

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Agroindustria Alimentaria
Ingeniería en Agroindustria Alimentaria



Proyecto Especial de Graduación
**Determinación de la vida de anaquel de leche ultra pasteurizada
basada en parámetros de calidad de la leche cruda**

Estudiante

Valeria Paola Santillán Oleas

Asesores

Luis Fernando Osorio, Ph.D.

Mayra Márquez González, Ph.D.

Honduras, julio 2021

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ADELA M. ACOSTA MARCHETTI

Directora Departamento de Agroindustria Alimentaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Agradecimientos

Agradezco a la empresa Lácteos Santillan, por permitirme desarrollar la investigación. Sobre todo, agradezco a los gerentes, el señor Pedro Santillan y la Ing. Libia Oleas, por facilitarme la información pertinente para conducir el estudio, y brindarme apoyo económico. A la vez, a la Dra. Mery Oleas, jefa de producción y encargada de control calidad, por la inducción al uso de equipo de laboratorio e inducción en los procesos y normas de control empleadas en la empresa.

Contenido

Agradecimientos	3
Índice de Cuadros.....	6
Índice de Figuras	7
Resumen	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
Materiales y Métodos.....	13
Localización del Estudio	13
Recolección de Datos.....	13
Conteo de células somáticas (CCS)	14
Recuento de bacterias aerobios mesófilas (BMA).....	14
Presencia de Microorganismos Esporulados en Leche Cruda	15
Densidad	15
Acidez Titulable de Ácido Láctico (ATECAL).....	15
Medición de pH.....	16
Punto de Crioscópico	16
Análisis de Grasa	16
Evaluación de Presencia de Coagulación o Separación de Grasa	17
Análisis Estadístico	18
Resultados y Discusión.....	19
Conclusiones	28

Recomendaciones.....29

Referencias.....30

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Calidad microbiológica leche cruda.....	19
Cuadro 2 <i>Resumen calidad microbiológica de leche cruda</i>	20
Cuadro 3 <i>Correlación de parámetros microbiológicos de leche cruda hasta alcanzar un factor de coagulación de 2.</i>	21
Cuadro 4 <i>Tiempo de vida de anaquel real y estimado de leche UHT basado en el conteo inicial de células somáticas.</i>	24
Cuadro 5 Correlación de parámetros de leche UHT por 50 días post tratamiento térmico.....	25
Cuadro 6 Promedio y CV de los parámetros vida de anaquel de leche fluida UHT.	27

Índice de Figuras

Figura 1 Escala de referencia para valorar la coagulación de leche UHT.	18
Figura 2 <i>Ajuste de modelo indirecto con probabilidad de 0.0002 para predecir vida de anaquel de leche UHT.</i>	23

Resumen

El objetivo del estudio fue evaluar la influencia de la calidad de la leche cruda en la vida de anaquel de leche UHT. La calidad de la leche cruda se evaluó por el Contenido de Células Somáticas (CCS), Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA) y microorganismos esporulados. Mientras que La vida de anaquel se analizó con las variables de pH, densidad, punto de crioscopia, ATECAL, % de grasa, bacterias mesófilas aerobias, y coagulación. Se evaluaron siete lotes de leche UHT, para la vida de anaquel se evaluaron 10 muestras por cada lote por un periodo de 50 días. La vida de anaquel se delimitó por un valor de 2 de coagulación y/o un ≥ 0.20 ATECAL. El análisis estadístico se realizó usando un modelo de correlación para relacionar la calidad de la leche cruda con la vida de anaquel del producto. Se determinó que la vida de anaquel presentó una correlación de 0.97 con una probabilidad de 0.0002, con referencia al contenido de células somáticas en leche cruda. En base a la correlación encontrada se hizo una regresión lineal, para poder obtener una ecuación para predecir la vida de anaquel del producto en base a CCS presentes en la leche cruda. Durante la vida de anaquel, los parámetros que presentaron alta correlación (> 0.80) y probabilidad < 0.0001 , fue el PH, ATECAL, coagulación y % de grasa. Se concluyó, que el conteo inicial de CCS es el parámetro de calidad de leche cruda que más influyó en la vida de anaquel de leche UHT.

Palabras clave: Células somáticas, leche fluida, UHT.

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the influence of raw milk quality on the shelf life of UHT milk. The quality of raw milk was evaluated by the content of somatic cells (SC), aerobic mesophilic bacteria, and sporulated microorganisms. The shelf life was analyzed with the variables of pH, density, cryoscopy point, ATECAL, % fat, aerobic mesophilic bacteria, and coagulation. Seven batches of UHT milk were evaluated, for the shelf life, 10 samples per batch were evaluated for 50 days. Shelf life was delimited by the value 2 of coagulation, and ≥ 0.20 ATECAL. Statistical analysis was performed using a correlation model to relate the quality of raw milk with the shelf life of the product. It was determined that the shelf life presented a correlation of 0.97 with a probability of 0.0002, concerning the content of somatic cells in raw milk. Based on the correlation found, a linear regression was carried out to obtain an equation to predict the shelf life of the product based on the CSC present in raw milk. During the shelf life, the parameters that presented high correlation (> 0.80) and probability < 0.0002 , were the PH, ATECAL, coagulation and fat content. It was concluded that the initial CSC count is the raw milk quality parameter that most influenced the shelf life of UHT milk.

Keywords: Fluid milk, somatic cells, UHT.

Introducción

La industria láctea en los últimos años ha tenido un gran desarrollo, conllevando la implementación de nuevas tecnologías para su procesamiento debido al aumento de consumo per cápita de productos lácteos en el mundo, con una tasa de crecimiento del 1.8% anual. Sin embargo, el creciente desarrollo de la industria láctea ha generado parámetros más exigentes para la materia prima, para poder obtener productos finales de calidad e inocuos (Murphy *et al.* 2016).

Con el fin de obtener un producto con mayor vida útil, la industria láctea emplea procesos térmicos para inactivar enzimas y eliminar bacterias que afecten la vida de anaquel. El proceso térmico de ultra alta temperatura (UHT, por sus siglas en inglés), consiste en someter a la leche cruda a altas temperaturas para obtener una esterilización comercial, eliminando bacterias patógenas y reduciendo el 99% de carga microbiana (Deutsh y Jackson 1970). Aunque este tratamiento térmico posee una alta efectividad existen dos factores que pueden afectar la estabilidad del producto. La primera es la presencia de esporas termodúricas de bacterias que se encuentran en leche cruda, que son capaces de sobrevivir al tratamiento térmico y generan problemas durante la vida de anaquel del producto (Delides *et al.* 1976). El segundo factor que puede afectar a la estabilidad del producto es la contaminación durante el envasado. Sin embargo, distintas investigaciones han relacionado la presencia de células somáticas, con la reducción de la vida de anaquel de la leche UHT (Kračmarová *et al.* 2018).

Las Células Somáticas (CS) son un componente natural en la leche, usado como un indicador de salud en la ubre y calidad de la leche. Las CS liberan proteínas endógenas que contribuyen al perfil sensorial final del producto. La mayor parte de enzimas endógenas identificadas son proteolíticas. Sin embargo, el efecto de una elevada concentración de CS produce una pérdida de caseína, calidad sensorial, y vida de anaquel del producto. La presencia de enzimas exógenas de CS produce una degradación de β -caseína y α_{s1} -caseína afectando la vida de anaquel de leche ultra efecto CS y Recuento Bacteriano (RB) en la estabilidad de almacenamiento de leche ultra procesada, determinó

que conteos elevados de Células Somáticas (CCS) entre 740,000 y 1,102,00 células/mL, con lleva a cambios en el producto a partir del día 60 posteriores al procesamiento. Por otro lado, al presentar un valor de células somáticas menor a 50,000 células por mL, los cambios serán perceptibles al día 180. A la vez, productos con recuentos bacterianos altos ($> 2 \times 10^6$ UFC/mL) presentan cambios de sabor a partir del día 30. Un punto relevante en el estudio menciona que la leche cruda con recuentos bacterianos bajos, pero con conteos elevados de células somáticas sufren degradación de proteínas y grasas durante su vida de anaquel.

La importancia del recuento bacteriano en la leche cruda empleada para la elaboración de un producto ultra pasteurizado ha sido bien documentada a través de varias investigaciones. Yacoub *et al.* (2017), mencionaron la influencia de bacterias aerobias formadoras de esporas en productos sometidos a tratamientos térmicos. La presencia inicial de bacterias aerobias son causantes de deterioro y reducción de vida de anaquel. Entre las bacterias más destacadas, se encuentran las de la especie *Bacillus*, que hidrolizan la caseína y fermentan la lactosa. En leche sometida a procesos de ultra pasteurización la presencia de un nivel elevado de aerobios formadores de esporas reduce la vida de anaquel final del producto.

La presente investigación busca determinar la influencia de la calidad microbiológica de la leche cruda en la vida de anaquel de la leche UHT. Adicionalmente, se monitorearon otras variables fisicoquímicas de la leche cruda a lo largo de la vida de anaquel. La calidad de la materia prima influye de manera directa en el producto final que se desea obtener. Shojaei y Yadollahi (2008), mencionan que los principales parámetros que se deben analizar incluyen el porcentaje de grasa, proteína, temperatura de recibo, acidez titulable, sólidos no grasos, gravedad específica, como parámetros fisicoquímicos. Adicionalmente, de los análisis microbiológicos. Los parámetros de control de una industria láctea determinan la calidad del producto y se relacionan directamente con problemas de contaminación o incumplimiento de estándares de control para los entes reguladores en los países de producción y distribución.

La investigación se realizó en la empresa lácteos Santillan, en Ecuador. Esta empresa se creó en el año 1998 iniciando con la elaboración de refrescos, pero a partir del año 2000 se incluyó productos lácteos en su cartera de productos. Actualmente, la empresa dispone de diversas líneas de productos como yogur, queso, leche ultra pasteurizada, refrescos y manjar de leche. La empresa procesa 107,000 litros semanales, de lo cual el 80% del volumen recibido es empleado para la elaboración de leche ultra pasteurizada. Siendo este producto el principal de la industria, y el de mayor comercialización. Razón por la cual, se decidió conducir una investigación para evaluar factores que influyen la vida de anaquel del producto a partir de la calidad de materia prima empleada para su elaboración.

En el desarrollo del estudio se identificaron varias limitantes. Entre las principales se evidenciaron, la falta de control y mantenimiento de los equipos empleados en el laboratorio de microbiología de la empresa y la poca disponibilidad de material idóneo para la elaboración del estudio. Otra de las limitantes, fue la falta de insumos en el mercado ecuatoriano debido a la pandemia provocada por el virus COVID-19.

Los objetivos de la presente investigación fueron:

- Elaborar un modelo de regresión para predecir la vida de anaquel de leche ultra pasteurizada con base en la calidad de leche cruda.
- Analizar los cambios fisicoquímicos y microbiológicos de la leche ultra pasteurizada a lo largo de la vida de anaquel.

Materiales y Métodos

Localización del Estudio

El estudio se realizó en la empresa láctea, Lácteos Santillán ubicada en la parroquia de San Luis provincia de Chimborazo en la republica de Ecuador, Sudamérica.

Recolección de Datos

Se evaluó la calidad leche cruda, seguida la calidad de la leche UHT durante el almacenamiento. Para evaluar la calidad de la leche cruda se tomó una muestra representativa, 250 mL, antes del proceso de ultra pasteurización. Se evaluó, las variables de recuento de células somáticas, Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA), para determinar la calidad microbiológica en leche cruda. Se analizaron las características químicas de la leche cruda por control y registro de la empresa, en parámetros de porcentaje de grasa, punto de crioscopia, acidez, potencial de hidrógeno (pH) y densidad. La calidad de leche cruda se determinó por el conteo inicial de células somáticas (células/mL), recuento de Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA) y presencia de microorganismos esporulados. Por otro lado, en la vida de anaquel de la leche ultra pasteurizada se evaluó las variables: Densidad, porcentaje de grasa, punto de crioscopia, pH, y presencia de coagulación en el producto, como parámetro microbiológico se empleó el conteo de BMA.

Una vez recibida la leche cruda, se realizaron análisis microbiológicos y fisicoquímicos como control de calidad. Se procedió a un proceso de clarificado y se colocó la leche en tanques de almacenamiento. La leche cruda se sometió a un tratamiento térmico de ultra pasteurización a 135 °C, por 6 segundos. Seguido del envasado aséptico en bolsas (Polietileno de Baja Densidad PED lámina coextruida) en una presentación de 250 mL. Una vez terminado el lote de producción, se procedió a tomar 10 muestras aleatorias para el análisis de vida de anaquel durante un tiempo de almacenamiento de 50 días. Se realizó un análisis de vida acelerada durante el almacenamiento, con el uso de dos incubadoras a una temperatura a 37 °C, los parámetros como temperatura y humedad relativa se controlaron con un higrómetro digital.

Se evaluaron siete lotes de leche ultra pasteurizada, durante 50 días de almacenamiento, a 37 °C. Se determinó la vida de anaquel del producto, por un muestreo durante de tiempo con intervalos de cinco por 50 días. Se realizaron diez tiempos de muestreo (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 días) por cada lote, para un total de 70 unidades experimentales. En cada tiempo de muestreo de la vida de anaquel se analizó la acidez titulable, porcentaje de grasa, densidad, potencial de hidrógeno, recuento de aerobios totales y coagulación. El fin de la vida de anaquel del producto, se definió por el valor de ≥ 0.20 ATECAL y un valor de 2 para la coagulación.

Conteo de Células Somáticas (CCS)

El recuento de células somáticas se realizó en leche cruda. Se empleó el método de análisis directo de células somáticas establecido por Wehr y Frank (2004). Se usaron portaobjetos que contenían cuatro círculos de 1 cm² de diámetro. Se tomó una muestra de 30 mL y se calentó a baño María hasta alcanzar 40 °C. La muestra se homogeneizó y se extrajo 0.01 mL de contenido que se colocó cada área circular del portaobjeto. El portaobjetos se colocó en una superficie plana caliente para su secado. Posteriormente, se procedió a la tinción de la placa, sumergiéndolo en el reactivo Newman Lampert por dos minutos, el exceso se retiró con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente.

Una vez seca la muestra se procedió al conteo de células somáticas bajo el microscopio con el lente objetivo 100 ×, el conteo se realizó de manera horizontal de la línea central del círculo. El valor encontrado en el recuento se multiplicó por el factor de tira única (4,296) y se expresa como células somáticas por mililitro (CS/mL).

Recuento de Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA)

El recuento de BMA se realizó en la leche cruda y leche UHT. Para el recuento de BMA en leche cruda se procedió a preparar seis tubos de ensayo con 9 mL de agua peptonada. Se tomó 1 mL de leche cruda y se colocó en el primer tubo de ensayo, siendo esta la dilución 10⁻¹. Posteriormente, se homogeneizó el tubo de ensayo, y se transfirió 1 mL de muestra al siguiente tubo de ensayo

resultando la dilución 10^{-2} , se procedió de esa manera hasta obtener una dilución de 10^{-6} . De la dilución final se tomó 1 mL de muestra y se colocó en placas de siembra directa de la marca comercial Petrifilm para BMA. El tiempo y temperatura de incubación se establecieron por el método oficial, incubándolo por un tiempo de 48 horas, a 32 °C. Para el conteo de BMA en leche UHT, se tomó 1 mL de la bolsa y se sembró directamente en la placa petrifilm. Se incubó al tiempo y temperatura establecido en el método oficial (AOAC 2000a).

Presencia de Microorganismos Esporulados en Leche Cruda

Se tomó una porción de 50 mL de leche cruda en un tubo de ensayo y se calentó a baño María a una temperatura de 70 °C, por cinco minutos. Se procedió a enfriar la muestra, y colocar 1 mL de muestra en la placa de petrifilm. Posteriormente, se incubó por 48 horas, a una temperatura de 32 °C. Una vez concluido el tiempo de incubación se procedió a la lectura de resultados, reflejando el crecimiento bacteriano en presencia de esporas en las muestras analizadas de leche cruda.

Densidad

El análisis de densidad se realizó con un lactodensímetro marca Funke Gerber, calibrado a 20 °C. Se tomó una cantidad de 100 mL en una bureta de plástico, se colocó el lactodensímetro en el interior del mismo y se esperó tres minutos para proceder a realizar la lectura (AOAC 2000e).

Acidez Titulable de Ácido Láctico (ATECAL)

Se realizó el análisis volumétrico, tomando una alícuota de 10 ml de leche en un vaso de precipitado. Se colocó de dos a tres gotas de fenolftaleína (indicador) para la valoración. Se tituló la muestra con hidróxido de sodio al 0.1 N. La valoración se realizó hasta la aparición de un tenue tono rosa, que permanezca por más de 30 segundos. Para el cálculo de ácido láctico en 100 mL de leche se empleó la Ecuación 1. Una vez obtenido el valor de ácido láctico (mg/100 mL) con la Ecuación 1, el resultado se divide para 1,000 para expresar el resultado porcentaje (%) ATECAL. Este método se aplicó para la leche cruda y ultra pasteurizada. Este parámetro fue empleado para determinar el fin

de vida de anaquel del producto, en el cual se empleó como factor limitante un valor 0.20 ATECAL, expresado en porcentaje (%) (IRAM 14006).

$$\text{Acido láctico} \frac{mg}{100ml} = \frac{Vg \times N \times 90 \times 100}{Vm} \quad [1]$$

Donde:

Vg = Volumen de NaOH añadido

N = Concentración de solución de hidróxido de sodio estandarizado expresado en Eq/L

90 = Equivalente de ácido láctico en peso

Vm = Volumen de leche usada en la titulación

Medición de pH

Se procedió a tomar una muestra del producto (50 mL) en un vaso de precipitación se colocó el potenciómetro para la lectura. El pH de las muestras se midió usando un medidor de pH digital, potenciómetro (Martini Instruments, MI 151). El medidor de pH se calibró previo a la lectura usando soluciones tampón estándar de pH 4.0 y 7.0 (AOAC 2000c).

Punto Crioscópico

Para la medición del punto de crioscopia, se usó un crioscopio digital (Cryo Smart, Inventagri). La calibración del crioscopio se realizó con refrigerante (ASTORI, P314). Para el análisis del punto crioscópico, se tomó 2 mL de muestra y se colocó en un tubo de análisis, que posteriormente se introdujo en el equipo para su análisis (AOAC 2000d).

Análisis de Grasa

Para el análisis se usó un butirómetro, se colocó 10 mL de ácido sulfúrico seguido de 11 mL de leche a analizar y 1 mL de alcohol amílico. Una vez colocados todos los reactivos con el uso de un clavo se procede a colocar el corcho en el butirómetro. Posteriormente, se toma con el uso de los extremos del butirómetro se mezcla los ácidos, hasta obtener una solución homogénea. Se colocó el butirómetro en la centrifuga por cuatro minutos, la velocidad de centrifugado es de 1100 rpm. Una

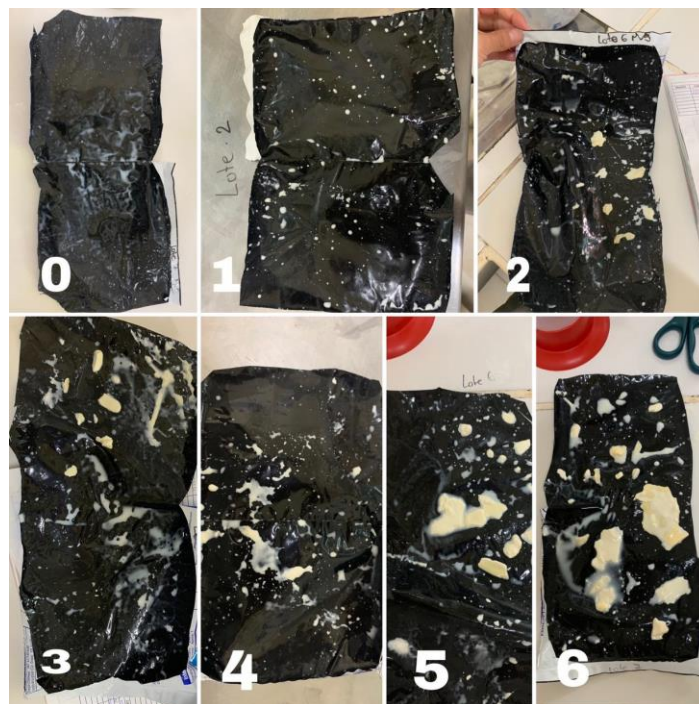
vez terminado el centrifugado se deja reposar el mismo, y una vez equilibrado la columna de grasa se procede a la lectura del resultado (AOAC 2000b).

Evaluación de Presencia de Coagulación o Separación de Grasa

Se realizó en base a la metodología empleada por Karlsson *et al.* (2019), donde se valoró la capa de crema en el envase del producto con una escala de seis grados; sin capa de crema visual, pequeños grumos de crema, ondas de crema, trozos medianos de crema, coágulos de grasa, grandes coágulos de grasa. Se usó la metodología mencionada con la variación de medir el nivel de coagulación donde se clasifico por los parámetros de adherencia, grosor y cantidad de coágulo en la leche UHT. Se realizó una escala con fotografías de referencias con una valoración de 0 a 6 (Figura 1). El valor asignado para determinar el inicio del proceso de coagulación de la leche es dos, marcando el fin de la vida de anaquel del producto. Este valor se determinó en base a un estudio realizado por Datta y Deeth (2001) donde mencionan que el proceso de gelificación consta de cuatro etapas. La etapa inicial es un periodo corto, donde se produce una reducción de volumen, caracterizado por la disminución en la viscosidad después se observa la formación de un gel que se evidencia como una matriz de proteínas tridimensional que está formada de β -lacto globulina, k-caseína, y proteínas asociadas.

Figura 1

Escala de referencia para valorar la coagulación de leche UHT.



Análisis Estadístico

Se tomó el registro de los resultados de los siete lotes evaluados y se procedió a analizarlos con el programa SAS (Statistical Analysis System). En el programa SAS se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson. Se realizaron dos análisis de correlación en el estudio. La primera correlación se estableció entre la vida de anaquel determinada por el valor ATECAL y coagulación con los parámetros de calidad microbiológica de la leche cruda. Seguido de un modelo de regresión, a partir de los resultados obtenidos, se utilizó una prueba t de estudiante para determinar diferencias estadísticas entre dos grupos evaluados definidos como tiempo de vida útil y real y estimado. La segunda correlación se estableció con base a los parámetros analizados durante la vida de anaquel del producto. Los valores p se calcularon mediante ANOVA de una vía (intervalo de confianza del 95% de dos colas).

Resultados y Discusión

Se evaluó la calidad de leche cruda usada en la elaboración de siete lotes de leche UHT. Se analizó la calidad microbiológica: Conteo de células somáticas, Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA) y microorganismos esporulados (Cuadro 1). Para el conteo de células somáticas se empleó el método directo de conteo bajo microscopio, y el conteo de BMA y microorganismos esporulados se realizó una siembra directa en placas de siembra de marca comercial Petrifilm. Se observa que la materia prima empleada en la empresa Lácteos Santillan presenta una gran variabilidad en la calidad de la leche cruda. Es importante mencionar que, los parámetros de calidad de la leche cruda dependerán del manejo del hato lechero y las buenas prácticas de ordeño.

Cuadro 1

Calidad microbiológica leche cruda.

Lote	Células Somáticas (CCS/mL)	BMA (UFC/mL)	Micoorganismos esporulados (UFC/mL)
Lote 1	220,000	08×10 ⁶	34
Lote 2	410,000	06×10 ⁶	<1
Lote 3	260,000	60×10 ⁶	01
Lote 4	640,000	63×10 ⁶	05
Lote 5	630,000	28×10 ⁶	<1
Lote 6	180,000	19×10 ⁶	15
Lote 7	300,000	26 ×10 ⁶	<1

El conteo inicial de células somáticas fue el parámetro que presentó el coeficiente de variación más bajo, con un valor de 3.93 de los datos analizados (Cuadro 2). Hernández-Reyes y Bedolla-Cedeño (2008), mencionan que el conteo de células somáticas en leche cruda es un indicador indirecto para conocer el estado de salud de la ubre de un hato y puede ser empleado para verificar la calidad de la leche. La leche cruda presentó un alto conteo de BMA, lo que indica problemas de higiene y contaminación en el hato lechero. Las características fisicoquímicas de la leche ocasionan que sea un medio ideal para su crecimiento y supervivencia.

Entre las principales características se encuentra un pH neutro, y alta actividad de agua (A_w), lo cual genera el ambiente ideal para el crecimiento de microorganismos (Doyle y Buchanan 2013).

Mientras que la cantidad de esporas presentes dependerá si existen bacterias formadoras de esporas o termodúricas presentes.

Cuadro 2

Resumen calidad microbiológica de leche cruda.

Parámetro Microbiológico	Media \pm DE	%CV
CCS (Log CS/mL)	5.52 \pm 0.21	3.93
BMA (Log UFC/mL)	7.34 \pm 0.29	5.36
Microorganismos esporulados (Log UFC/mL)	0.48 \pm 0.65	12.2

Nota: Desviación Estándar (DE), Porcentaje de Coeficiente de Variación (CV), Células Somáticas (CCS), Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA).

Correlación Vida de Anaquel y Calidad de la Leche Cruda

En el Cuadro 3 se observa la correlación entre las variables de calidad y vida de anaquel de leche cruda, donde se encontró un coeficiente negativo de correlación entre las células somáticas y la coagulación del producto de -0.97 y una probabilidad de 0.0002. Una correlación negativa nos indica, que a medida que el conteo de células somáticas aumente el tiempo de vida útil del producto disminuye por la limitante de coagulación.

Con base en los datos obtenidos en este estudio, se determinó que las BMA y esporas vegetativas en la leche cruda no se asocian con los parámetros limitantes para la de vida de anaquel. El conteo de células somáticas se realizó bajo el conteo directo de microscopio, el conteo de BMA y esporulados se realizó con una siembra directa en placa comercial denominada Petrifilm. Por otro lado, el %ATECAL se obtuvo por medio de titulación y el valor de coagulación con una escala fotográfica de seis puntos.

Se observó que la coagulación, aumentaba durante el almacenamiento del producto, este defecto es denominado por varios autores como “gelificación por edad”. La gelificación por edad, se define como la formación de una voluminosa red de proteínas tridimensionales, ocasionando que la leche pierda fluidez (Raynes *et al.* 2018). Datta y Deeth (2001), mencionan que el gel se forma a partir de proteínas del suero, específicamente por β -lactoglobulina, chief1 y k-caseína que interactúa con la micela de caseína, este proceso es irreversible e indica el fin de la vida útil del producto.

Cuadro 3

Correlación de parámetros microbiológicos de leche cruda hasta alcanzar un factor de coagulación de 2.

	CCS CS/mL	BMA UFC/mL	Esporas UFC/mL	(%) ATECAL	Coagulación
CCS	1.00000	0.37218	-0.50588	-0.18075	-0.97628*
BMA	0.37218	1.00000	-0.41773	-0.19998	-0.40333
Esporas	-0.50588	-0.41773	1.00000	0.40202	0.66136
(%) ATECAL	-0.18075	-0.19998	0.40202	1.00000	0.17257
Coagulación	-0.97628*	-0.40333	0.66136	0.17257	1.00000

Nota: Conteo Células Somáticas (CCS), Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA), Acidez porcentual expresada como ácido láctico (% ATECAL). Los parámetros de ATECAL <0.20 y coagulación con valor de 2, son los limitantes de la vida útil del producto, su valor esta presentado en días.

*P ≤ 0.0002

El proceso de gelificación guarda relación con la temperatura empleada durante el proceso de ultra pasteurización y con la proteólisis ocasionada por proteasas termoestables que no se inactivan posteriormente al tratamiento térmico. La proteólisis es ocasionada por la presencia de proteínas nativas en la leche, como es la plasmina siendo esta la principal proteasa presente en la leche. (Anema 2019).

Ismail y Nielsen (2010), describen que la plasmina es parte de un sistema complejo de proteasa, que se define como “sistema plasmina” que incluye todos los componentes del grupo plasmina. Este sistema ingresa en la leche a través de la glándula mamaria, ya que tienen su origen en el plasma sanguíneo de la vaca. Chramostová *et al.* (2017), mencionan que la cantidad de plasmina es inferior a su zimógeno inactivo denominado plasminógeno. El plasminógeno puede cambiar a su forma activa (plasmina). Mediante activadores los mismos que se asocian con las micelas de la caseína de la leche. Politis *et al.* (1989), describieron que la actividad de plasmina aumenta en la leche durante la mastitis y en la época de lactancia, así como el aumento de activadores de plasminógeno. En la leche, la relación de plasminógeno a plasmina de 4:1, es decir por cada unidad de plasmina presente se encuentran cuatro unidades de plasminógeno. A la vez, se encontró que el plasminógeno presenta una mayor resistencia a tratamientos térmicos al compararlo con su zimógeno (la plasmina).

Manji *et al.* (1986), mencionan que no se encontró plasmina posteriormente al proceso UHT, mientras que la cantidad de plasminógeno existente presentó una disminución de 30% de la cantidad inicial. Heegaard *et al.* (1994) encontraron que el plasminógeno se convierte en plasmina por acción de dos activadores; el tipo uroquinasa (uAP) que guarda relación con las células somáticas y el tipo de tejido que se relaciona con las caseínas de producto (tAP). La actividad de la plasmina se puede controlar empleando inhibidores de plasmina, sin embargo, se desactivan por calor por lo que no pueden ser empleados como un método de control para la activación de enzimas.

La correlación alta negativa de la presencia de células somáticas y la coagulación de edad se explica por el Activador de Plasminógeno uroquinasa (uAP) que se encuentra en las células somáticas. La gelificación será causada por la acción de activadores de plasminógeno endógenos como la uroquinasa (Datta y Deeth 2001). De esta manera, la leche con alto contenido de células somáticas presentara un mayor activador de plasminógeno uroquinasa, lo que causa una mayor activación de plasmina durante la vida de anaquel. La formación de un gel es el resultado del ataque de la plasmina en las β -caseínas en el interior de la micela, ocasionando que las micelas se suavicen y forme un gel suave. Es importante mencionar que temperaturas de almacenamiento superiores a 40 °C, inhibirá el proceso de gelatinización por la inhibición en el proceso de proteólisis (Datta y Deeth 2001).

Se estableció un análisis de regresión para obtener una ecuación que permitiera predecir la vida de anaquel de leche ultra pasteurizada en base al conteo inicial de células somáticas en leche cruda, a partir de la coagulación producida durante el almacenamiento (Ecuación 2). El modelo presento un R^2 de 0.9531 lo que indica que el 95% de los datos obtenidos se ajustaron al modelo matemático (Figura 2).

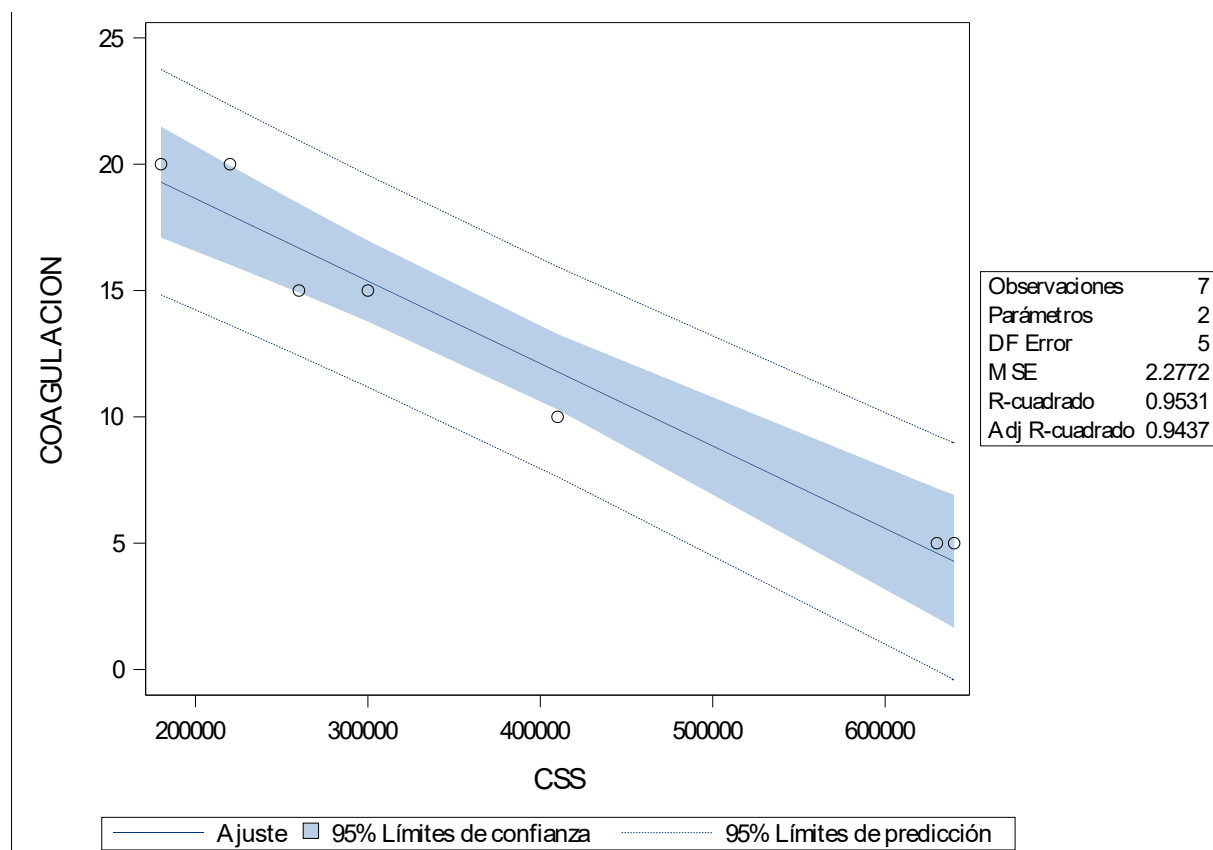
$$Vida\ de\ anaquel = 24.16498 - (0.0000326 \times células\ somáticas) \quad [2]$$

La vida de anaquel depende de la diferencia entre el intercepto 24.16498 y el producto de 0.0000326 por el conteo de células somáticas en la leche cruda. Para la obtención de la ecuación, se empleó siete observaciones de las cuales el 95% se ajustaron al modelo, lo que se ve reflejado en el

valor de R^2 obtenido, esto lo podemos observar en la Figura 2, donde se observa la distribución de datos.

Figura 2

Ajuste de modelo indirecto con probabilidad de 0.0002 para predecir vida de anaquel de leche UHT.



Se observó que a mayor contenido de células somáticas la vida de anaquel se reduce (Cuadro 4). Recio *et al.* (1996), expusieron que la vida de anaquel de leche ultra pasteurizada se puede ver afectada por el tipo de tratamiento térmico empleado y las condiciones de almacenamiento. Sin embargo, todos los lotes fueron elaborados y almacenados bajo las mismas condiciones de temperatura y almacenamiento, pero presentaron diversos tiempos de vida de anaquel.

De esta manera, el único factor variable fue la cantidad de células somáticas presentes coincidiendo que, a un mayor conteo de células somáticas, la vida útil del producto se reducirá por efecto de la gelatinización del producto. Los días de vida útil obtenidos en el estudio, se pueden correlacionar con los teóricos que se obtendrán con el empleo de la Ecuación 3. Por ejemplo, se

calculará el tiempo de vida útil de leche UHT para un almacenamiento de 37 días con un conteo inicial de células somáticas de 410,000 CS/mL.

$$\text{Vida de anaquel} = 24.16498 - (0.0000326 \times \text{células somáticas}) \quad [3]$$

$$\text{Vida de anaquel} = 24.16498 - (0.0000326 \times 410,000)$$

$$\text{Vida de anaquel} = 11 \text{ días}$$

El valor obtenido mediante el cálculo matemático se relacionó con el obtenido en la elaboración del estudio lo que se observa en el Cuadro 4, con una variación en el dato real del encontrado teóricamente del 9%. En el Cuadro 4, describe el tiempo de vida útil real obtenido en el desarrollo del estudio y el tiempo de vida estimado empleando la Ecuación 2. Se procedió al análisis de esta, con una prueba t de estudiante con un valor $P > 0.05$ sin embargo, no se encontró diferencia significativa. Determinando que no existe una diferencia entre el tiempo de vida útil real y el estimado, obtenido en base al conteo inicial de células somáticas.

Cuadro 4

Tiempo de vida de anaquel real y estimado de leche UHT basado en el conteo inicial de células somáticas.

Lote	Células somáticas (CS/ml)	Tiempo de vida útil real (Días) (NS)	Tiempo de vida útil estimado (Días) (NS)
Lote 1	220,000	20	17
Lote 2	410,000	10	11
Lote 3	260,000	15	17
Lote 4	640,000	05	04
Lote 5	630,000	05	04
Lote 6	180,000	20	19
Lote 7	300,000	15	15
		Pr > t	0.9011

Nota: Los lotes que presentaron mayor conteo de células somáticas fue el lote cuatro y cinco, Los mismos que presentaron el menor tiempo de vida útil por efecto de la coagulación en el producto. NS (No Significativo)

Correlación de Parámetros Durante la Vida de Anaquel del Producto

Se estableció una correlación entre las variables analizadas en las 70 muestras, del análisis de vida de anaquel, las que se detallan en el Cuadro 5. En este cuadro se detalla la correlación de los parámetros evaluados.

Cuadro 5

Correlación de parámetros de leche UHT por 50 días post tratamiento térmico.

	Tiempo	BMA UFC/ml	Densidad g/cc	pH	(%) ATECAL	P. Crioscópico	Coagulación
Tiempo	1	0.49146*	-0.10117	-0.84098*	0.80476*	-0.40814*	0.88795*
BMA	0.49146*	1	-0.00302	-0.47792*	0.39319	-0.17156	0.49119*
Densidad	-0.10117	-0.00302	1	0.10184	-0.04981	0.17895	-0.08839
pH	-0.84098*	-0.47792*	0.10184	1	-0.86116*	0.43379*	-0.78173*
ATECAL (%)	0.80476*	0.39319	-0.04981	-0.86116*	1	-0.44629*	0.70696*
P. Crioscópico	-0.40814*	-0.17156	0.17895	0.43379*	-0.44629*	1	0.50508*
Coagulación	0.88795*	0.49119*	-0.08839	-0.78173*	0.70696*	0.50508*	1

Nota: Conteo Células Somáticas (CCS), Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA). Acidez porcentual expresada como ácido láctico (ATECAL)

*Probabilidad < 0.0001

El tiempo presentó una probabilidad menor de 0.001 y alta correlación (Valor de correlación) con las variables coagulación (0.89), acidez (0.80) y pH (0.84). Es decir, a medida que el tiempo aumenta hay una reducción en el valor de pH y un aumento del valor ATECAL. Gaucher *et al.* (1980), mencionan que durante el almacenamiento se producirá una agregación de partículas que en primer lugar formaran un gel. Las partículas más grandes se encontrarán en la superficie del envase, lo que se produce por cambios estructurales en el producto durante el almacenamiento. Nieuwenhuijse (1995), menciona que la rápida agregación de partículas produce un conjunto de proteínas resultando en la formación temprana de un gel. Por lo que, el tiempo de almacenamiento guarda una relación positiva con la coagulación generada en el producto.

Karlsson *et al.* (2019), encontraron que el pH en el almacenamiento tiende a presentar una disminución lineal con el tiempo, lo que coincide con la correlación negativa encontrada entre las variables de pH y tiempo. Negri (2005), menciona que el pH representa la concentración de

hidrógenos libres de la leche, lo que representa la acidez actual. Por otro lado, el análisis de la acidez actual y potencial se denomina acidez en la leche. El ATECAL evalúa la acidez titulable y la desarrollada, es decir, guarda relación con el PH, ya que para su evaluación se busca liberar los grupos H⁺ al medio para su cuantificación. La acidez titulable (ATECAL), presenta una probabilidad <0.0001 y alta correlación negativa 0.86 con el pH. Esta relación se explica por la relación de las variables, al evaluar la acidez actual del producto.

Las bacterias mesófilas aerobias (BMA) presentan una baja correlación con una probabilidad $P < 0.001$, con el tiempo (0.43) y el pH (0.47). El crecimiento de BMA en producto UHT, se produce por la sobrevivencia de microorganismos esporulados en el proceso térmico. Los microorganismos esporulados, son bacterias termo dúricas que toleran los tratamientos térmicos y pueden ocasionar cambios en la vida útil del producto. El crecimiento de estos microorganismos se relaciona con el tiempo. Sin embargo, su desarrollo es independiente y el valor encontrado en la muestra dependerá de la muestra evaluada. Ya que se conoce, que en un lote de análisis las muestras no presentan homogeneidad en el crecimiento microbiológico.

Por otro lado, el desarrollo de microorganismos en el producto se correlaciona con otras variables analizadas. Guillaume-Gentil *et al.* (2002) mencionan que la principal contaminación en leches ultra pasteurizadas se da por los microorganismos del género *Bacillus* spp., lo cual se da por las células vegetativas que presentan, las mismas que no son patógenas y no causan deterioro visible en el producto. Ziyaina *et al.* (2018), relacionaron la presencia de bacterias aerobias con los cambios generados en la vida de anaquel de leche fluida, donde se correlacionó que la cantidad de bacterias en el producto resulta en la disminución del pH, por la acidificación generada por las bacterias denominada acidez desarrollada.

La coagulación o gelatinización presenta una correlación alta positiva con la variable tiempo. Raynes *et al.* (2018), mencionan que la gelificación por edad guarda una relación con el tiempo y temperatura empleada, en el almacenamiento y proceso térmico. Se menciona que un proceso de

esterilización a una temperatura en el rango de 135 a 140 °C por un tiempo de cinco segundos o más, puede acelerar la presencia de gelatinización por edad durante el almacenamiento del producto. Sin embargo, el proceso de gelatinización se caracteriza por aparecer en la parte superior del producto y expandirse a lo largo del envase una vez iniciado el proceso, es decir que a más tiempo de almacén la gelatinización por edad aumentará. Lo que coincide con lo mencionado por Zadow y Chituta (1975), en que el tiempo y temperatura de esterilización influirá en el proceso de gelatinización por edad, así como el almacenamiento.

En los parámetros de vida de anaquel, se encontraron diversos coeficientes de variación durante el desarrollo del estudio, como se observa en el Cuadro 6. un coeficiente de variación menor a 7% en las variables de % grasa, densidad, pH, ATECAL, y punto cronoscopio. La variación se explica por cambios generados en el almacenamiento, y el error humano con respecto a la metodología empleada. La coagulación presenta un CV de 34%, esta variación se debe a la relación de la variable con el contenido de células somáticas en leche cruda, lo que produjo heterogeneidad en los lotes evaluados. El mayor CV% se presentó en el análisis de BMA. La alta variación en el parámetro de BMA, se explica porque en leche UHT se espera una esterilización comercial, sin embargo, hay sobrevivencia de microorganismos esporulados. Los mismos, que no se distribuyen de manera homogénea en los lotes provocando un incremento en el coeficiente de variación, porque la sobrevivencia y desarrollo de los organismos esporulados dependerá de factores como el tratamiento térmico empleado, cantidad y de BMA presentes la leche cruda.

Cuadro 6

Promedio y coeficiente de variación (CV) los parámetros vida de anaquel de leche fluida UHT.

	Media ± DE	CV%
BMA (UFC/ml)	1.50 ± 0.91	55.26
DENSIDAD (g/cc)	1.20 ± 0.03	2.97
PH	6.563 ± 0.14	1.07
% ATECAL	0.182 ± 0.02	5.45
P CRIOSCOPICO (°C)	-0.529 ± 0.02	4.21
COAGULACION	2.506 ± 1.84	34.81

Nota: Bacterias Mesofilas Aerobias (BMA), Acidez Titulable Expresada Como Acidez Lactico (ATECAL).

Conclusiones

El parámetro de calidad de leche cruda que más afectó la vida de anaquel de leche UHT hasta alcanzar un valor de coagulación de 2, fue el recuento de células somáticas, debido al aumento de la gelatinización durante el almacenamiento.

La leche UHT presentó cambios fisicoquímicos durante los 50 días de almacenamiento, siendo la coagulación y acidez (pH y ATECAL) las variables que más se correlacionan con el tiempo del producto.

Recomendaciones

Evaluar la formación y composición del proceso de gelificación a diversas temperaturas de almacenamiento.

Analizar el contenido de proteína de la leche fluida UHT durante la vida de anaquel.

Emplear leche cruda con bajos conteos de células somáticas en la empresa Lácteos Santillán para la elaboración de leche UHT.

Referencias

- Anema SG. 2019. Age Gelation, Sedimentation, and Creaming in UHT Milk: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 18(1):140–166. eng. doi:10.1111/1541-4337.12407.
- [AOAC] Association of official analytical collaboration. 2000a. Bacterial and coliform counts in milk (986.36). En: Association of official analytical collaboration, editor. *Official Methods of Analysis.* Maryland, Estados Unidos: AOAC.
- [AOAC] Association of official analytical collaboration. 2000b. Fat content of raw and pasteurized whole milk (AOAC 2000.18). En: Association of official analytical collaboration, editor. *Official Methods of Analysis.* Maryland, Estados Unidos: AOAC.
- [AOAC] Association of official analytical collaboration. 2000c. Fatty Acids (Water-Insoluble) (947.07). En: Association of official analytical collaboration, editor. *Official Methods of Analysis.* Maryland, Estados Unidos: AOAC.
- [AOAC] Association of official analytical collaboration. 2000d. Method for water added in milk (961.07). En: Association of official analytical collaboration, editor. *Official Methods of Analysis.* Maryland, Estados Unidos: AOAC.
- [AOAC] Association of official analytical collaboration. 2000e. Total solid determination in milk and milk products (925.23). En: Association of official analytical collaboration, editor. *Official Methods of Analysis.* Maryland, Estados Unidos: AOAC.
- Chramostová J, Hanuš O, Klimešová M, Němečková I, Roubal P, Kopecký J, Jedelská R, Nejeschlebová L. 2017. Proteolysis in raw milk in relation to microbiological indicators. *Czech Journal of Food Sciences.* 34(4):306–312. doi:10.17221/64/2016-CJFS.
- Datta N, Deeth HC. 2001. Age Gelation of UHT Milk—A Review. *Food and Bioproducts Processing.* 79(4):197–210. doi:10.1205/096030801753252261.

- Delides A, Spooner RJ, Goldberg DM, Neal FE. 1976. An optimized semi-automatic rate method for serum glutathione reductase activity and its application to patients with malignant disease. *J Clin Pathol.* 29(1):73–77. eng. doi:10.1136/jcp.29.1.73.
- Deutsh B, Jackson D. 1970. Cream rise in UHT milk during storage. XVIII International Dairy Congress, Sydney. (1):190.
- Doyle MP, Buchanan RL, editores. 2013. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 4^a ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press. ISBN: 978-1-55581-626-1.
- Gaucher I, Mollé D, Gagnaire V, Gaucheron F. 1980. Effect of storage temperature on physic-chemical characteristics of semi-skimmed UHT milk. *Food Hydrocolloids.* 22(1):130–143. doi:10.1016/j.foodhyd.2007.04.007.
- Guillaume-Gentil O, Scheldeman P, Marugg J, Herman L, Joosten H, Hendrickx M. 2002. Genetic Heterogeneity in *Bacillus sporothermodurans* as Demonstrated by Ribotyping and Repetitive Extragenic Palindromic-PCR Fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiololy.* 68(9):4216–4224. doi:10.1128/AEM.68.9.4216-4224.2002.
- Heegaard CV, Rasmussen IK, Andreasen PA. 1994. The plasminogen activation system in bovine milk. Differential localization of tissue-type plasminogen activator and urokinase in milk fractions is caused by binding casein and urokinase receptor. *Biochim Biophys Acta.* 1222(1):45–55. doi:10.1016/0167-4889(94)90023-x.
- Hernández-Reyes JM, Bedolla-Cedeño JLC. 2008. Importancia del conteo de células somáticas en la calidad de la leche. *Revista Electrónica de Veterinaria.* 9(9):1–34. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63617329004.pdf>.
- IRAM 14006. 2000. Standar no.14006: IRAM.
- Ismail B, Nielsen S. 2010. Invited review: Plasmin protease in milk: current knowledge and relevance to dairy industry. *Journal of Dairy Science.* 93(11):4999–5009. eng. doi:10.3168/jds.2010-3122.

- Karlsson M, Langton M, Inning, Malmgren B, Höjer A, Wikström M, Lundh A. 2019. Changes in stability and shelf-life of ultra-high temperature treated milk during long term storage at different temperatures. *Heliyon*. 5(9):1-9. eng. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02431.
- Kračmarová M, Stiborova H, Horáčková S, Demnerova K. 2018. Rapid detection of microbial contamination in UHT milk: practical application in dairy industry. *Czech Journal of Food Sciences*. 36(5):357–364. doi:10.17221/24/2018-CJFS.
- Manji B, Kakuda Y, Arnott, D, R. 1986. Effect of storage temperature on age gelation of ultra-high temperature milk processed by direct and indirect heating systems. *Journal Dairy Science*. 69(12):2294–3001. doi:10.3168/jds.S0022-0302(86)80761-5.
- Murphy S, Martin N, Barbano D, Wiedmann M. 2016. Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? *Journal of Dairy Science*. 99(12):10128–10149. eng. doi:10.3168/jds.2016-11172.
- Negri LM. 2005. Manual de referencias técnicas para el logro de leche de calidad. 2ª ed. [sin lugar]: INTA.
- Nieuwenhuijse JA. 1995. Changes in heat-treated milk products during storage. En: Fox PF, editor. *Heat-induced changes in milk*. 2ª ed. Bélgica: International Dairy Federation.
- Politis I, HG, Kwai, Hang, KF, and Giroux RN. 1989. Environmental factors affecting plasmin activity in milk. *Journal Dairy Science*. 72(7):1713–1718. doi:10.3168/jds.S0022-0302(89)79286-9.
- Raynes J, Vincent D, Zawadzki J, Savin K, Mertens D, Logan A, Williams R. 2018. Investigation of Age Gelation in UHT Milk. *Beverages*. 4(4):95. doi:10.3390/beverages4040095.
- Recio I, Frutos M, Olano A, Ramos M. 1996. Protein Changes in Stored Ultra-High-Temperature-Treated Milks Studied by Capillary Electrophoresis and High-Performance Liquid Chromatography †. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(12):3955–3959. doi:10.1021/jf960080j.

- Shojaei ZA, Yadollahi A. 2008. Physicochemical and Microbiological Quality of Raw, Pasteurized and UHT Milks in Shops. *Asian Journal of Scientific Research*. 1(5):532–538. doi:10.3923/ajsr.2008.532.538.
- Wehr M, Frank J. 2004. *Standard methods for the examination of dairy products*. 17th ed. Washington, D.C.: American Public Health Association. xiv, 570 p. ISBN: 978-0-87553-002-4.
- Yacoub S, Shamsia S, Awad S, Ziena H, Safwat N. 2017. Characterization of aerobic spore-forming bacteria isolated from raw milk, skim milk powder and UHT milk. *Alexandria Science Exchange Journal*; [consultado el 26 de sep. de 2020]. 38(1):99–100. https://asejaiqjsae.journals.ekb.eg/article_2348_28ff8536b0a0b89ec1535c334c0f43ab.pdf.
- Zadow JG, Chituta F. 1975. Age gelatination of ultra-high-temperatura milk. *The Australian Journal of Dairy Technology*. 40 (1): 14-21.
- Ziyaina M, Govindan BN, Rasco B, Coffey T, Sablani SS. 2018. Monitoring Shelf Life of Pasteurized Whole Milk Under Refrigerated Storage Conditions: Predictive Models for Quality Loss. *J Food Sci*. 83(2):409–418. eng. doi:10.1111/1750-3841.13981.