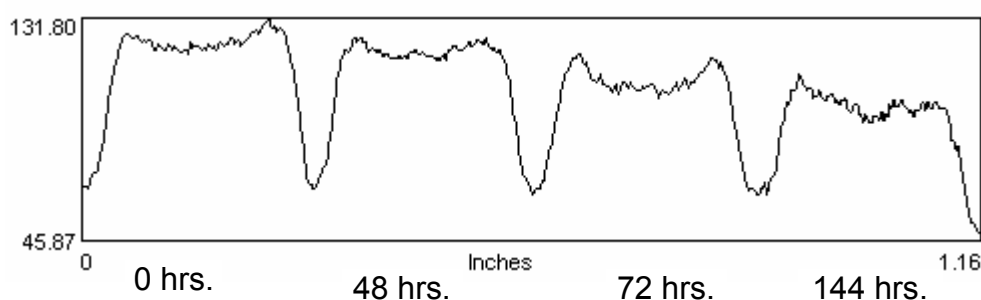
- Perfil proteico de α 1-Cn CO2



- Perfil proteico de $\alpha 2$ -Cn control



- Perfil proteico $\alpha 2$ -Cn CO₂



En los perfiles proteicos realizados para las fracciones analizadas mediante el programa Scion – Image, no existió degradación de ninguna de ellas. Observándose iguales perfiles para todos los tiempos en el control y tratamiento con CO₂.

En una publicación de Guerrero et al. (2003) se evaluó el efecto de las enzimas proteolíticas en la integridad de las caseínas. En dicho informe se reporta que no se halló degradación de las caseínas por la técnica de electroforesis a pesar de encontrar recuentos de psicrotrofos de 10^6 y 10^7 ufc/mL. Este dato coincide con los resultados obtenidos, los recuentos de psicrotrofos no superan el orden de 10^4 para el control y el tratamiento.

Punch et al, citados por Guinot -Thomas et al. (1995) señalan que son necesarios niveles mayores 5×10^6 y 10^7 UFC/mL de bacterias psicrotrofas para que ocurra proteólisis y cambios organolépticos, respectivamente. Sin embargo, Law (1979), encontró muy poca hidrólisis de la κ y β -caseína en PAGE a pesar de crecer psicrotrofos proteolíticos en el orden de 10^7 ufc/mL, en leches almacenadas por 72 horas a 7,5°C. Otros como Shelly et al., Griffiths, Rowe citados por Guinot -Thomas et al. (1995) señalan que la no proteólisis puede ser debida a lo no excreción de las proteinasas por encontrarse las

bacterias todavía en fase exponencial de crecimiento, a niveles de 10^6 UFC/mL, o que solamente una pequeña proporción de estos psicrótrofos son caseinolíticos. Investigadores citados por Mc Kellar y revisados por Allocati (1999) sugieren que el número de bacterias no es tan importante como el género de las mismas y las especies dentro del género.

En el presente trabajo no se han identificado géneros bacterianos por lo que la información citada anteriormente avala los resultados obtenidos.

Por no existir degradación de las fracciones caseínicas analizadas, no fue posible cuantificar el efecto de la adición con CO_2 en la proteólisis

5 CONCLUSIONES

El presente trabajo permitió evaluar el efecto de la adición de CO₂ en leche cruda refrigerada a 7 °C en los diferentes grupos bacterianos (Mesófilos aerobios, termófilos, termóduricos y Psicrótrofos), así como valorar la actividad proteolítica durante los días de ensayo para el tratamiento y el control.

Los resultados muestran un mayor recuento de bacterias mesófilas aeróbicas a lo largo de todo el ensayo. El tratamiento con CO₂ redujo los recuentos para dicho grupo con respecto al control, produciendo una mayor reducción a las 144 horas de transcurrido el ensayo.

Los psicrótrofos fueron el segundo grupo en importancia con respecto a los recuentos totales. Se halló una disminución de los mismos por la adición de CO₂, aunque dichas diferencias fueron las menores del ensayo.

El grupo de los termófilos y los termodúricos fueron los que presentaron menores recuentos iniciales, mientras que los termodúricos durante todo el ensayo mostraron recuentos del orden 10¹, los termófilos ascendieron hasta el orden de 10⁴ en el control y 10³ para el tratamiento.

La adición de CO₂ en el tratamiento causa una disminución del pH con respecto al control, dicha disminución es la causante del efecto indirecto que provoca el CO₂ en el control de los microorganismos. En la leche se genera un medio más hostil para la sobrevivencia de las bacterias y beneficiando algunas especies en particular.

Entre las 48 y 72 horas se constata la mayor caída del pH para el control y el tratamiento, siendo mayor en este último. Esta disminución coincide con el aumento del crecimiento bacteriano menos en el grupo de los termodúricos. Esto hace suponer que la caída de pH se deba al crecimiento bacteriano y con el mismo a la producción de sustancias que acidifican el medio.

El estudio del deterioro proteico mostró no degradación de las fracciones caseínicas analizadas para el tratamiento ni para el control. Por lo que no se pudo observar el efecto de la adición de CO₂ en la proteólisis.

Se puede concluir que el tratamiento con CO₂ disminuyó los recuentos bacterianos en la mayoría de los tiempos y grupos estudiados y que el descenso del pH fue uno de los parámetros que influyó en dicho control.

6 RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo fue evaluar el nivel de contaminación bacteriana (ufc/mL) de la leche proveniente del tanque de frío y refrigerada a 7° C durante 144 horas, determinar el efecto de la aplicación de anhídrido carbónico sobre el recuento microbiano y analizar el deterioro de las caseínas por electroforesis durante los días del ensayo. La muestra fue obtenida en el mes de diciembre del 2006, directamente del tanque de frío (4 °C), se transportó al laboratorio de Tecnología de los Alimentos en condiciones de refrigeración. La leche fue acondicionada en 4 matraces Erlenmeyer, dos de los cuales fueron control, mientras que a los restantes se les colocó CO₂ hasta alcanzar pH 6,3. Los muestreos se realizaron a las 0, 48, 72 y 144 horas, a los cuales se evaluó recuento bacteriano en placa para mesófilos, termófilos, termóduricos y psicrótrofos. En los mismos tiempos se tomaron registros del pH. Las muestras antes de ser procesadas fueron homogenizadas mediante el uso de vortex. Se realizó el método de recuento viables en placa por diluciones seriadas decimales en tubo (10^{-1} a 10^{-3}) y transferidas a placa de Petri por el método de siembra en superficie. Luego se incubaron por un período de 48 horas excepción de los psicrótrofos los cuales se incubaron durante 144h en refrigerador a 7 °C. Los máximos recuentos fueron para mesófilos, seguidos por psicrótrofos, termófilos y por último los termodúricos. El tratamiento con CO₂ disminuyó los recuentos bacterianos en la mayoría de los tiempos y grupos estudiados. La adición de CO₂ en el tratamiento causa una disminución del pH con respecto al control, dicha disminución es las causantes del efecto indirecto que provoca el CO₂ en el control de los microorganismos. Se evaluó el deterioro de las caseínas por electroforesis en gel (SDS- PAGE) al 15 %. Él mismo no mostró degradación de las fracciones de caseína, por lo que no se pudo determinar el efecto de la adición de CO₂ en la proteólisis.

Palabras clave: Leche; Dióxido de Carbono; Mesófilos; Termófilos; Termodúricos; Psicrótrofos; Proteólisis.

7 SUMMARY

The objectives of the present job was evaluate the milk bactrian contamination level (ufc/mL) coming of the cold tank and refrigerate at 7° C during 144 hours, determine the effect of the carbon dioxide aplication over the microbial recount and analyze the casein deterioration for electrophoresis during the experiment days. The sample was taken in december of 2006, directly of the cold tank (4°C), was trasportated to the food technology laboratory in refrigeration conditions. The milk was conditioned in 4 Erlenmeyer matrass, two of those were control, while to the remainder were putted CO₂ untill reach a 6,3 pH. The samples were realized at 0, 48, 72 and 144 hours, and then evaluated the bactrian recount in plate for mesophilic, thermophiloc, thermoduric and psychotrophs. At the same times registered the pH. The samples before beying sued were homogenized with vortex. Realized the recount method viables in plate for decimal dilutions series in tube (10^{-1} to 10^{-3}) and transfered to a Petri plate for the surface sowing method. Later were incubated during 48 hours for exeption of the psychotrophs that were incubated during 144 hours in the refrigerator at 7°C. The maximum recounts were for mesophilic, folowed by psychotrophs, thermophiloc, and by thermoduric. The CO₂ treatment decreassed the bactrian recount in the most of times and in studied groups. The addition of CO₂ in the treatment cause a decrease of pH with respect to the control, this decrease is the causing of the indirect efect witch cause the CO₂ in the microorganisms control. By electrophoresis in gel (SDS- PAGE) at 15% it evaluated the caseins deterioration. Itself didn't showed the casein fractions degradation, so can't determinate the effect of CO₂ adition in the proteolysis.

Key words: Milk; Carbon dioxide; Mesophilic; Thermoduric; Thermophiloc; Psychrotrophs; Proteolysis.

8. BIBLIOGRAFIA

1. ALAIS, C. 1985. Ciencia de la leche; principios de técnica lechera. Barcelona, Reverté. 873 p.
2. ALOCATI, P. 1999. Proteólisis de la leche cruda y procesada. Tesis de Maestría. Buenos Aires, Argentina, Universidad de Buenos Aires. 78 p.
3. BALLOU, L. U.; PASQUINI, M.; BREMAL, R.D. 1995. Factors affecting herd milk composition and milk plasmin at four levels of somatic Cell Counts. J. Dairy Sci 78: 2186-2195
4. CARABALLO, P. N.; Douglas, G. F. 2002. Evaluación del deterioro proteico por Psicrótrofos en leche ovina y caprina en tanque de frío. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 58 p.
5. CARBALLO, A.; ILUNDAIN, M.; INCIARTE, J.; LATASTE, J. 1999. Estudio de la contaminación microbiana en la leche en seis tambos del departamento de Flores en dos épocas del año. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 61 p.
6. COUSINS, M. 1982. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products; a review. J. Food. Protection. 45 (2): 172-207
7. _____; BRAMLEY, A. 1987. Microbiología de la leche cruda. In: Robinson, R.K. ed. Microbiología lactológica. Zaragoza, Acribia. v.1, pp. 109-150.
8. CHAPAGNE, C.P; GIRARD, F; MORIN, N. 1990. Inhibition of psychrotrophic bacteria of raw milk by addition of lactic acid bacteria. J. Food Protection. 53: 400-403.
9. DEETH, HILTON C. 2006. Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. Int. Dairy J. 16(6): 555-562.
10. DIXON, N.; KELL, D. B. 1989. The inhibition by carbon dioxide of the growth and metabolism of microorganisms. J. Appl. Bacteriol. 67: 109-136.

- 11.FAO/OMS. 2000. Codex alimentarius; leche y productos lácteos. Directrices para la conservación de la leche cruda mediante la aplicación del Sistema de la Lactoperoxidasa. Roma, FAO. v. 12, pp. 125-130.
- 12.GLASS, K.A.; KAUFMAN, K. M.; SMITH, A. L.; JHONSON, A.; CHEN, J. H.; HOTCHKISS, J. H. 1999. Toxin production by clostridium botulinum in pasteurized milk treated with carbon dioxide. J. Food. Prot. 62 (8): 872-876.
- 13.GUERRERO L.; ROMÁN, S.; PACHECO, L. 2003. Proteólisis de la leche cruda almacenada en frío. Efecto de las enzimas proteolíticas sobre la integridad de las caseínas. Revista Científica, FCV-LUZ. 13(3): 187-192.
- 14.GUINOT-THOMAS, P.; AMMOURY, M.; LAURENT, E. 1995. Effects of storage conditions on the composition of raw milk. Int. Dairy J. 5: 211-223.
- 15.HERNANDEZ, A. 2003. Lechería comercial en el Uruguay; contribución a su conocimiento. Montevideo, MGAP. DIEA. 68 p.
- 16.HOMAN, J. E.; WATTIAUX, M. 1998. Guía técnica lechera. Madison, University of Wisconsin. The Babcock Institute for International Dairy Research and Development. 246 p.
- 17.HOTCHKISS, J. H.; CHEN, J. H.; LAWLESS, H. 1999. Combined effects of carbon dioxide and barrier films on microbial and sensory change in pasteurized milk. J. Dairy Sci. 82: 690-695.
- 18.JUFFS, H. S.; BABEL, F.J. 1975. Inhibition of psychrotrophic bacteria. J. Dairy Sci. 58 : 1612-1619.
- 19.KING, J. S.; MARBIT, L. A. 1982. Preservation of raw milk by the addition of carbon dioxide. J. Dairy Research. 49: 439-447.
- 20.LAW, B. 1979. Reviews of the progress of dairy science; enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. J. Dairy Research 46: 573-588.
- 21.LE ROUX, Y.; COLIN, O.; LAURENT, F. 1995. Proteolysis in samples of quarter milk with varying somatic cell counts. 1. Comparison of some indicators of endogenous proteolysis in milk. J.Dairy Sci 78: 1289-1297.
- 22.MA, Y.; RYAN, C.; BARBANO, D.M.; GALTON, D. M.; RUDAN, R. A. BOOR, K.J. 2000a. Effect of somatic call count on quality and shelf-Life of

- pasteurized fluid milk. J. Dairy Sci 83: 264-274.
- 23._____.; BARBANO, D. M.; SANTOS, M. 2000b. Effects of CO₂ addition to raw milk, on proteolysis and lipolysis at 4 °C. J. Dairy Sci. 86: 1616-1631.
 - 24._____.; _____. 2003a. Milk pH as function of CO₂ concentration, temperature, and pressure in a heat exchanger. J. Dairy Sci. 86: 3822-3830.
 - 25._____.; _____. 2003b. Serum protein and casein concentration; effect on pH and freezing point on –milk with added CO₂. J. Dairy Sci. 86: 1590-1600.
 - 26.MAGARIÑOS, H. 2000. Producción higiénica de la leche cruda. (en línea). Guatemala, Producción y Servicios Incorporados. p. 96. Consultado 15 abr. 2006. Disponible en http://www.science.oas.org/OEA_GTZ/LIBROS/LA_LECHE/leche.htm
 - 27.MARTIN, J. D.; WERNER, B. G.; HOTCHKISS, J. H. 2003. Effects of carbon dioxide on bacterial growth parameters in milk as measured by conductivity. J. Dairy Sci. 86:1932-1940.
 - 28.MUNSH – ALATOSSAVA, P.; ALATOSSAVA, T. 2006. The darker side of milk spoiling psychrotrophs. (en línea). s.l., University of Helsinki. Consultado 10 jun. 2006. Disponible en <http://www.smts.fi>
 - 29.MURPHY, S.C.; CRANKER, K.; SENYK, G. F.; BARBANO, D.M.; SAEMAN, A.I.; GALTON, D.M.1989, Influence of mastitis on lipolysis and proteolysis in milk. J. Dairy Sci. 72: 620-626.
 - 30.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 milk. J. Dairy Research. 67:199-207.
 - 31.REGINENSI, S.; DAMIAN, J. P.; BERMÚDEZ J. 2004. Calidad y deterioro enzimático microbiano en leche y productos lácteos. In: Seminario Leche y Productos Lácteos, Aspectos Moleculares y Tecnológicos (1º., 2004, Montevideo, Uruguay). Resúmenes. Montevideo, Facultad de Agronomía. 1 disco compacto, 8 mm.
 - 32.REINHEIMER, J. A. 2001. Control del deterioro microbiano en productos lácteos por inyección de CO₂. Tecnología Láctea Latinoamericana. 22: 10-13.

33. RUAS-MADIEDO, P.; BASCARAN, V.; BRANA, A. F.; BADA- GANCEDO, J. C.; REYES-GAVILAN, C. G. D. 1998a. Influence of carbon dioxide addition to raw milk on microbial levels and some fat-soluble vitamin contents of raw and pasteurized milk. *J. Agric. Food Chem.* 46: 1552-1555.
34. _____.; _____.; _____.; _____.; _____. 1998b. Influence of carbon dioxide addition to raw milk on microbial levels and some fat-soluble vitamin contents of raw and pasteurized milk. *J. Agric. Food Chem.* 46: 2894-2897
35. _____, P.; DE LOS REYES-GAVILAN, C.G.; OLANO, A.; VILLAMIEL, M. 2000. Influence of refrigeration and carbon dioxide addition to raw milk on microbial levels, free monosaccharides and myo-inositol content of raw and pasteurized milk. *Eur. Food Res. Technol.* 212: 44-47.
36. SCION CORPORATION. 2001. SCION-IMAGE alfa 4.0.3.2. Washington. Consultado 24 feb. 2007. Disponible en [http:// www.scioncorp.com](http://www.scioncorp.com)
37. SILVEIRA, I.; PINHEIRO, E.; TEIXEIRA, D. 1998. Influencia de microorganismos psicrotróficos sobre la calidad de la leche refrigerada. *Higene Alimenticia.* 12 (55): 21-27.
38. SOLER, D.M. 2005 Mecanismos endógenos para mantener la calidad de la leche; sistema lactoperoxidasa. (en línea). Habana, Cuba, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Consultado 20 jun. 2006. Disponible en <http://www.monografias.com>
39. TAVERNA, M. 2000. El gusto rancio de la leche. *Infortambo.* no. 134: 62.
40. UNIVERSIDAD DE ZULIA. FACULTAD DE CIENCIA VETERINARIA. 2006a. Microbiología de la leche cruda. (en línea). Maracaibo. Consultado 15 feb. 2007. Disponible en <http://members.tripod.com.ve/tecnologia/microteo.htm>
41. _____. 2006b. Microbiología de la leche I. (en línea). Maracaibo. Consultado 20 nov. 2006. Disponible en <http://members.tripod.com.ve/tecnologia/documentos>
42. URUGUAY. MINISTERIO DE GANADERÍA AGRICULTURA Y PESCA. DIRECCION DE ESTADISTICA AGROPECUARIA. s.f. Series historicas. (en línea). Montevideo. Consultado 15 jun. 2006. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/DIEA/default.htm>

43. WERNER, M. G.; HOTCHKISS, J. H. 2002. Effect of carbon dioxide on the growth of *Bacillus cereus* spores in the milk during storage. *J. Dairy Sci.* 85: 15-18.