

Vida de anaquel de la leche fluida en función del conteo microbiano inicial

María Cecilia Peña Paz

Honduras
Diciembre, 2006

Vida de anaquel de la leche fluida en función del conteo microbiano inicial

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera en Agroindustria en el Grado
Académico de Licenciatura.

Presentado por:

María Cecilia Peña Paz

Honduras
Diciembre, 2006

La autora concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

María Cecilia Peña Paz

Honduras
Diciembre, 2006

Vida de anaquel de la leche fluida en función del conteo microbiano inicial

Presentado por:

María Cecilia Peña Paz

Aprobada:

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Asesor Principal

Raúl Espinal, Ph.D.
Director
Carrera de Agroindustria

Wilfredo Domínguez, M.Sc.
Asesor

George Pilz, Ph.D.
Decano Académico

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

A Dios y la Virgen por cuidarme y darme fuerzas en todo momento.

A mis padres Jorge Antonio y Jenny Elizabeth por darme su apoyo, confianza y amor en todo momento

A mis hermanas Cristina, Claudia y Jenny por su confianza y apoyo.

A mis amigos y amigas por su preocupación y cariño.

A toda mi familia por su cariño, comprensión y apoyo a la distancia.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y la Virgen por cuidarme siempre.

A mi padre por toda la confianza depositada en mí, por su apoyo y amor incondicional en todo momento.

A mi madre por su amor, dedicación, preocupación y apoyo en todo momento.

A mis hermanas por su apoyo y confianza incondicional.

A mis abuelitos por su preocupación y cariño.

A todos mis tíos y tías por sus buenos deseos.

A Lesbia Martínez por su amistad, compañía y apoyo durante estos 4 años en Zamorano.

A Carlos Santamaría, por su cariño incondicional, confianza y todo el apoyo brindado.

Al Dr. Luis Osorio por sus consejos, amistad y por su ayuda incondicional.

Al Ing. Domínguez por la ayuda brindada.

Al Dr. Raúl Espinal, por su amistad y apoyo.

A la familia Reconco Martínez, por su aprecio y cariño brindado durante mi estadía en Honduras.

A todos mis amigos y amigas que siempre estuvieron pendientes y que me ayudaron siempre.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

A mis padres Jorge Antonio y Jenny Elizabeth por todos sus esfuerzos para brindarme una educación de calidad.

Al Fondo de Solidaridad del Gobierno Ecuatoriano por financiar parte de mis estudios en Zamorano.

RESUMEN

Peña, M. 2006. Vida de anaquel de la leche fluida en función del conteo microbiano inicial. Proyecto del Programa de Ingeniero Agroindustrial, El Zamorano, Honduras. 43 p.

La importancia de conocer la vida de anaquel de la leche radica en la necesidad de vender productos de calidad e inocuos con las mejores características sensoriales al consumidor. La vida de anaquel de la leche se ve afectada por factores como la cantidad de bacterias Gram + y Gram – presentes en el producto una vez pasteurizado y por la forma, temperatura de distribución y almacenamiento. El objetivo de este estudio fue elaborar una ecuación de regresión, utilizando la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias inicial del producto una vez tratado térmicamente, para generar como resultado la cantidad de días de duración de la leche. Para la obtención de datos y determinar el fin de la vida de anaquel de la leche se realizó un análisis sensorial de aceptación. El resultado del análisis evidenció que los consumidores detectan cambios sensoriales en la leche cuando esta alcanza una acidez de 0.20 %ATECAL. La ecuación encontrada con la regresión fue $Y = 27.71868 - 3.19306x$ ($R^2 = 0.9001$). El modelo posee una correlación alta negativa (-0.95399). La validación de la efectividad de la ecuación, se realizó con 12 muestras de leche fluida con diferente cantidad de aerobios totales al momento de ser almacenadas. Mediante una prueba T se analizaron los valores pronosticados por la ecuación y los valores observados de duración de la leche. El análisis indicó que no existe diferencia significativa entre los datos pronosticados y los datos reales ($P > 0.05$). La ecuación desarrollada predice los días de duración de la leche fluida en función de la carga bacteriana inicial, sin mostrar diferencias significativas con respecto a los valores reales de duración del producto.

Palabras clave: regresión, correlación, acidez en la leche.

CONTENIDO

Portadilla.....	ii
Autoría.....	iii
Hoja de firmas.....	iv
Dedicatoria.....	v
Agradecimientos.....	vi
Agradecimientos a patrocinadores.....	vii
Resumen.....	viii
Contenido.....	ix
Índice de cuadros.....	xi
Índice de figuras.....	xii
Índice de anexos.....	xiii
1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	1
1.1. VIDA DE ANAQUEL.....	1
1.2. FACTORES QUE DETERMINAN EL FIN DE LA VIDA DE ANAQUEL DE LA LECHE.....	1
1.3. CARGA MICROBIANA EN LECHE PASTEURIZADA.....	1
1.4. DESARROLLO DE ACIDEZ.....	2
1.5. OTRAS INVESTIGACIONES RELACIONADAS.....	3
1.5.1 Métodos de detección rápida de microorganismos.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
3.1. UBICACIÓN.....	7
3.2. MATERIALES Y EQUIPOS.....	7
3.3.1 Materiales.....	7
3.3.2 Equipos.....	7
3.3. METODOLOGÍA.....	8
3.3.1 Pruebas preliminares.....	8
3.3.2 Diseño Experimental.....	8
3.3.3 Obtención de datos.....	9
3.3.4 Diagrama de flujo del análisis.....	10
3.3.5 Siembras microbiológicas.....	11
3.3.6 Procedimiento para la siembra de platos.....	11
3.3.7 Pruebas de acidez (%ATECAL).....	12
3.3.8 Análisis Estadístico.....	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
4.1. DILUCIÓN DE SIEMBRAS MICROBIOLÓGICAS.....	13
4.2. ACIDEZ DETECTADA POR EL CONSUMIDOR.....	13
4.3. MEDICIONES DURANTE EL ESTUDIO.....	13
4.4. DESARROLLO DE LA ECUACIÓN.....	15

4.5.	LIMITES DE CONFIANZA.....	17
4.6.	VERIFICACIÓN.....	18
5.	CONCLUSIONES	20
6.	RECOMENDACIONES	21
7.	BIBLIOGRAFÍA	22
8.	ANEXOS	24

ÍNDICE DE CUADROS**Cuadro**

1.	Diseño experimental.....	9
2.	Análisis de aceptación de leche fluida a diferentes niveles de ATECAL...	13
3.	Datos obtenidos del estudio.....	16
4.	Datos obtenidos del análisis de verificación.....	19

ÍNDICE DE FIGURAS**Figura**

1.	Flujo de proceso del estudio de la vida de anaquel de la leche fluida en función de la carga microbiana inicial.....	10
2.	Flujograma para las siembras microbiológicas	11
3.	Relación Acidez Vida de Anaquel. Bloque 1.....	14
4.	Relación Acidez Vida de Anaquel. Bloque 2.....	14
5.	Relación Acidez Vida de Anaquel. Bloque 3.....	15
6.	Vida de anaquel de leche fluida en función de la carga microbiana inicial...	17
7.	Límites de confianza para los valores pronosticados.....	18
8.	Límites de confianza para los valores observados.....	18

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo

1. Resultados SAS [®] Separación de medias SNK para análisis sensorial de aceptación.....	25
2. Resultados SAS [®] Análisis de Correlación.....	27
3. Resultados SAS [®] Prueba T.....	30

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. VIDA DE ANAQUEL

Según el departamento de Ciencia de Alimentos de la Universidad de Cornell (2006), vida de anaquel se define como la longitud de tiempo en el que un alimento puede ser mantenido bajo condiciones prácticas o recomendadas de almacenamiento y aun así puede mantener su frescura o calidad aceptable.

1.2. FACTORES QUE DETERMINAN EL FIN DE LA VIDA DE ANAQUEL DE LA LECHE

Según Jennes y Patton (1959), la leche desarrolla sabores extraños que determinan su calidad y por lo tanto su vida de anaquel. El deterioro químico de la leche se evidencia en el sabor oxidado, detectado usualmente como sabores acartonados, metálicos y aceitosos. El desarrollo de este sabor extraño se debe a la oxidación de los ácidos grasos insaturados como el linoleico y el araquidónico. Los factores que contribuyen al desarrollo de la oxidación son el oxígeno atmosférico, trazas metálicas, ácido ascórbico y la luz. Además el desarrollo de la acidez medida como la cantidad de ácido láctico presente en la muestra es percibida por el consumidor al alcanzar un %ATECAL de 0.20. La acidez es producto del trabajo de las bacterias ácido lácticas presentes en la leche, las mismas que producen sabores afrutados, rancios y ácidos.

1.3. CARGA MICROBIANA EN LECHE PASTEURIZADA

Según Valbuena y colaboradores, 2004, la carga microbiana inicial de leche pasteurizada consiste principalmente en bacterias termodúricas y esporas. El tipo de bacterias termodúricas depende de la población microbiana de la leche cruda antes de la pasteurización. Algunas bacterias termodúricas Gram positivas presentes en la leche son *Bacillus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Arthrobacter spp.* Un gran número de estas bacterias puede contribuir a conteos altos en los métodos de siembra PCA. La mayoría de las bacterias termodúricas crecen lentamente en leche en refrigeración y son generalmente opacadas por el crecimiento de especies de bacterias psicrótrofas Gram negativas. Éstas son consideradas como fuente principal de contaminación post pasteurización.

Las bacterias psicrótrofas Gram negativas predominantes en leche pasteurizada son *Pseudomonas*, *Flavobacterium* y *Alcaligenes*, así también como miembros del grupo de los coliformes. El deterioro en la leche causado por bacterias psicrótrofas resulta en sabores afrutados, rancidez, acidez y sabores extraños. Generalmente poblaciones arriba de 10^6 UFC por ml se requieren para que defectos en el sabor sean detectados de forma sensorial. La tasa de crecimiento microbiano y deterioro de la calidad del producto es influenciado por el número y tipo de bacterias en la leche fresca pasteurizada y la temperatura de almacenamiento.

1.4. DESARROLLO DE ACIDEZ

Según Utrera y colaboradores, 2005, la acidez y un sin número de sabores extraños que deterioran la leche pasteurizada son producto de la actividad de las bacterias. Péptidos amargos son el resultado de la actividad de las proteasas las que son generadas por microorganismos del género *Pseudomonas*.

Según Wikipedia, 2006, algunas bacterias como los *Lactobacillus*, fermentan la lactosa con facilidad dando origen principalmente al ácido láctico; el cual provoca la coagulación de la leche. Si se deja la leche en contacto con el aire y la temperatura adecuada, se “corta”, lo que se debe al desarrollo de las bacterias lácticas. Estas bacterias transforman la lactosa en 2 carbohidratos, la glucosa y galactosa y ácido láctico como residuo. En este proceso se produce energía que es utilizada por las bacterias para realizar sus funciones vitales y el ácido láctico residual que es eliminado al medio. La coagulación de la leche resulta de la precipitación de las proteínas de la leche y ocurre por el descenso de pH debido a la presencia de ácido láctico.

Según Martín, 2004, los valores normales de acidez de la leche están comprendidos entre 16 y 19 grados Dornic. Las adulteraciones hacen variar estos valores, así, el aguado y la neutralización la rebajan. Sin embargo, el desnatado y la adición de suero no la hacen variar. Una acidez inferior a 10 °D es sospechosa de aguado, neutralización o de proceder de vacas mamíticas. Una acidez superior a 19 °D es imputable a leches de más de 10 horas (ordeño de la noche) y una acidez superior a 23 °D indican claramente que la leche no resiste la pasteurización.

El estado de conservación de la leche se determina por medio de su acidez. La leche tiene un pH normalmente entre un rango de 6.3 a 6.5, y la de consumo entre 6.4 y 6.7. Esta determinación tiene especial interés para el reconocimiento de la leche de animales enfermos, observándose en la mastitis infecciosa, (inflamación de las glándulas mamarias que pueden ser causadas por microbios) por ejemplo un cambio de pH entre 7.3 ya 7.5. Mientras que una leche ácida presenta un pH de 6.0 la leche humana presenta un pH ligeramente superior al de la vaca (pH= 6.8 – 6.9)

La importancia de la carga microbiana en la leche pasteurizada, radica en que una leche con baja carga bacteriana tendrá un menor desarrollo de acidez, por lo tanto un pH mayor. Si por el contrario, existe una alta carga bacteriana, habrá mayor producción de ácido láctico que disminuye el pH y aumenta la acidez.

1.5. OTRAS INVESTIGACIONES RELACIONADAS

White, C. (1993), menciona que los métodos para detectar la vida de anaquel basan su predicción en el conteo de sicrotrofos gram negativos. Además que es necesario que los métodos sean rápidos. Los métodos de predicción deberían brindar resultados antes de 72 horas, idealmente dentro de las primeras 24. La vida de anaquel debe ser definida en una temperatura de almacenamiento específica, 7 °C, temperatura usual en la mayoría de los refrigeradores en los supermercados. Además menciona que los actuales métodos para detectar la vida útil de los productos, en realidad miden una vida de anaquel potencial, ya que las muestras almacenadas en refrigeradoras en los laboratorios no son sometidas al stress provocado por la distribución y el transporte.

En este artículo se comparó el coeficiente de correlación de la predicción del método con respecto a la vida de anaquel actual del producto. Los métodos comparados son: Medición de Metabolitos y Métodos de Filtración, Microbiología de Impedancia, La limulus amoebocyte lysate (LAL), La técnica epifluorescente de filtración directa (DEFI), Detección de la Catalasa, El colorímetro de reflectancia de Wescor Inc, Evaluación Sensorial, Métodos de Galjanoplastia, La prueba aseguradora de la calidad de Moseley, El Petrifilm[®] conteo de bacterias sicrotróficas modificado (PmPBC).

La mayoría de estos métodos utilizan el método de Incubación Preliminar como complemento para detectar la cantidad de bacterias presente en la leche. Este método consiste en provocar stress en la leche, incubándola a 12.8 °C por 18 horas. Se debe incubar la leche después de que las muestras para el método estándar de conteo hayan sido tomadas. La Incubación Preliminar basa su teoría en que la flora microbiana natural de la vaca, no crecerá substancialmente cuando se le proveen estas condiciones de tiempo y temperatura. Sin embargo los microorganismos asociados a las malas prácticas de manufactura pueden desarrollarse rápidamente cuando se encuentran bajo esas condiciones de tiempo y temperatura. Los factores que pueden influenciar los resultados de esta prueba incluyen la precisión de la temperatura de incubación, la época, la edad y la historia del almacenaje de la muestra de la leche, así como los tipos, los números iniciales, las etapas del crecimiento y las temperaturas del crecimiento de la microflora presente en la leche. Debido a estos factores y el hecho de que esta prueba confía en la detección de los microorganismos capaces de crecimiento bajo ciertas condiciones, los resultados de la prueba pueden variar. Por esta razón deben ser interpretados y ser utilizados con precaución. Es importante que los resultados de esta prueba sean comparados con el conteo de las bacterias del método estándar utilizado para la leche sin encubar.

3.3.1 Métodos de detección rápida de microorganismos

Medición de Metabolitos y Métodos de Filtración, estos métodos usan la tecnología de bioluminiscencia para detectar y enumerar bacterias según su contenido de ATP. Después del conteo se necesita utilizar Incubación Preliminar, totalizando el tiempo de análisis en 20 horas, con una correlación >0.8.

Microbiología de Impedancia (tiempo de detección de impedancia), este método también requiere el uso de Incubación Preliminar y presenta una correlación por lo general mas alta que el resto de métodos, 0.86 a 0.94. La tecnología para este análisis en los Estados Unidos es proveída por BactometerTM.

El limulus amoebocyte lysate (LAL), envuelve la detección de endotoxinas que son producidas específicamente por bacterias gram negativas. La correlación es >0.85 . La ventaja de este método es el no uso de Incubación Preliminar después de la detección de las endotoxinas.

La técnica epifluorescente de filtración directa (DEFI) fue desarrollada en Inglaterra como método para el conteo rápido de bacterias en leche cruda. Este método ha sido adaptado para el conteo de bacterias en leche pasteurizada. Consiste en hacer pasar la leche por filtros para luego manchar las células atrapadas con el naranja de la acridina para luego observar con un microscopio fluorescente. La correlación ha sido entre 0.7 y 0.8.

Detección de Catalasa, para lograr resultados se pueden utilizar dos métodos de detección, a través del uso de presión en los espacios libres y a través del medidor de flotación de la catalasa. El tiempo requerido en este método, es el utilizado por el Incubación Preliminar y un análisis de menos de una hora, posterior a la IP. La correlación obtenida es de 0.7 y 0.8.

Evaluación Sensorial, es la única forma de medir la vida útil actual o potencial de un producto. Se realiza probando la leche hasta detectar la producción de un mal sabor. Una de las formas de realizar la evaluación es la de almacenar la leche a 7 °C y realizar pruebas diarias a partir de los 10 días de vida del producto. La toma de la muestra debe ser aséptica y del mismo envase. Es la mejor forma de determinar con exactitud la vida de anaquel, ya que al no usar muestras de diferentes envases, se evita la variabilidad debido al uso de diferentes envases, diferentes envasadoras. Por lo tanto no se puede asegurar que las muestras sean idénticas.

El colorímetro de reflectancia de Wescor Inc. se encuentra disponible para la industria en los Estados Unidos. Básicamente envuelve el monitoreo de la bioactividad debido a los cambios en color asociados con la producción de metabolitos por parte de las bacterias. La correlación es >0.85 .

Métodos de Galjanoplastia, consisten en incubar muestras de leche a 21 °C por 18 horas, para lo cual una dilución de 1:1000 debe ser realizada. Las muestras son sembradas en Plate Count Agar al cual se le ha agregado 2,3,5-triphenyl tetrazo-Lium chloride o sembrado en Petrifilm[®] (3M Corporation, St. Paul, MN). Seguido los platos son incubados por 48 horas adicionales para luego contar las colonias rojas. El número de colonias es correlacionado como sigue: ≤ 1000 UFC/ml, ≥ 14 días; ≥ 1000 UFC/ml a $\leq 200\ 000$ UFC/ml, 10 a 14 días; $\geq 200\ 000$ UFC/ml, ≤ 10 días. La ventaja de este método es su obvia simplicidad.

La prueba aseguradora de la calidad de Moseley, consiste en incubar las muestras de leche por 5 ó 7 días a 7 °C, seguido de una siembra habitual e incubación a 30 - 32 °C por 48

horas. La correlación es de 0.7 a 0.77. La ventaja de este método es la familiaridad que las plantas de lácteos tienen con él. La desventaja es el tiempo aproximado de 7 - 9 días necesarios para obtener los resultados. Para este método existe la siguiente interpretación: $\leq 2\ 000$ UFC/ml días esperados de vida útil ≥ 21 ; 2000 a 10 000 UFC/ml 14 días; 10 000 a 50 000 ≤ 9 días; $\geq 50\ 000$ UFC/ml ≤ 7 días.

El Petrifilm[®] conteo de bacterias psicotróficas modificado (PmPBC) requiere de aproximadamente 48 horas. La muestra es sometida a Incubación Preliminar a 21 °C por 18 horas, seguido de un conteo modificado de bacterias psicotróficas. Incluye la incubación del plato a 21 °C por 25 horas. Se han conseguido correlaciones de 0.75 y 0.8.

La incubación preliminar de productos lácteos, seguido de métodos rápidos de detección, aparentan ser la vía más factible para una planta de lácteos a la hora de predecir. Todos estos métodos predicen la vida de anaquel de la leche comparando el conteo microbiano de las muestras con los conteos ya establecidos para determinar la vida de anaquel de la leche pasteurizada.

2. INTRODUCCIÓN

Según el International Dairy Foods Institute, 2006, la leche es la secreción láctea, prácticamente libre de calostro, obtenida del ordeño completo de una o más vacas saludables. No debe contener menos de 8.25% de sólidos no grasos y no menos de 3.25% de grasa.

La leche es uno de los alimentos con mayores propiedades nutricionales que existen en el mercado. Proporciona proteínas de la mejor calidad, es rica en calcio, posee vitaminas del grupo B, así como vitaminas A, D y E. Gracias a ello favorece el desarrollo de la estructura ósea, de igual manera favorece parcialmente al crecimiento, ayudando así a cumplir con los requerimientos nutricionales. La leche, a través de sus nutrientes se convierte en una importante fuente de energía (Codex Alimentarius, 2002).

La pasteurización es el proceso térmico aplicado a la leche para eliminar las bacterias patógenas. Sin embargo existen ciertos microorganismos descomponedores no patógenos como las bacterias termodúricas que soportan altas temperaturas y que sobreviven a este tratamiento térmico resultando en la aceleración del proceso de descomposición de la misma.

En la actualidad Zamorano ofrece al público, leche fluida pasteurizada y homogenizada, estandarizada al 2% de grasa, 100% fresca y natural. La misma tiene marcada una vida de anaquel de hasta 10 días, almacenada a 4 °C.

Es importante conocer la vida de anaquel que el producto tendrá una vez fuera del lugar de producción ya que esto nos ayuda a controlar la calidad final con la que leche llega a manos del consumidor.

El objetivo principal de este trabajo de investigación fue elaborar una ecuación para predecir la vida de anaquel de la leche fluida en función del conteo microbiano inicial. Como objetivos específicos se determinó la acidez mínima detectada por los consumidores y se validó la ecuación de regresión.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN

La elaboración de la leche fluida al 2% de grasa se realizará en la Planta de Procesamiento de Productos Lácteos de Zamorano. Los análisis Químicos se realizarán en el laboratorio de la Planta de Lácteos ubicada en el Departamento de Francisco Morazán, Km. 32 al este de Tegucigalpa, Honduras.

3.2. MATERIALES Y EQUIPOS

3.3.1 Materiales

- Leche cruda estandarizada al 2% de grasa
- Medio para mesófilos, aerobios totales, PCA
- Agua peptonada
- Fenolftaleína
- NaOH 0.1 N
- Leche pasteurizada al 2% de grasa
- Vasitos para análisis sensorial

3.3.2 Equipos

- Marmita, capacidad 50 litros
- Termómetro
- Envases plásticos, capacidad 1 litro
- Tapaderas para envases plásticos
- Refrigeradora, temperatura 7 ± 1 °C
- Pipetas 10 ml
- Platos petri plásticos con un diámetro exterior de 100 mm y un diámetro interno de 91 mm profundidad de 15 mm
- Incubadora 37 ± 1 °C
- Contador de colonias
- Recipientes plásticos para medir acidez
- Autoclave

3.3. METODOLOGÍA

Para la obtención de datos de vida de anaquel se evaluaron 14 muestras de leche con diferente carga microbiana. La acidez %ATECAL fue el factor determinante de los días de duración de cada una de las muestras.

3.3.1 Pruebas preliminares

- *Dilución de siembras microbiológicas*

Para conocer la dilución a la que las muestras de leche serían sembradas, se realizó una siembra de varias muestras tratadas con diferentes temperaturas. Las muestras fueron incubadas por 48 horas a una temperatura de 37 ± 1 °C.

- *Acidez detectada por el consumidor*

Para determinar la acidez titulable expresada como ácido láctico (%ATECAL) a la cual el consumidor rechaza la leche fluida, se realizó un análisis sensorial. Este análisis consistió en una prueba de aceptación de las muestras y 36 personas fueron evaluadas. Las muestras de leche se dejaron acidificar con el paso del tiempo hasta conseguir %ATECAL de 0.18, 0.19, 0.20 y 0.21 respectivamente. La cantidad de muestra evaluada por el consumidor fue el equivalente a 20 ml por tratamiento. Una vez obtenidos los resultados, fueron evaluados estadísticamente mediante una separación de medias tipo SNK (Student-Neumann-Kohl), con la ayuda del paquete estadístico SAS[®] *Statistical Analysis System*.

3.3.2 Diseño Experimental

- *Análisis de regresión*

Se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA). Cada semana de recolección de muestras significó un bloque. Se recolectaron 4 muestras en la primera semana de tratamiento y 5 muestras para las semanas 2 y 3.

Cuadro 1. Diseño Experimental

Bloque 1				
Temperatura de recolección de muestra (°C)				
63 65 67 69				
Semana 1	Tr 1	Tr 2	Tr 3	Tr 4

Bloque 2					
Temperatura de recolección de muestra (°C)					
63 65 67 69 71					
Semana 2	Tr 1	Tr 2	Tr 3	Tr 4	Tr 5

Bloque 3					
Temperatura de recolección de muestra (°C)					
63 65 67 69 71					
Semana 3	Tr 1	Tr 2	Tr 3	Tr 4	Tr 5

- *Verificación*

Se utilizaron 12 muestras de leche. La leche fue sometida a tratamiento térmico y cada una de las muestras fue tomada a diferentes temperatura entre 63 y 71 °C. Una vez tomada las muestras, fueron sumergidas en agua fría para evitar que la cantidad de microorganismos presentes en la leche varíe. Seguido se realizó la siembra microbiológica en Plate Count Agar para determinar la carga microbiana. Las muestras fueron almacenadas en una refrigeradora doméstica con temperatura de 7 ± 1 °C. Las pruebas de acidez fueron realizadas todos los días, empezando por el día 0 hasta alcanzar una acidez máxima de 0.20 %ATECAL que marcaba el fin de la vida de anaquel de la muestra. Se pronosticó la vida de anaquel de cada una de las muestras utilizando la ecuación de regresión. Se utilizó un diseño de auto apareo ya que de cada muestra se obtuvo el pronóstico y el número de días real de vida de anaquel. Ambos datos fueron evaluados mediante una prueba T utilizando el programa estadístico SAS[®].

3.3.3 Obtención de datos

Leche con diferente carga microbiana fue obtenida a partir de leche tratada térmicamente. La leche fue calentada hasta llegar a temperaturas cercanas a la de pasteurización, 63, 65, 67, 69 y 71 °C. Las muestras fueron almacenadas en una refrigeradora doméstica en la cual la temperatura era de 7 ± 1 °C. Pruebas de %ATECAL fueron realizadas a diario para determinar el día exacto en el que la leche pierde sus características sensoriales típicas,

indicando así un daño en su composición. Por lo tanto deja de ser agradable al consumidor, determinando así la vida de anaquel de cada una de las muestras.

3.3.4 Diagrama de flujo del análisis

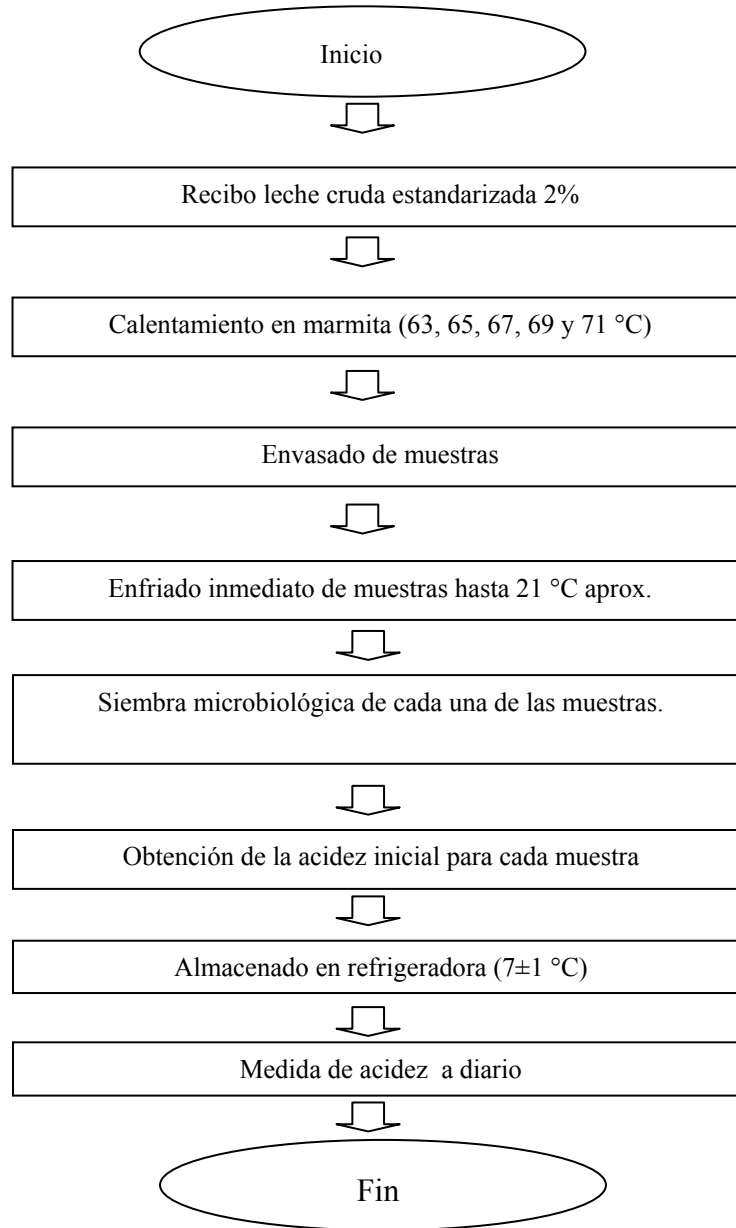


Figura 1. Flujo de proceso del estudio de la vida de anaquel de la leche fluida en función de la carga microbiana inicial.

3.3.5 Siembras microbiológicas

Las siembras microbiológicas fueron realizadas para determinar la carga microbiana (aerobios totales) inicial de la leche antes del almacenamiento. Este dato representa la variable independiente del estudio.

3.3.6 Procedimiento para la siembra de platos¹

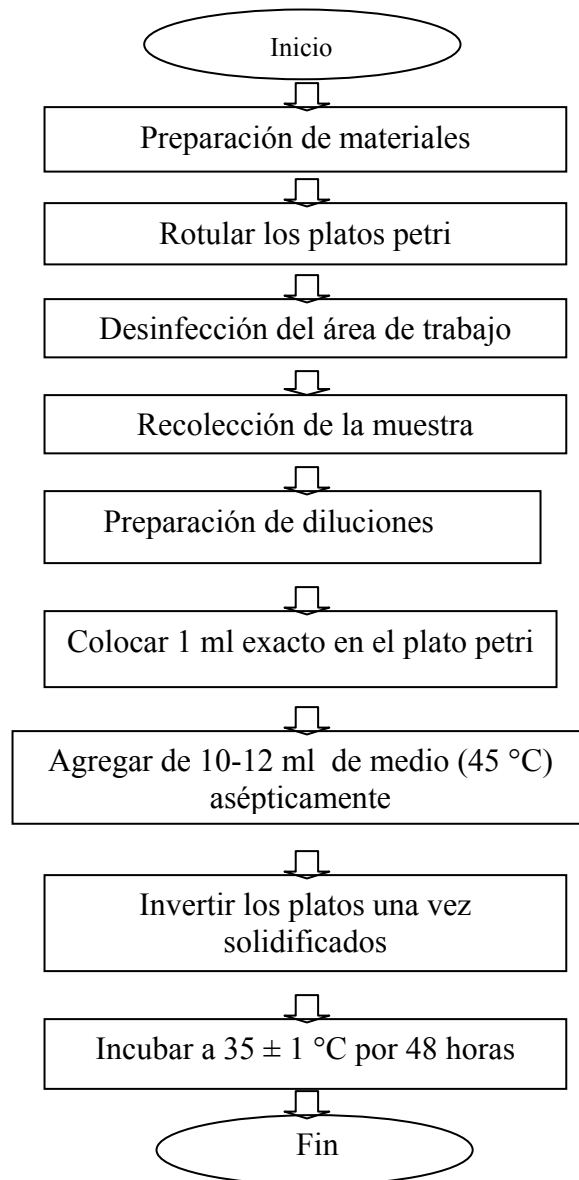


Figura 2. Flujograma para las siembras microbiológicas

¹ Morales, S. 2005. Predicción de conteos microbiológicos en la leche cruda con base en la prueba de azul de metileno.

3.3.7 Pruebas de acidez (%ATECAL)

La prueba de acidez titulable expresada como ácido láctico, mide la cantidad de ácido láctico producido por acción de las bacterias. Según el análisis sensorial desarrollado durante el experimento el mínimo de acidez detectable por el consumidor para determinar el día en que la leche llega al fin de su vida útil es de 0.20 %ATECAL. Para realizar esta prueba se tomaron 9 ml de leche de cada muestra y se les adicionó 3 gotas de fenolftaleína como indicador. Seguido se procede a la titulación con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N.

3.3.8 Análisis Estadístico

Para determinar la acidez mínima detectada por el consumidor, se realizó un análisis sensorial de aceptación. Fueron evaluados 32 consumidores y se realizó una separación de medias SNK.

Se utilizó un análisis de regresión, en el cual dos variables fueron relacionadas para predecir una en función de la otra.

Variable independiente: Carga microbiana inicial de la leche una vez tratada térmicamente.

Variable dependiente: Días de duración en anaquel.

Para el proceso de verificación se realizó una prueba T para determinar la existencia o no de diferencia significativa entre los datos pronosticados por la ecuación de regresión y los datos observados de vida de anaquel.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DILUCIÓN DE SIEMBRAS MICROBIOLÓGICAS

Según los conteos de microorganismos aerobios, se estableció que las muestras tomadas a temperaturas entre 63 y 65 °C deberían ser sembradas en una dilución de 10^{-2} . Las muestras tomadas a temperaturas entre 67 y 71 °C deberían ser sembradas en una dilución de 10^{-1} . Las diluciones escogidas presentaron entre 25 y 250 UFC/ml.

4.2. ACIDEZ DETECTADA POR EL CONSUMIDOR

Según el análisis sensorial de aceptación y el análisis estadístico de los datos a través de la separación de medias SNK, los consumidores prefieren leche fluida con acidez igual o menor a 0.19 %ATECAL. También mostraron su rechazo por leche con acidez igual o mayor a 0.20 %ATECAL. En este análisis las muestras de leche de 0.18 y 0.19 %ATECAL fueron significativamente diferente a las muestras de leche de 0.20 y 0.21 (P<0.05).

Cuadro 2. Análisis de aceptación de leche fluida a diferentes niveles de ATECAL.

% ATECAL	Media*	SNK Agrupamiento °
0.20	1.77	A
0.21	1.88	A
0.18	1.13	B
0.19	1.27	B

* Media de respuestas del análisis de aceptación. (Sí le agrada = 1, No le agrada = 2)

° Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes

4.3. MEDICIONES DURANTE EL ESTUDIO

La acidez (% ATECAL) fue monitoreada a diario (Figuras 3, 4 y 6). Este dato permitió determinar el día exacto en que la vida útil del producto llegaba a su fin, es decir cuando alcanzaba 0.20 %ATECAL.

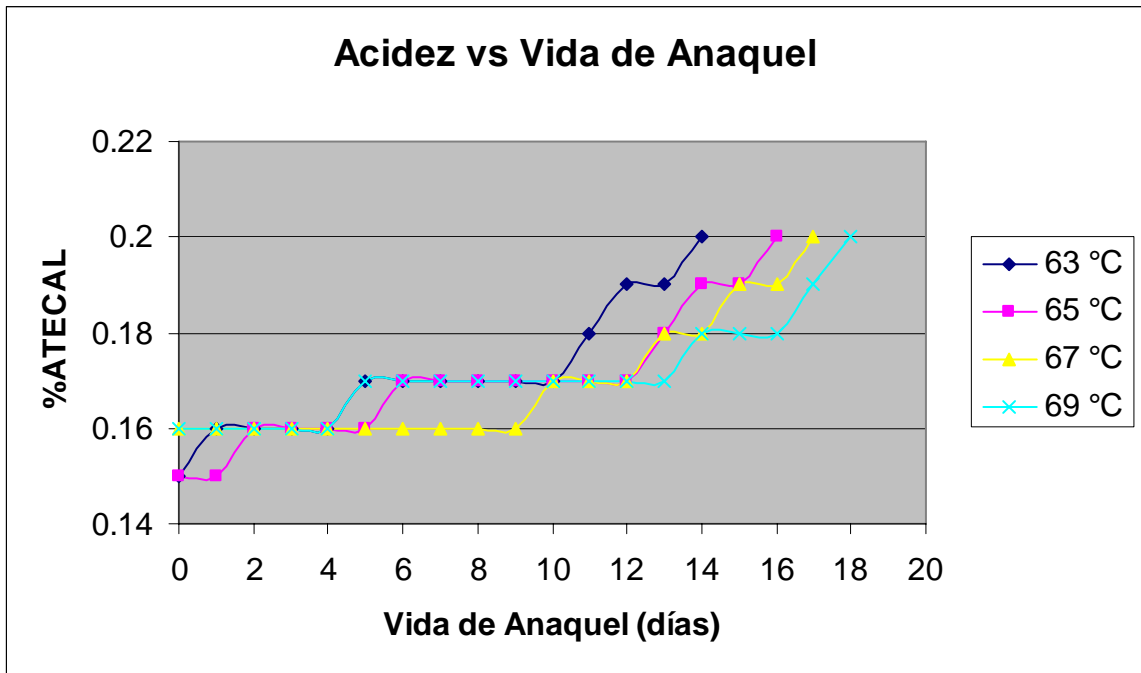


Figura 3. Relación Acidez Vida de Anaquel. Bloque 1

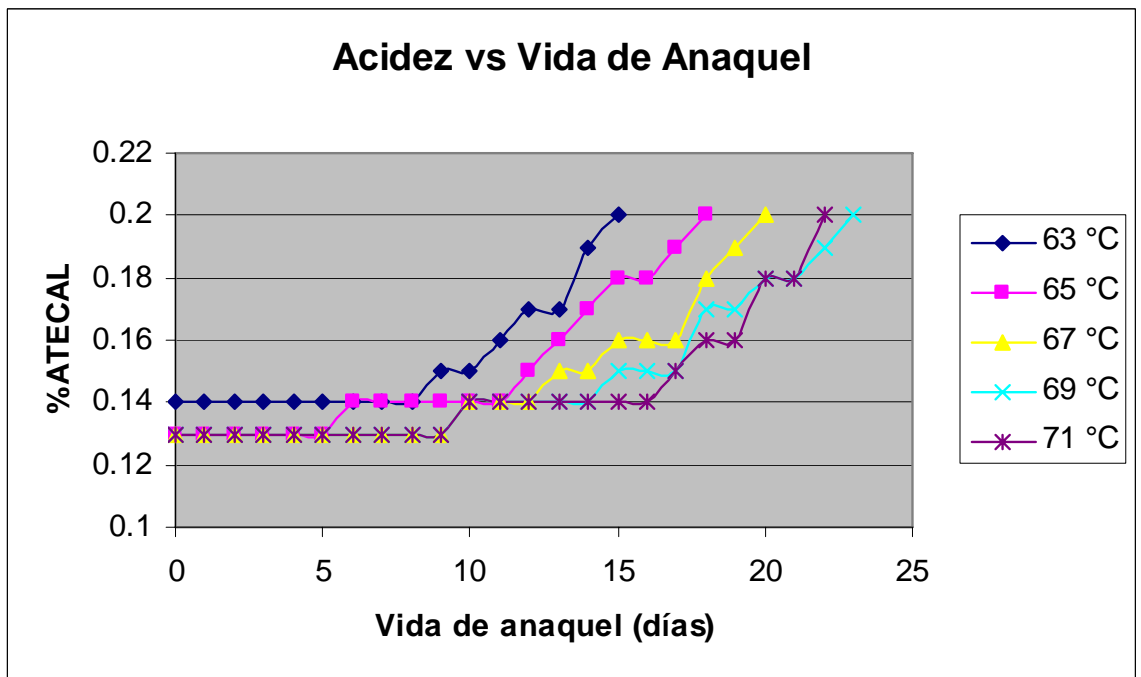


Figura 4. Relación Acidez Vida de Anaquel. Bloque 2

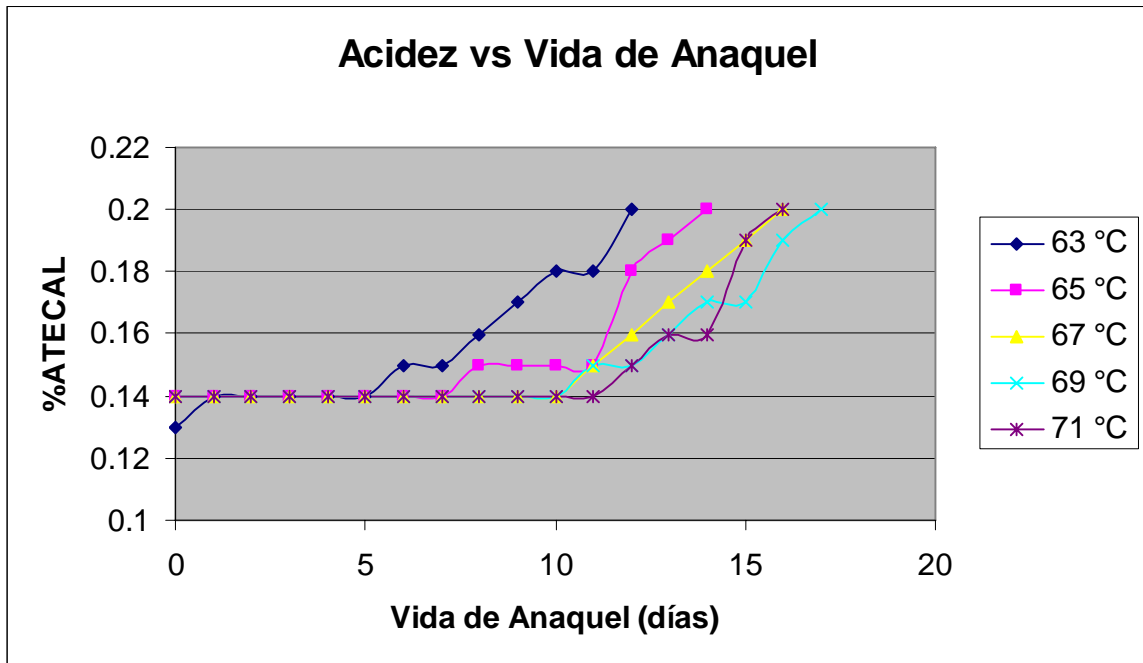


Figura 5. Relación Acidez Vida de Anaquel. Bloque 3

4.4. DESARROLLO DE LA ECUACIÓN

Para el desarrollo de la ecuación, se tomaron datos de vida de anaquel y carga microbiana de cada una de las muestras. El total de datos obtenidos para el desarrollo de la curva fue de 14. Los datos fueron analizados mediante un procedimiento de regresión con la ayuda del programa estadístico SAS[®].

En el cuadro 3 se muestra la carga microbiana con la que cada una de las muestras fue almacenada después de recibir el tratamiento térmico. Además el logaritmo del número de Unidades Formadoras de Colonias, dato que fue utilizado en el análisis de regresión. Finalmente los días de duración de la muestra. El día exacto fue determinado al sustraer 1 al día en el que la muestra alcanzaba un %ATECAL de 0.20.

Cuadro 3. Datos obtenidos del estudio

Semana	Temperatura de recolección (°C)	Conteos Microbiológicos		Vida de Anaquel (días)
		UFC/ml	Log UFC/ml	
1	63	39550	4.597	13
	65	18450	4.266	15
	67	2970	3.473	16
	69	1095	3.039	17
2	63	115800	5.064	14
	65	5100	3.708	17
	67	1140	3.057	19
	69	340	2.531	22
	71	115	2.061	21
3	63	72100	4.858	11
	65	37800	4.577	13
	67	16785	4.225	15
	68	2770	3.442	16
	71	1125	3.051	15

Utilizando los datos obtenidos, se logró relacionar la carga microbiana inicial de la muestra después del tratamiento térmico con los días de vida de anaquel.

Se observó que a mayor carga microbiana la vida de anaquel disminuye (Figura 6). Esto se debe a que la carga microbiana aumenta, por lo tanto hay mayor producción de ácido láctico. El coeficiente de correlación fue de -0.95399, indicando así una correlación alta negativa. Los valores analizados cubren los rangos usuales de UFC/ml de aerobios totales presentes en la leche pasteurizada, el mismo tiene un límite máximo de 1×10^4 UFC/ml².

² SAG, 1994. Reglamento para la inspección y certificación sanitaria de la leche y los productos lácteos.

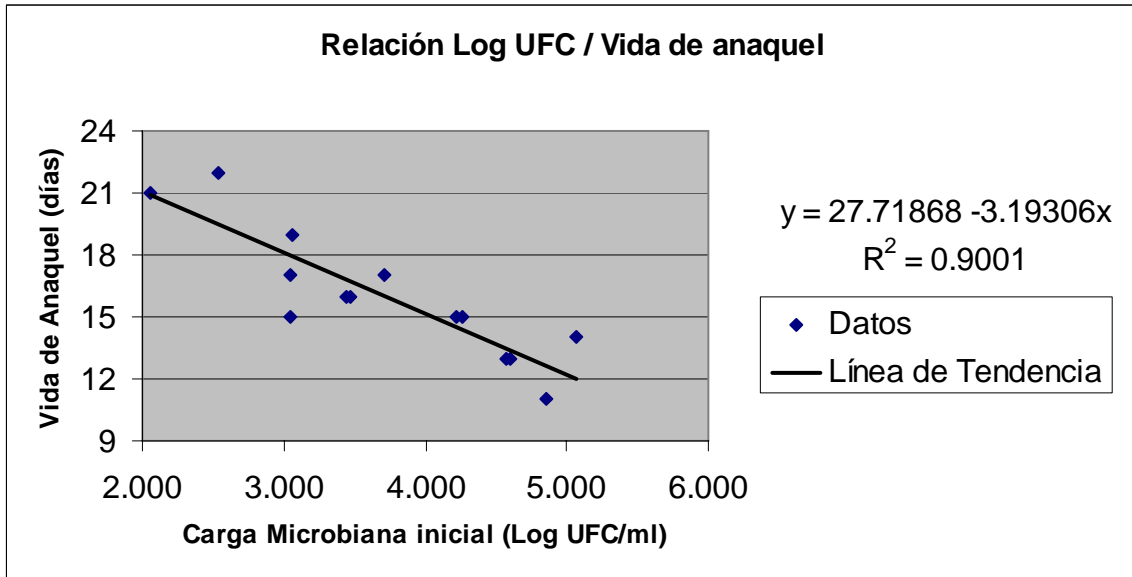


Figura 6. Vida de anaquel de leche fluida en función de la carga microbiana inicial.

La ecuación de predicción de la variable vida de anaquel, obtenida a través del análisis es:

$$Y = 27.71868 - 3.19306 X$$

La ecuación muestra el intercepto 27.71868 de la variable Y cuando la variable X es igual a 0, además el coeficiente de relación entre las variables de -3.19306. El R^2 ajustado del estudio es de 0.9001, indicando que el 90% de los datos se apegan al modelo utilizado.

4.5. LIMITES DE CONFIANZA

Se puede observar que todos los valores pronosticados para la vida de anaquel se encuentran dentro de los límites máximos y mínimos de confianza, comparados con la media de los datos (Figura 7).

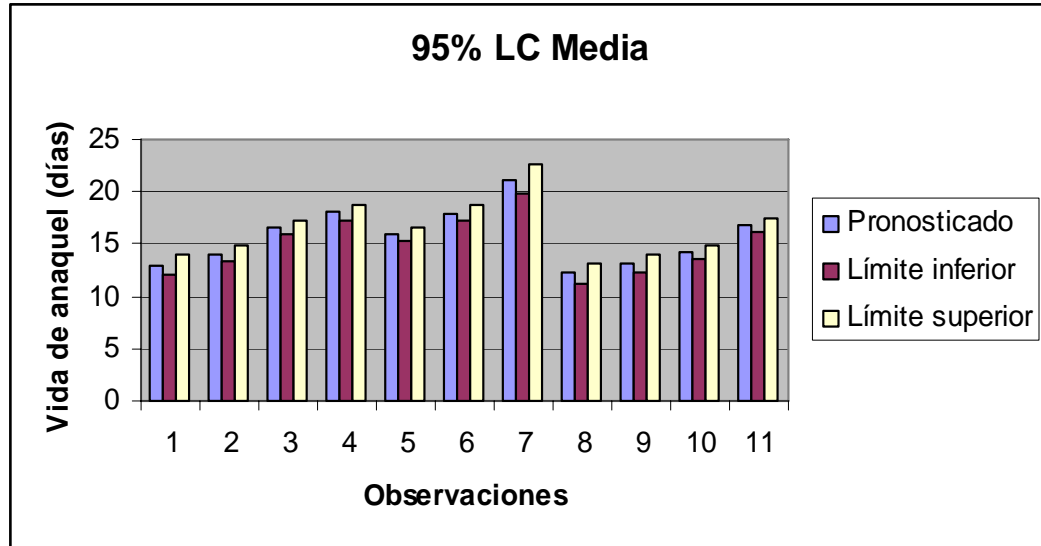


Figura 7. Límites de confianza para los valores pronosticados

En la figura 8 se puede observar que todos los datos observados para la vida de anaquel se encuentran dentro de los límites de confianza superior e inferior, establecidos por el programa estadístico con respecto a los valores pronosticados.

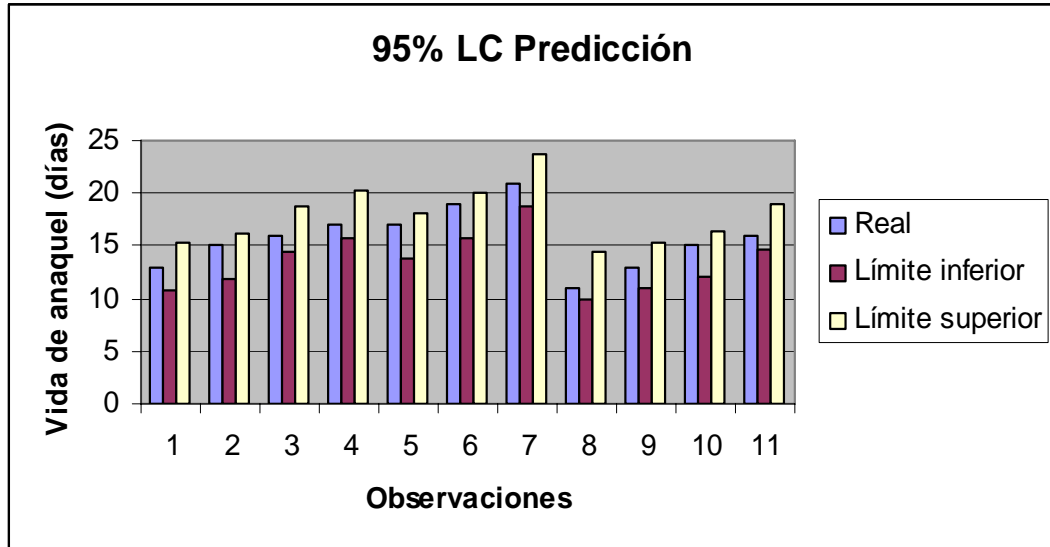


Figura 8. Límites de confianza para los valores observados

4.6. VERIFICACIÓN

Se determinó la vida de anaquel pronosticada y la vida de anaquel real de 12 muestras. Se realizó la prueba T para determinar si existe diferencia significativa entre ambos datos.

En el cuadro 4 se muestra la cantidad de UFC/ml que cada una de las muestras tenía al momento de ser almacenada en el refrigerador. Además se muestran esos resultados en su forma logarítmica. La vida de anaquel pronosticada obtenida a partir del desarrollo de la ecuación y la vida de anaquel observada de cada una de las muestras.

Se utilizó el análisis de la Prueba T, para determinar si había diferencia significativa entre los datos pronosticados y los datos observados. El resultado de la prueba evidenció que no existe diferencia significativa entre los datos al mostrar una $P > |t| 0.0807$.

Cuadro 4. Datos obtenidos del análisis de verificación

Muestra	Carga Microbiológica		Vida de anaquel Pronosticada (días)	Vida de anaquel Real (días)
	UFC/ml	Log UFC/ml		
1	62800	4.798	12.78	11
2	59200	4.772	12.85	14
3	67400	4.829	12.69	14
4	59600	4.775	12.84	15
5	18460	4.266	14.35	16
6	15600	4.193	14.57	17
7	14060	4.148	14.70	13
8	16260	4.211	14.52	11
9	17260	4.237	14.44	17
10	16360	4.214	14.51	16
11	13860	4.142	14.72	17
12	10280	4.012	15.11	17

5. CONCLUSIONES

La ecuación que predice la vida de anaquel en función de la carga microbiana inicial es: $Y = 27.71868 - 3.19306 X$

Los consumidores detectaron cambios en la leche fluida cuando ésta alcanza 0.20 %ATECAL.

Al validar la ecuación no existe diferencia significativa entre los datos observados y los valores pronosticados de la ecuación. ($P > 0.05$)

6. RECOMENDACIONES

Realizar el mismo experimento con un mayor número de repeticiones.

Evaluar otras variables que pueden afectar la vida de anaquel del producto.

Utilizar la ecuación de predicción para estimar los días de vida de anaquel de leche fluida por lotes.

7. BIBLIOGRAFÍA

Codex Alimentarius, 2002. Requisitos Generales, Higiene de los alimentos. Roma, Italia. Editorial FAO. 337 p.

Cornell University, Food Science Department, 2000. Pasteurized versus Ultra-Pasteurized Milk - Why Such Long Sell-By Dates?. Dairy Science Facts. Estados Unidos de América. 8p.

Cornell University, Food Science Department, 2006. The Preliminary Incubation Count for raw milk. Dairy Science Facts. Estados Unidos de América. 4p.

Internacional Dairy Foods Institute, 2006. Milk. (en línea). Consultado el 19 de agosto de 2006. Disponible en <http://www.picosearch.com/cgi-bin/ts.pl>

Jenness, R., Patton, S., 1959. Principles of Dairy Chemistry. John Wiley & Sons, Inc. Estados Unidos de América. 446 p.

Martín, M. 2004. Prácticas de Tecnología y Caracterización de Productos Lácteos. (en línea). Consultado el 8 de octubre de 2006. Disponible en http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/mariamc/lacteos/practica1.htm

Morales, S. 2005. Predicción de conteos microbiológicos en la leche cruda con base en la prueba de azul de metileno. Tesis Ing. Agroindustrial. Honduras, Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. 38p.

SAG, 1994. Reglamento para la inspección y certificación sanitaria de la leche y los productos lácteos. Honduras. 32p.

Utrera, R. Utrera E., Villar, M., Zambrana, M., 2005. Fermentación natural de la Lactosa. Andalucía, Es. 14 p.

Valbuena, E., Castro, G., Lima K., Acosta, W., Bríñez, W., Tovar, A. 2004. Calidad microbiológica de las principales marcas de leche pasteurizada distribuidas en la ciudad de Maracaibo, Venezuela. *RC*. (en línea). Vol.14, No.1. Consultado el 23 de septiembre de 2006, p.59-67. Disponible en: http://www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592004002000009&lng=es&nrm=iso

White, C. 1993. Rapid Methods for Estimation and Prediction of Shelf-Life of Milk and Dairy Products. *Journal of Dairy Science*. Vol 76, No 10.

Wikipedia, 2006. Fermentación láctica. (en línea). Consultado el 20 de septiembre de 2006.
Disponible en
http://es.wikipedia.org/wiki/Fermentaci%C3%B3n_l%C3%A1ctica

8. ANEXOS

Anexo 1.- Resultados SAS® Separación de medias SNK para análisis de aceptación

Procedimiento GLM					
Variable dependiente: ACEPTACION					
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	38	18.31944444	0.48209064	2.87	<.0001
Error	105	17.61805556	0.16779101		
Total correcto	143	35.93750000			
	R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	PREFERENCIA Media	
	0.509758	26.93412	0.409623	1.520833	
Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
ACIDEZ	3	14.63194444	4.87731481	29.07	<.0001
PERSONA	35	3.68750000	0.10535714	0.63	0.9413

Sistema SAS
Procedimiento GLM

Prueba de Student-Newman-Keuls para ACEPTACION

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I bajo la hipótesis null completa, pero no bajo las hipótesis null parciales.

Alfa 0.05
Error de grados de libertad 105
Error de cuadrado medio 0.167791

Número de medias	2	3	4
Rango crítico	0.191439	0.2295386	0.2520566

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

SNK Agrupamiento	Media	Número de observaciones	ACIDEZ
A	1.88889	36	0.21
A	1.77778	36	0.2
B	1.27778	36	0.19
B	1.13889	36	0.18

Anexo 2.- Resultados SAS® Análisis de Correlación

The SAS System

The CORR Procedure

2 Variables: IogUFC VI DAANAQUEL

Simple Statistics

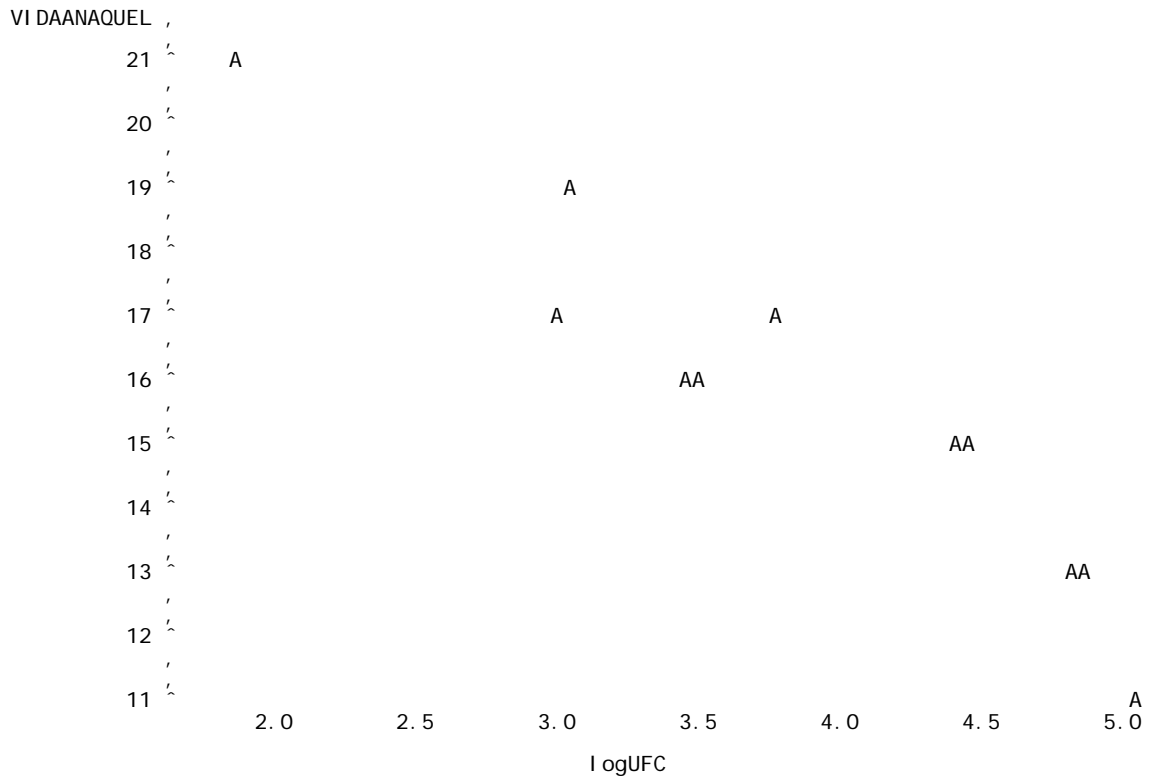
Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum
IogUFC	11	3.75545	0.84601	41.31000	2.06000	4.86000
VI DAANAQUEL	11	15.72727	2.83164	173.00000	11.00000	21.00000

Pearson Correlation Coefficients, N = 11
 Prob > |r| under H0: Rho=0

	IogUFC	VI DAANAQUEL
IogUFC	1.00000 <.0001	-0.95399
VI DAANAQUEL	-0.95399 <.0001	1.00000

The SAS System

Plot of VI DAANAQUEL*logUFC. Legend: A = 1 obs, B = 2 obs, etc.



The SAS System
 The REG Procedure
 Model: MODEL1
 Dependent Variable: VI DAANAQUEL

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	72.97314	72.97314	91.11	<.0001
Error	9	7.20867	0.80096		
Corrected Total	10	80.18182			

Root MSE	0.89497	R-Square	0.9101
Dependent Mean	15.72727	Adj R-Sq	0.9001
Coeff Var	5.69053		

Parameter Estimates

Variable	DF	Parameter Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t
Intercept	1	27.71868	1.28496	21.57	<.0001
logUFC	1	-3.19306	0.33453	-9.54	<.0001

The SAS System
 The REG Procedure
 Model: MODEL1
 Dependent Variable: VI DAANAQUEL

Output Statistics

Obs	Dep Var VI DAANAQUEL	Predicted Value Mean	Std Error Predict	95% CL	Mean	95% CL	Predict	Residual
1	13.0000	13.0306	0.3907	12.1468	13.9144	10.8215	15.2396	-0.0306
2	15.0000	14.0843	0.3201	13.3603	14.8083	11.9342	16.2344	0.9157
3	16.0000	16.6387	0.2862	15.9912	17.2863	14.5132	18.7643	-0.6387
4	17.0000	18.0118	0.3607	17.1958	18.8277	15.8290	20.1946	-1.0118
5	17.0000	15.9043	0.2705	15.2925	16.5162	13.7893	18.0193	1.0957
6	19.0000	17.9475	0.3563	17.1419	18.7539	15.7688	20.1270	1.0521
7	21.0000	21.1410	0.6281	19.7201	22.5618	18.6676	23.6144	-0.1410
8	11.0000	12.2004	0.4575	11.1654	13.2354	9.9266	14.4742	-1.2004
9	13.0000	13.0944	0.3859	12.2215	13.9674	10.8897	15.2992	-0.0944
10	15.0000	14.2120	0.3131	13.5038	14.9202	12.0672	16.3569	0.7880
11	16.0000	16.7345	0.2897	16.0791	17.3900	14.6065	18.8625	-0.7345

Output Statistics

Obs	Std Error Residual	Student Residual	-2	-1	0	1	2	Cook's D
1	0.805	-0.0380						0.000
2	0.836	1.096				**		0.088
3	0.848	-0.753	*					0.032
4	0.819	-1.235	**					0.148
5	0.853	1.284				**		0.083
6	0.821	1.281				**		0.155
7	0.638	-0.221						0.024
8	0.769	-1.561				***		0.431
9	0.808	-0.117						0.002
10	0.838	0.940				*		0.062
11	0.847	-0.867	*					0.044

Sum of Residuals 0
 Sum of Squared Residuals 7.20867
 Predicted Residual SS (PRESS) 10.29761

Anexo 3.- Resultados SAS® Prueba T

Procedimiento MEANS

Analysis Variable: DIF

Media	Desviación estándar	Pr > t
1.1101626	1.9991815	0.0807

