

24/7



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

ELIMINACION DE LA CONTAMINACION PSICROTROFA POST-PASTEURIZACION EN EL ENVASADO DE LA LECHE

Tesis Profesional

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :
ESTHER GALICIA GUERRA



México, D. F.

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I Resumen

II Introducción

A) Significado de la leche en México

1) Importancia Nutricional

2) Importancia Económica

B) Los Sistemas de Producción, Industrialización y Comercialización de la Leche en México

1) Generalidades sobre la flora psicrófila psicrotrofa

a) Definición

b) En la leche

2) El significado de la contaminación psicrotrofa del agua en la conservación de la leche

3) Influencia del almacenamiento de la leche cruda en la conservación de la leche pasteurizada

III Justificación

IV Objetivos

V Hipótesis

VI Metodología

A) Determinación del Tamaño de Muestra

B) Lavado de Botellas

C) Determinación de los Microorganismos Presentes en las Botellas de Vidrio

D) Simulación de Envasado en Caliente (SEC)

E) Determinación del Tiempo de Duplicación

F) Determinación del tiempo de Reducción Decimal

G) Coloración de Shaeffer y Fulton

VII Resultados y Discusión

VIII Conclusiones

IX Bibliografía

- CUADRO 1 PORCENTAJE DE NUTRIMENTOS APORTADOS POR PRODUCTOS GANADEROS Y AVES
- 2 DISTRIBUCIÓN DE LA PRODUCCION DE LECHE EN VACA
(Millones de litros)
- 3 PRINCIPALES ZONAS DE PRODUCCION GANADERA LECHERA
- 4 INVENTARIO Y PRODUCCION DE LA GANADERIA LECHERA ESPECIALIZADA Y NO ESPECIALIZADA
- 5 TIEMPOS DE DUPLICACION Y TIEMPOS DE REDUCCION DECIMAL A 63°C DE LAS BACTERIAS PSICROFILAS PSICROTROPAS AISLADAS DE LAS MUESTRAS DE AGUA
- 6 NUMERO MAXIMO DE BACTERIAS PSICROFILAS PSICROTROPAS QUE PUEDEN SER DESTRUIDAS DURANTE EL PROCESO DE PASTEURIZACION LENTA (63°C/30 minutos)
- 7 CONTAMINACION DE ENVASES DE VIDRIO PARA EMBOTELLAR LECHE
- 8 MORFOLOGIA DE LAS COLONIAS DESARROLLADAS POR LAS CEPAS PSICROFILAS AISLADAS DE LOS ENVASES DE VIDRIO
- GRAFICA 1 a 12 CRECIMIENTO DE LAS CEPAS PSICROFILAS EN ENVASES DESPUES DE 30 DIAS DE USO
- 13 DETERMINACION DEL TIEMPO DE REDUCCION DECIMAL A 63°C y 75°C
- 14 DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE ESPORAS EN LA CEPA M6
- FIGURA 1 DIAS DE DURACION DE LA LECHE CON RESPECTO AL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO PREVIO A LA PASTEURIZACION
- 2 EL PORCIENTO DE LA FLORA MESOFILA PRESENTE EN ENVASES ANTES, Y DESPUES DE 30 DIAS DE USO
- 3 EL PORCIENTO DE LA FLORA PSICROFILA PRESENTE EN ENVASES ANTES, Y DESPUES DE 30 DIAS DE USO
- 4 LEY DE LA DESTRUCCION TERMICA EXPRESADA COMO: a) Curva de supervivencia, b) Curva de Tiempo de Reducción térmica

R E S U M E N

La vida de anaquel de la leche se pretende aumentar principalmente por razones sanitarias y económicas. Las causas que impiden el aumento de la vida de anaquel de la leche fluída son atribuidas por muchos autores a la contaminación post-pasteurización.

Por lo anterior el objetivo de este trabajo es el de caracterizar la contaminación de los envases de vidrio en los que se expende la leche pasteurizada y evaluar la influencia que tendría un envasado de la leche en caliente.

Para lograr este objetivo se realizaron cuentas de mesófilas, coliformes y psicrófilas en un muestreo de 25 envases de vidrio antes, y después de 30 días de uso, así como la simulación del envasado en caliente, en donde los envases son sumergidos en agua a 59°C por el período necesario, hasta que el baño de agua estuviese a 50°C. Realizandolo también en envases antes, y después de ser usados.

Los resultados muestran que de la flora psicrófila remanente, 1 a 3 bacterias por envase, de las 12 aisladas, únicamente pudieron crecer en leche a 4°C, 2 bacterias con un tiempo de duplicación de 35 horas. Si existiera una contaminación con estas bacterias la vida de anaquel de la leche a 4°C sería de 30 a 34 días.

I N T R O D U C C I O N

A) El significado de la leche en México.

Dada la producción nacional lechera que es de 7 173 322 000 de litros anuales, y la importancia para la nutrición, que desde hace muchos años se le ha reconocido a la leche, es fácil de intuir tanto su importancia nutricional como económica. Sin embargo se pretende puntualizar algunos aspectos.

1) Importancia Nutricional

La leche es el alimento más complejo que entrega la naturaleza. Sin embargo, los requerimientos nutricionales de los seres vivos son muy complejas y ningún alimento los satisface todos.

La importancia de la leche reside en que es, el alimento natural más próximo a la perfección desde el punto de vista nutricional. Su proteína principal, la caseína, contiene todos los aminoácidos esenciales, y como fuente de calcio, fósforo y riboflavina es excelente. Contribuye también significativamente a los requerimi--entos de vitamina A (retinol), B₁ (tiamina) (1,2).

Además de la importancia nutricional de la leche, basada en el aporte de nutrimentos dado por los compo--nentes del producto en sí, debe analizarse también su

participación real dentro de la dieta. Para esto se presenta el cuadro No 1, donde se muestra el porcentaje con el cual contribuyen los productos de origen animal a cubrir los requerimientos de alimentación de la población mundial. En éste se muestra que los productos lácteos contribuyen a cubrir el 22% de proteína, 74% de calcio, 34.7% de fósforo y 39.8% de riboflavina de los requerimientos diarios(3,4)

2. Importancia Económica

La producción nacional para el año de 1985 fué de 7 173 322 000 litros, producidos por 5 397 021 vacas con un rendimiento de 1 329 litros por vaca al año, que económicamente representa 3 179 216 000 dólares; que complementados con las importaciones que fueron alrededor de 1 320 millones de litros dan un total de 3 755 376 300 dólares cifra que representa el valor total de la leche consumida en México.

Para poder analizar esto se presenta en el cuadro No 2 el uso al que se destina la producción nacional de leche. Se observa que la producción total de leche de vaca desde 1980 ha permanecido prácticamente constante con una media de 6 380 millones de litros y solo se observa un pequeño incremento de un 5% en el último año.

CUADRO 1

PORCENTAJE DE NUTRIMENTOS APORTADOS POR PRODUCTOS GANADEROS Y AVES

Producto	Energía	Proteína	Grasa	Carbohidratos	Calcio	Fósforo	Hierro	Vitamina A	Tiamina	Rivoflavina	Niacina
Lácteos	11.4	22.0	13.2	6.7	74.5	34.7	2.2	12.7	9.0	39.8	1.5
Carne, <u>pesca</u> do y pollo	19.9	41.6	34.1	0.1	3.8	27.6	29.5	21.9	26.4	25.1	46.9
Huevos	2.0	5.0	3.0	0.1	2.3	5.2	4.8	5.5	2.2	5.0	0.2
Total	33.3	68.6	50.3	6.9	80.6	67.5	36.5	40.1	37.6	69.9	48.6

Ensigmer, 1980(3)

DISTRIBUCION DE LA PRODUCCION DE LECHE DE VACA
(Millones de litros)

D E S T I N O	1980	1981	1982	1983	1984	1985*
LECHE PROCESADA	433.9	446.8	412.2	397.2	423.58	439.0
EVAPORADA	15.8	23.3	20.9	20.4	20.71	21.77
CONDENSADA	118.3	124.7	116.6	109.1	110.71	105.40
POLVO DESCREMADA	26.0	23.9	33.6	27.1	48.1	94.73
POLVO ENTERA	172.3	189.1	169.3	165.5	167.86	149.04
DIETETICA	101.5	85.8	76.8	75.1	76.2	68.06
PRODUCTOS DERIVADOS	1,334.8	1,414.2	1,495.0	1,461.5	1,481.07	1,578.0
QUESOS	861.2	885.2	935.8	914.8	927.14	1,005.86
MANTEQUILLAS	272.9	211.7	223.8	218.8	221.72	228.75
CREMAS	139.6	189.0	199.8	195.3	198.02	205.03
OTROS PRODUCTOS	61.6	128.3	135.6	132.6	134.19	138.36
PASTEURIZACION	1,507.1	1,500.8	1,643.5	1,606.7	1,628.14	1,721.5
LECHE BRONCA	3,465.7	3,494.6	3,372.9	3,303.0	3,327.21	3,434.4
T O T A L	6,741.3	6,856.4	6,923.6	6,768.4	6,860.00	7,172.9

* PRELIMINAR
S.A.R.H., 1986(5)

De esta leche la mayor proporción, aproximadamente un 49%, se consume como leche natural o bronca; tomando como base el año de 1980, hasta la fecha hay un decremento de un 4% de la que se dirige hacia este destino. Por lo contrario se observa un incremento de un 2% en la cantidad que se destina hacia la pasteurización y la producción de derivados, la cual representa a su vez el 22% del destino de la producción total de la leche.

Respecto a la leche destinada a la producción de derivados, la mayor proporción (63%) se destina a la producción de quesos manteniéndose en esos años prácticamente constante con una variación de 1%.

Respecto a los otros derivados se observa una pequeña caída de 6% de 1980 a 1981 en la cantidad destinada hacia la producción de mantequilla, incrementándose equitativamente la destinada a producir crema y otros productos para permanecer constante a partir de 1981 a la fecha en un 15, 13 y 9% respectivamente del total de leche destinada a la producción de derivados.

Finalmente se observa que el menor porcentaje de la producción total de leche (6%), se procesa principalmente en forma de leche entera en polvo, representando un 34% del total de la leche procesada en 1985. Sobre

esta producción se observa un incremento de un 3% de 1980 a 1981 a partir del cual disminuye constantemente llegándose a observar una caída de casi un 8% de 1983 a 1985.

Lo mismo ocurre con los productos procesados que le siguen en orden de importancia respecto a su cantidad producida, la leche condensada que representa el 24% de la leche procesada en 1985 y la leche dietética que representa el 15.5%, cuya producción decrece un 3% en los últimos 2 años, mientras que por el contrario la leche en polvo descremada se incrementó en un 14%, para alcanzar un 21.57% del total de leche que se procesa en el año de 1985.

De todo esto se puede concluir que:

La cantidad de leche producida en los últimos años, no se ha incrementado, como habría de suponerse, para que pudiera satisfacer los requerimientos de incremento poblacional.

B) Los sistemas de Producción, Industrialización y Comercialización de la leche en México.

En la actualidad la crisis de la producción lechera en México es debido de entre otros factores a los sistemas de industrialización, comercialización de la leche y la falta de una infraestructura tecnológica.

En el cuadro No. 3, se muestra la producción de leche por diferentes sistemas de explotación. En este se observa que el 54% de la leche en México es producido por solamente 939 263 vacas especializadas y que el resto (4 457 758 vacas) es producido por ganado de doble propósito (carne y leche). Esta distribución ejemplifica que la mitad de la producción nacional se realiza con animales de doble propósito y principalmente en el trópico como lo muestra el cuadro No. 4, en el que se puede observar la producción de leche en Veracruz; 29 984 miles de litros es producido por ganado especializado y 570 663 miles de litros por ganado no especializado, siendo este estado representativo de una ganadería de doble propósito en el trópico, además de ser uno de los estados de mayor producción lechera en México(5).

Bajo esta situación es fácil de explicar porqué en las estadísticas generales, México aparece como un

CUADRO 3

PRINCIPALES ZONAS DE PRODUCCION GANADERA LECHERA (1985)

	Ganadería Especializada		Ganadería No Especializada			
	Inventario	Producción*	Inventario	Producción*	Inventario	Producción*
Coahuila	68 297	346 916	75 182	54 395	143 792	401 311
Chiapas	5 441	17 557	525 528	328 635	530 969	346 192
Chihuahua	43 432	201 761	305 062	195 045	348 994	396 806
D.F.	25 896	128 636	3 614	6 548	29 510	135 184
Durango	49 852	249 635	188 499	100 029	168 351	349 664
Guanajuato	69 441	334 644	142 710	109 387	212 151	444 031
Jalisco	138 492	547 562	424 099	463 976	562 591	1 011 538
México	123 382	550 716	137 300	151 561	260 682	702 277
Puebla	54 322	193 507	147 399	98 182	201 721	291 689
Tlaxcala	25 593	103 958	10 203	12 845	35 796	116 803
Veracruz	13 952	29 984	696 033	570 663	709 985	600 647

* Miles de litros

S.A.R.H. , 1986 (5)

INVENTARIO Y PRODUCCION DE LA GANADERIA LECHERA ESPECIALIZADA Y NO ESPECIALIZADA (1985)

	GANADERIA ESPECIALIZADA*			GANADERIA NO ESPECIALIZADA**			T O T A L		
	1	2		1	2		1	2	
	Inventario	Rendimiento	Producción	Inventario	Rendimiento	Producción	Inventario	Rendimiento	Producción
Aguascalientes	27,949	4,453	124,462	23,534	1,661	39,101	51,483	3,177	163,563
Baja California Nte	20,688	5,142	106,388	9,882	2,858	28,244	30,570	4,404	134,632
Baja California Sur	2,334	2,825	6,593	11,027	568	6,260	13,361	962	12,853
Campeche	3,285	3,273	10,751	62,643	541	33,882	65,928	677	44,633
Coahuila	68,297	5,080	346,916	75,182	724	54,395	143,479	2,797	403,311
Colima	9,604	2,919	28,030	21,033	514	10,818	30,637	1,268	38,848
Chiapas	5,441	3,227	17,557	525,528	625	328,625	530,969	652	346,192
Chihuahua	43,932	4,593	201,761	305,062	639	195,045	348,994	1,137	396,806
Distrito Federal	25,896	4,967	128,636	3,614	1,812	6,548	29,510	4,581	135,184
Durango	49,852	5,008	249,635	118,499	844	100,029	168,351	2,077	349,664
Guanajuato	69,441	4,819	334,644	142,710	766	109,387	212,151	2,093	444,031
Guerrero	13,585	2,820	38,316	136,758	425	58,054	150,343	641	96,370
Hidalgo	28,567	4,300	122,841	86,624	671	58,124	115,191	1,571	180,965
Jalisco	138,492	3,954	547,562	424,099	1,094	463,976	562,591	1,798	1'011,538
México	123,382	4,464	550,716	137,300	1,104	151,561	260,682	2,694	702,277
Michoacán	52,315	3,070	160,581	205,691	810	166,571	258,006	1,268	327,152
Morelos	3,181	2,560	8,143	18,693	986	18,434	21,874	1,215	26,577
Nayarit	5,762	2,633	15,172	119,340	564	67,270	125,102	659	82,442
Nuevo León	13,421	2,722	36,536	27,722	742	20,570	41,143	1,388	57,106
Oaxaca	31,226	2,940	91,818	110,728	414	45,877	141,954	970	137,695
Puebla	54,322	3,562	193,507	147,399	666	98,182	201,721	1,446	291,689
Queretaro	37,994	4,955	188,279	34,497	909	31,370	72,491	3,030	219,649
Quintana Roo	174	989	172	7,256	515	3,736	7,430	526	3,908
San Luis Potosí	15,672	3,739	58,596	120,857	554	67,011	136,529	920	125,607
Sinaloa	7,056	3,596	25,373	121,035	706	85,426	128,091	865	110,799
Sonora	14,314	3,767	53,919	149,101	672	100,181	163,415	943	154,100
Tabasco	3,200	2,444	7,822	227,360	620	140,889	230,560	645	148,711
Tamaulipas	6,662	2,918	19,437	212,616	560	119,147	219,278	632	138,584
Tlaxcala	25,593	4,062	103,958	10,203	1,259	12,845	35,796	3,263	116,803
Veracruz	13,952	2,149	29,984	696,033	820	570,663	709,985	846	600,647
Yucatán	2,774	2,739	7,597	51,793	462	23,943	54,567	578	31,540
Zacatecas	20,900	3,935	82,239	113,939	520	59,207	134,839	1,049	141,446
Total Nacional:	939,263	4,150	3'897,941	4'457,758	735	3'275,381	5'397,021	1,329	7'173,322

FUENTE: S.A.R.H.

1 Litros Vaca-Año

2 Miles de Litros

* Se considera a todos los vientres cuya función zootécnica está orientada a la producción de leche.

** Se considera a los vientres cuya función zootécnica está orientada a la producción de leche y carne

país con muy bajos rendimientos de producción anual por vaca. Sin embargo, esto no explica porqué México es un importador de grandes cantidades de leche, pero podríamos aventurarnos a decir que una de las razones de importancia, pudiese ser la falta de investigación tecnológica en el área, ya que la desarrollada en países templados no es adaptable a nuestras condiciones tropicales y semitropicales. Esto se hace evidente bajo las siguientes premisas:

1. No existe desarrollo genético de vacas de alta producción para zonas tropicales.
2. Los sistemas de industrialización y comercialización de leche, no han sido diseñados para resolver el problema de producción y comercialización de la leche en países en desarrollo.
3. Los países en desarrollo no han creado una infraestructura técnico-científica para la resolución de sus problemas particulares(8,26).

El sistema de comercialización de la leche ha sido diseñado para favorecer a los concentradores del producto (plantas pasteurizadoras e industrializadoras), pocos intentos se han realizado para favorecer que el productor comercialice su leche, por consecuencia en México tampoco existe tecnología para el procesado de

leche en pequeños volúmenes y la existencia no parece adaptarse a los pequeños productores por múltiples circunstancias:

- a) Alto costo de los equipos
- b) Necesidad de comercialización diaria
- c) Personal calificado para operación
- d) Lo distanciado entre el productor y el consumidor, lo que muy pocas veces permite que el productor sea comerciante al mismo tiempo
- e) Falta de vías de comunicación para la recolección diaria

Dada esta problemática, el hallazgo tecnológico para la conservación de leche pasteurizada por largos periodos de tiempo permite una forma de comercialización diferente y por consecuencia presenta una alternativa para conservación de leche fluida.

Estudios realizados con anterioridad demuestran que la leche es posible conservarla por periodos 5 veces más prolongados que las leches comerciales actuales(26).

Los estudios para mostrar como es esto posible se describen en los capítulos subsecuentes.

1. Generalidades sobre la flora psicrófila psicrotrofa

a) Definición

La capacidad de algunas bacterias de crecer a bajas temperaturas fué demostrado por Forster en 1887, sin embargo Schmidt-Nielsen(8) en 1902 fué el primero en atribuir el calificativo de "psicrófilo" a las bacterias cuya temperatura óptima de crecimiento es baja (inferior a 20°C, de 15 o 10°C según otros autores)(11).

Más recientemente en el diccionario de microbiología publicado en 1957, define a las bacterias psicrófilas, como aquellas cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra a 15°C o menos(8,9, 10).

Sin embargo esta terminología rápidamente se reveló estar mal adaptada a las exigencias de la microbiología de alimentos(11). en efecto, pocos microorganismos tienen un desarrollo óptimo a temperaturas inferiores a 15 o 20°C, por tanto los psicrófilos verdaderos son escasos(8,11). Por el contrario, un grupo de bacterias mucho más numerosa es capaz de multiplicarse a bajas temperaturas sin que por ello sean psicrofilas verdaderas, es decir tener la temperatura óptima de crecimiento por debajo de 20°C. Pues bien, estos microorganismos son los de mayor importancia práctica, ya que son los responsables de la alteración de la leche y pro

ductos lácteos conservados a bajas temperaturas(11).

Eddy en el año de 1960 propuso la utilización del término "psicrotrofo" para bacterias capaces de desarrollarse en frío , independientemente de su temperatura óptima de crecimiento. Finalmente en Octubre de 1976 en el Congreso de la Federación Internacional de Lechería, los psicrotrofos fueron definidos como microorganismos que pueden crecer a 7°C o menos independientemente de su temperatura óptima de crecimiento(11, 12).

Veisseyre da una clasificación más amplia, donde los psicrofílos con temperatura óptima de crecimiento superior a 20°C son los psicrotrofos mesófilos. Los psicrofílos que pueden desarrollarse a una temperatura igual o inferior a 7°C, son los psicrofílos psicrotrofos. Cuando la multiplicación exige una temperatura superior a 7°C, se trata de psicrofílos no psicrotrofos (11).

b) En la Leche

Se sabe que el desarrollo de la mayor parte de los microorganismos de la leche se ve frenado mediante enfriamiento a una temperatura inferior a 15°C. Sin embargo el considerable empleo del frío en lechería en

los últimos años ha puesto en evidencia la falsa pro--tección que representa la refrigeración cuando se apli--ca a una leche de mala calidad bacteriológica. La exis--tencia en la leche de microorganismos capaces de de---sarrollarse a bajas temperaturas puede ocasionar gra--ves alteraciones de la leche conservada en frío(11).

Las bacterias psicrófilas psicrotrofas han esta--do presentes en la leche y productos lácteos durante décadas sin haber sido estudiadas a fondo. Sin embargo en nuestros días se presentan como un grave problema.

Los microorganismos psicrotrofos están presentes en los tres grandes grupos de microorganismos que cons--tituyen la flora de la leche(11).

Se sabe desde hace tiempo que los productos lác--teos almacenados en frío, pueden ser el asiento para el desarrollo de hongos(Penicillum, Alternaria, Cladosporium, etc.) o levaduras(Candida, Cryptococcus, etc.). Pero las bacterias psicrotrofas son las de mayor in---terés tecnológico ya que la leche constituye para mu--chas de ellas un medio de cultivo idóneo. Estas bac--terias pertenecen a un número reducido de géneros que presentan ciertas características comunes, constituyen--do un grupo ecológico bien definido(9,11).

La mayoría de las bacterias psicrotrofas son Gram

negativas, esporuladas, aerobias y de forma bacilar(11).

Las bacterias del género Pseudomonas, las más frecuentes son: P. putrefaciens, P. fluorescens, P. fragi, P. viscosa, etc..

A continuación se encuentran las bacterias pertenecientes al género Achromobacter(A. butyri), Alcaligenes(A. viscolactis, A. odorans, A. tolerans, A. metalcaligenes, etc.) y Flavobacterium(F. lactis, F. malodoris, F. solari, etc.).

Por último se encuentran Enterobacterias psicrotrofas pertenecientes a los géneros Escherichia(E. coli) y Aerobacter(A. aerogenes y A. cloacae).

Es de destacar que algunas bacterias gram positivas de forma redondeada pueden también encontrarse entre los psicrotrofos. Se han descrito que ciertas cepas de Micrococcus pueden desarrollarse en la leche refrigerada.

Por último, numerosas bacterias que habitualmente no son psicrotrofos pueden originar cepas mutantes capaces de desarrollarse a bajas temperaturas(11).

Este tipo de bacterias, cuando están presentes en leche, deterioran el sabor, y el olor del producto debido a la actividad lipolítica y proteolítica que desarrollan, son causantes de sabores ácidos, amargos,

dulces, pútridos, etc. Estos malos sabores son una alteración grave pues no desaparecen durante el tratamiento posterior de la leche cruda(11).

c) Microorganismos psicrotrofos después de pasteurizar

Las primeras investigaciones concluyen que las bacterias psicrotrofas no sobreviven a la pasteurización comercial o de laboratorio(10).

Thomas and Drug reportan que ningún cultivo psicrotrofo aislado de leche y productos lácteos refrigerados a 7°C o menos sobreviven al tratamiento de pasteurización, pero algunos cultivos aislados de leche mantenidos entre 8 a 10°C fueron termoresistentes. Investigaciones en la última década han identificado 2 grupos de microorganismos, los cuales pueden sobrevivir a temperaturas de pasteurización, especialmente bacterias Gram positivas esporuladas y no esporuladas(10,13).

Washam et. al.(14) aislaron microorganismos termoresistentes de leche pasteurizada y clasificaron estos microorganismos que sobreviven 4 exposiciones de 71.1°C por 16 segundos, y después incubadas a 7.2°C como los psicrotrofos termódúricos. Los formadores de esporas fueron identificados como especies de Bacillus y los no formadores de esporas como especies de Corynebacterium

y Arthrobacter. Los psicrotrofos termodúricos fueron identificados como Bacillus subtilis, Lactobacillus casei, Micrococcus Flavus y Streptococcus faecalis fueron aislados de leche pasteurizada en el laboratorio (10). Estos microorganismos tienen tiempo de generación de 7 a 27 horas por 1.7 a 7.2°C, los datos muestran que pudieron alcanzar un nivel de población suficiente para causar los defectos. Micrococcus y especies de Bacillus fueron dominantes en muestras de leche cruda. Estos ter modúricos estaban presentes en la leche como un resultado del equipo mal lavado(10).

Mikolajcik and Simons(15) examinaron 109 muestras de leche cruda y observaron que solamente el 13% de las leches calentadas a 80°C por 12 minutos contenían cuentas psicrotrofas de 10 o más por mililitro. después de almacenadas a 7°C por 7 días el 58% de las muestras tienen un promedio de 340 esporas psicrotrofas por mili litro. En otros estudios, lo no psicrotrofos fueron ais lados de algunas leches inmediatamente después de pas-- teurizar; sin embargo, después de almacenar de 7 a 7.2°C por 7 a 10 días las cuentas de psicrotrofos es entre 1 y 100 000 por mililitro(16)

Con el incremento del uso de alta temperatura-cor to tiempo de pasteurización y el prolongado almacenaje

de la leche en refrigeración. La formación de esporas psicrotrofas puede convertirse en lo más importante en la Industria Láctea. La información en la incidencia de formadores de esporas psicrotrofas es limitado. Algunos investigadores han postulado que los formadores de esporas psicrotrofas pueden ser variantes de formadores de esporas mesófilas que se han adaptado, ellos mismos al crecimiento a bajas temperaturas(10,15,17).

Las esporas psicrotrofas son menos resistentes al calor que esporas mesofílicas(17,19). Existe una correlación entre la temperatura a la cual la espora es producida y el grado de termolabilidad, aunque las formadoras de esporas sobreviven a la pasteurización presentan un período largo de adaptación y un lento crecimiento a 7°C(10). Algunos aislados tienen un tiempo de generación de 15 a 20 horas a 7.2°C, otras especies pueden duplicarse alrededor de 7 horas a esta misma temperatura(10). Muchos investigadores consideran el deterioro por especies de Bacillus, este no es un problema práctico hasta después de dos semanas de almacenado en refrigeración.

Maxcy reporta que la leche recién pasteurizada no contiene bacterias Gram negativas y su presencia en la leche es un resultado de contaminación post-pasteurizada.

zación. Posteriores investigaciones indican que algunas bacterias Gram negativa pueden sobrevivir a temperaturas de pasteurización(10,14). Stadhouders(10) incluye Alcaligenes tolerans entre bacterias termoresistentes en leche. Estas bacterias Gram negativas pueden causar deterioro en leche pasteurizada no contaminada almacenada de 6 a 20°C. Algunas cepas de coliformes especialmente E.coli I son resistentes al calor(10). Además, investigaciones con Pseudomonas muestran que algunas pueden sobrevivir tratamientos térmicos usados en la pasteurización de la leche, cuando la población psicrotrofa inicial fuera suficientemente grande el mayor crecimiento aparecerá después de 7 días, los psicrotrofos pueden tener daños y necesitarán tiempo para recobrar su multiplicación normal o ambientarse a la nueva temperatura(20,21,22,23).

Debe tomarse en cuenta la influencia del calor en la reducción logarítmica del número de microorganismos viables. Consecuentemente el número inicial de psicrotrofos termoresistentes en leche cruda es de gran importancia; mientras mayor sea el número de bacterias antes de la pasteurización, mayor será el número de sobrevivientes por lo que se acortará la fase lag de crecimiento y rápidamente aparecerán defectos de sabor y olor(9,21).

2. El significado de la contaminación psicrotrofa del agua en la conservación de la leche.

Con el objeto de comprobar si la contaminación de la leche era el agua como fuente principal de bacterias psicrófila psicrotrofas en la calidad de la leche y en la vida de anaquel de la misma.

García y Pérez Gavilán realizaron un estudio en el cual tomaron muestras de agua de 9 establos localizados al norte de México, y aislaron la flora psicrófila psicrotrofa más abundante, a esta flora se le determinó su tiempo de duplicación a 4°C y tiempo de reducción decimal, cuadro No. 5, de estos resultados se desprende que la contaminación de la flora psicrófila psicrotrofa del agua sería destruída en su totalidad a pesar de ser alta, por ejemplo se calculó la contaminación que puede ser eliminada en la pasteurización lenta de las diferentes cepas aisladas, cuadro No. 6.

El trabajo hace notar que si la contaminación psicrotrofa proveniente del agua, previa a la pasteurización, no es la responsable de la descomposición de la leche pasteurizada refrigerada a 4°C. Sin embargo, si la contaminación es posterior a la pasteurización, estas bacterias sí pueden ser la causa de la descomposición de la leche mantenida a 4°C(9).

CUADRO 5

TIEMPOS DE DUPLICACION Y TIEMPOS DE PRODUCCION DECIMAL
A 63°C DE LAS BACTERIAS PSICROFILAS PSICROTROFA
AISLADAS DE LAS MUESTRAS DE AGUA

Cepa	Tiempo de Duplicación* (horas)	Tiempo de Reducción Decimal** (s) D_{63}
1 A	30.35	< 40.76
1 H	42.08	49.35 ± 0.10
2 A	13.21	< 40.19
5 A	17.18	< 39.06
6 A	15.77	< 35.74
6 B	30.57	43.24 ± 0.05
10B	43.41	71.16 ± 0.66
16D	16.85	< 40.45

* Crecimiento medido en leche descremada estéril a 4°C

** Medido en leche descremada estéril a 63°C

García, R.L.M.;1985(9)

CUADRO 6

NUMERO MAXIMO DE BACTERIAS PSICROFILAS PSICROTROFAS
QUE PUEDEN SER DESTRUIDAS DURANTE EL PROCESO DE PAS
TEURIZACION LENTA (63°C/30 MINUTOS)

CEPA	CONTAMINACION MAXIMA* (m.o./ml)
1 A	1×10^{44}
2 H	1×10^{36}
2 A	1×10^{46}
5 A	1×10^{46}
6 A	1×10^{50}
6 B	1×10^{41}
10B	1×10^{25}
10D	1×10^{44}

* Esta contaminación fue calculada a partir del tiempo de reducción decimal.

García R.L.M., 1985(9)

3. Influencia del almacenamiento de la leche cruda en la conservación de la leche pasteurizada.

Investigaciones realizadas por García y Pérez Gavilán, con el objeto de comprobar la influencia del tiempo y la temperatura de almacenamiento de la leche cruda, en la calidad final y la vida de anaquel de la leche pasteurizada, tomaron muestras de 4 establos diferentes y almacenaron a diferentes intervalos de tiempo a 4 y 20°C, encontraron como lo muestra la figura 1, que cuando la leche cruda se almacena a 20°C, mientras mayor sea el tiempo transcurrido entre la ordeña y la pasteurización, existe una disminución en la duración de la leche pasteurizada, sin embargo cuando la leche es pasteurizada inmediatamente después de la ordeña o bien almacenada en buenas condiciones a 4°C, se observa que aún después de 51 horas la leche al ser pasteurizada presenta una duración aún mayor de treinta días con excelentes condiciones bacteriológicas; mientras que en la leche que fué almacenada a 4°C durante 72 horas, disminuye el tiempo de duración, debido al crecimiento de la flora psicrófila psicrotrofa.

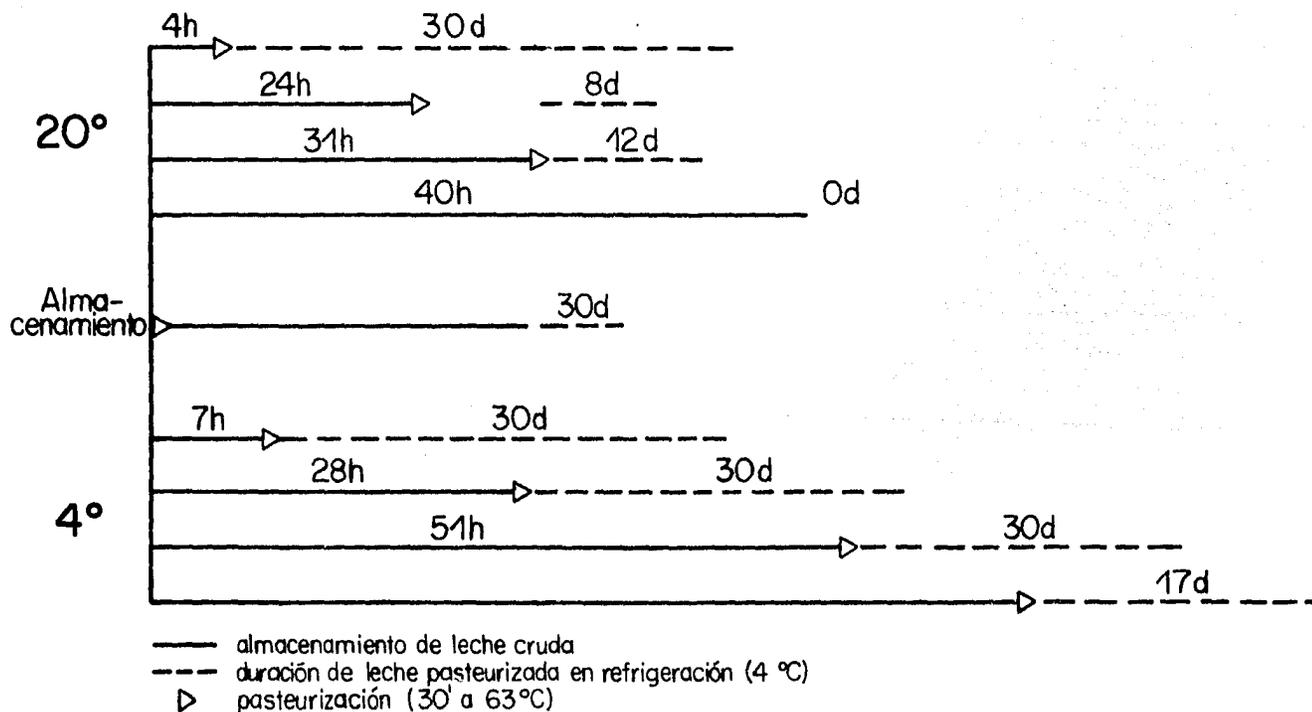


FIGURA 1 DIAS DE DURACION DE LA LECHE CON RESPECTO AL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO PREVIO A LA PASTEURIZACION

Todos estos estudios muestran que una leche pasteurizada inmediatamente después de la ordeña tiene una duración mayor a 30 días, cuando esta leche se mantiene en refrigeración. Sin embargo estos criterios no son utilizados en la industria de pasteurización de la leche, y no han sido reportados en la literatura criterios generales para que esto suceda.

Es la intención de este trabajo mostrar los criterios mencionados en el párrafo anterior no son suficientes para que en la industria se pudiese tener leches pasteurizadas de larga duración a menos que existan una pasteurización previa del envase.

J U S T I F I C A C I O N

Por lo expuesto en los incisos anteriores, puede observarse la importancia que representa aumentar la vida de anaquel de la leche, ya que existen problemas complejos debido a las condiciones de producción y almacenaje de la leche. Debido a ésto no es posible realizar un almacenamiento muy prolongado del producto: sin embargo la vida de anaquel sigue siendo corta, una de las causas principales de esta corta duración es la contaminación post-pasteurización en el envasado. Ya que si sobrevive o contamina una bacteria psicrotrofa por litro, con un tiempo de duplicación de 7 horas a 4°C esto sería suficiente para que la vida de anaquel de la leche fuese de 8 a 10 días, contaminaciones mayores obviamente disminuyen esta duración en forma muy significativa.

El problema fundamental es eliminar las bacterias psicrófilas psicrotrofas presentes en botellas utilizadas en el envasado de la leche ya que dichos microorganismos son los causantes directos del deterioro del producto, por lo tanto al existir este tipo de bacterias en la leche deterioran el sabor y el olor del producto debido a su alta actividad lipolítica y proteolítica.

O B J E T I V O S

Objetivo General

Demostrar que al envasar la leche en caliente se elimina la flora psicrotrofa del envase, por tener estas bacterias una resistencia térmica muy baja.

Objetivos Particulares

- 1) Determinar el número de microorganismos presentes en botellas nuevas y de 30 días de uso.
- 2) Conocer la proporción de bacterias mesófilas, coliformes y psicrófilas presentes en las botellas.
- 3) Determinar si con el envasado en caliente se destruirán todas las bacterias psicrófilas presentes en las botellas, que afectan la vida de anaquel de la leche.
- 4) Aislar las bacterias más abundantes de cada muestra.
- 5) Determinar los tiempos de duplicación de las bacterias aisladas.
- 6) Conocer el tiempo de reducción decimal a 63°C para cada bacteria aislada.

H I P O T E S I S

Las bacterias psicrófilas se encuentran en baja proporción en el producto y son las causantes del deterioro de la leche. Si envasamos la leche en caliente se pasteuriza el envase, siendo eliminadas estas bacterias, contribuyendo así al aumento en la vida de anaquel del producto.

M E T O D O L O G I A

A. Determinación del tamaño de muestra.

Para determinar el tamaño de muestra del número de botellas es necesario establecer una diferencia significativa (δ^*) al nivel de significancia (α) con una probabilidad (P), de que la significancia, si existe será hallada de acuerdo a la siguiente formula (28):

$$n > 2 \left(\frac{\sigma}{\delta} \right)^2 \{ t_{\alpha|\gamma} + t_{2|1-P||\gamma} \}^2$$

de donde:

n = número de repeticiones

σ = desviación típica verdadera

δ = la menor diferencia verdadera que se desea detectar (es necesario conocer únicamente el coeficiente entre σ y δ , no sus valores reales).

γ = grados de libertad de la desviación típica muestral \sqrt{MS} dentro con a grupos y n repeticiones por grupo

α = nivel de significancia

P = probabilidad deseada de que una diferencia será significativa

$t_{\alpha|\gamma}$ y $t_{2|1-P||\gamma}$ = valores de una tabla de la t (stu-

* Para registrar una diferencia muy aparente (un gran valor de δ), únicamente necesitaríamos pocas muestras, pero para una diferencia más fina (un pequeño valor de δ) se necesitarían muestras de gran tamaño.

dent de dos colas con γ grados de libertad correspondientes a las probabilidades de α y $2(1-P)$, respectivamente).

Esto se resuelve en forma interativa: esto significa que probamos un valor inicial de n , a fin de obtener un buen valor de n . Primeramente necesitamos calcular n porque sin un valor de n no sería posible conocer los grados de libertad y tampoco podríamos buscar t .

Tomando en cuenta que:

$a = 2$ poblaciones diferentes (nuevas, y 30 días de uso)

$n = 25$

$\sigma = \log 3 = 0.4771 \times 100 = 47.71$

$\gamma = 2(25-1) = 48$

$\alpha = 1\% = 0.01$

$P = 80\%$

$t_{0.01(96)} = 2.7045$

$t_{(1-0.080)(96)} = 1.1673$

Aplicando la fórmula inicial

$$n > 2 \left(\frac{47.71}{5} \right)^2 (2.7045 + 1.1673)^2$$

$$(1.3532) (19.5753) = 26.49$$

Utilizando un valor de $n = 25$ obtenemos un valor de $n = 26$, sustituyendo este valor en la fórmula inicial tenemos :

$$n = 26$$

$$\gamma = 2(26-1) = 50$$

$$n > 2 \left(\frac{47.71}{55} \right)^2 (2.7045 + 1.6264)^2 \\ (1.3532)(18.75) = 25.38$$

Obteniéndose en esta segunda interacción un valor aproximado de $n = 25$ botellas es el tamaño de muestra adecuado.

Teniendo el tamaño de muestra adecuado, del lote de 2000 botellas se tomaron dos sublotos de 25 las cuales fueron tapadas y etiquetadas para determinar el número de microorganismos que existen antes, y después de una simulación de envasado en caliente.

B). Lavado de las botellas

El lavado de las botellas se efectuó de la siguiente forma:

- a) Las botellas son remojadas en agua
- b) son cepilladas con detergente y
- c) enjuagadas con una solución de benzaldehído y agua
- d) son escurridas en una canastilla de acero

inoxidable (la cual es la misma en la que es transportada la leche).

C) Determinación de los microorganismos presentes en las botellas de vidrio(29).

Método propuesto por la "Standard Methods for the Examination of Dairy Products" en 1941. A cada botella se le adicionó 20 ml de agua estéril, se tapó y se agitó hasta mojar toda la superficie interna del frasco. Se tomaron 3.5 ml de agua de enjuague, se distribuyen en tres cajas petri (2,1,0.5 ml), y se determinó el número de microorganismos presentes. Para la determinación de las bacterias mesófilas, psicrófilas se utilizó agar "plate count". Las placas se incubaron a 29°C durante 48 horas para mesófilos, y a 4°C durante 10 días para psicrófilos. Para determinar bacterias coliformes se utilizó el medio de diferenciación agar de bilis y rojo violeta, incubando las placas a 37°C durante 48 hrs. El recuento de la flora se realizó con un contador de colonias.

D) Simulación del envasado en caliente (SEC).

Se basa en simular un envasado de la leche en caliente y dejar enfriar a 50°C y después a temperatura

ambiente hasta su refrigeración. Para lo cual se procedió a hacer lo siguiente: Se calentó un litro de leche con agitación constante hasta 63°C, se vertió la leche a una botella, se toma el tiempo en que la temperatura bajó a 50°C, por otro lado, a una botella que contenía 20 ml de agua estéril, bien tapada, se sumergió en un baño hasta que alcanzó una temperatura de 63°C, se apagó el calentamiento, se tomó el tiempo en que la temperatura llegó a 50°C, a cada botella se le adicionaron 20 ml de agua estéril, se tapó y se agitó hasta mojar toda la superficie interna de la botella. Inmediatamente se colocaron las botellas en baño de agua a 59°C, dejando que las botellas alcanzaran esta temperatura, se apaga el calentamiento, y se dejan hasta que estén a una temperatura de 50°C, cuantificar el número de microorganismos presentes por el método mencionado en el inciso anterior para cuentas de mesófilos, coliformes y psicrófilos.

E) Determinación del tiempo de duplicación.

De las bacterias psicrófilas que crecieron después de una simulación de envasado en caliente, se aislaron en placas de agar "plate count" por siembra por estría, a estas bacterias aisladas se les determinó el

el tiempo de duplicación, sembrando los microorganismos en tubos con leche descremada estéril al 11% de sólidos. Posteriormente se incubaron durante 72 horas a 29°C. Pasado el tiempo de incubación se tomo un inóculo de 1 ml pasandolo a botellas con 99 ml de leche descremada estéril. Las botellas se incubaron a 4°C durante 10 días realizando cuentas diarias por el método de placa de Koch.

Las pruebas se realizaron por triplicado para cada bacteria con el fin de obtener una mayor significancia en las mediciones.

El cálculo de tiempo de duplicación o tiempo de generación (G) se llevó a cabo mediante las siguientes fórmulas:

$$n = \frac{\log N_1 - \log N_0}{\log_2}$$

$$G = \frac{t}{n}$$

donde:

N_0 = número de bacterias en el punto inferior de la pendiente

N_1 = número de bacterias en el punto superior de la pendiente

t = tiempo (lapso entre N_0 y N_1).

n = número de biparticiones

G = tiempo de generación

F. Determinación del tiempo de reducción decimal.

A las bacterias que presentaron crecimiento en leche a 4°C, se tiñeron mediante tinción de Gram(30), y se observaron los frotis al microscopio para obtener datos acerca de su morfología . A estas bacterias se les determinó el tiempo de reducción decimal basado en el método de Esty y Williams(31). Se inoculó 1 ml de leche descremada al 11% de sólidos con una concentración de entre 10^6 y 10^7 m.o./ml de cada cepa en tubos de vidrio de 13 x 100 sellados con tapón de latex, con teniendo 4 ml de leche estéril. Se inocularon siete tubos por cada cepa, los cuales fueron sumergidos en un baño maría a 63°C. Uno a uno los tubos fueron retirados cada 5 minutos para tomar muestras a diferentes tiempos. Las muestras se determinan por el método de placa de Koch, incubándolas 72 horas a 29°C. Pasado el tiempo de incubación se hizo la cuenta de colonias por medio de un contador de colonias(8).

Para calcular el tiempo de reducción decimal (D) a 63°C se utilizó la siguiente fórmula:

$$D = \frac{t}{\log N_0 - \log N_t}$$

donde :

D = tiempo de reducción decimal

t = tiempo de calentamiento en minutos

N_0 = número inicial de m.o.

N_t = número final de m.o.

G) Coloración de Shaeffer y Fulton

a) Fijar el frotis con calor

b) Verde malaquita al 5% calentar a emisión de vapor un minuto

c) Lavar con agua

d) Safranina 15 segundos

e) Lavar con agua

f) Dejar secar

g) Observar al microscopio con objetivo de inmersión.

R E S U L T A D O S Y D I S C U C I O N

Cuantificación de los microorganismos presentes en las botellas de vidrio.

En el cuadro No. 7, se muestra el promedio y la desviación estandar de la flora mesófila (bacterias, hongos y coliformes), y de la flora psicrófila (bacterias, hongos) presentes en botellas antes, y después de 30 días de uso.

En la figura 2, se muestra el porciento de la flora mesófila en envases antes, y después de 30 días de uso, con y sin simulación de envasado en caliente, encontrándose que en los envases antes de ser usados el promedio de la flora mesófila es de 1,183 microorganismos por envase existiendo un 91.63% de bacterias; 0.33% de coliformes y 8.03% de hongos; con la simulación de envasado en caliente, el promedio de la flora mesófila se reduce el 86.99%, encontrándose en forma residual 10.48% de bacterias, 0.08% de coliformes y 2.45% de hongos. En los envases de 30 días de uso el promedio de la flora mesófila es de 1,485 microorganismos por envase, existiendo 92.25% de bacterias, 0.50 de coliformes y 7.74% de hongos, con la simulación de envasado en caliente, el promedio de la flora mesófila se reduce el 70.31%, encontrándose en forma

CUADRO 7

CONTAMINACION DE ENVASES DE VIDRIO PARA EMBOTELLAR LECHE

No. de Lavadas	Tratamiento	MESOFILOS				PSICROFILOS		
		Coliformes	Bacterias	Hongos	Total	Bacterias	Hongos	Total
0	Sin SEC*	4 ± 7	1084 ± 796	100 ± 56	1183 ± 825	72 ± 59	43 ± 23	115 ± 66
0	Con SEC	0.96 ± 2	124 ± 71	29 ± 24	156 ± 87	1 ± 2	0.24 ± 1	1 ± 3
30	Sin SEC	9 ± 15	1370 ± 954	115 ± 71	1485 ± 1013	133 ± 245	13 ± 16	147 ± 244
30	Con SEC	2 ± 4	382 ± 469	58 ± 69	441 ± 513	3.41 ± 5	0.35 ± 1	3 ± 5

* SEC Simulación de Envasado en Caliente.

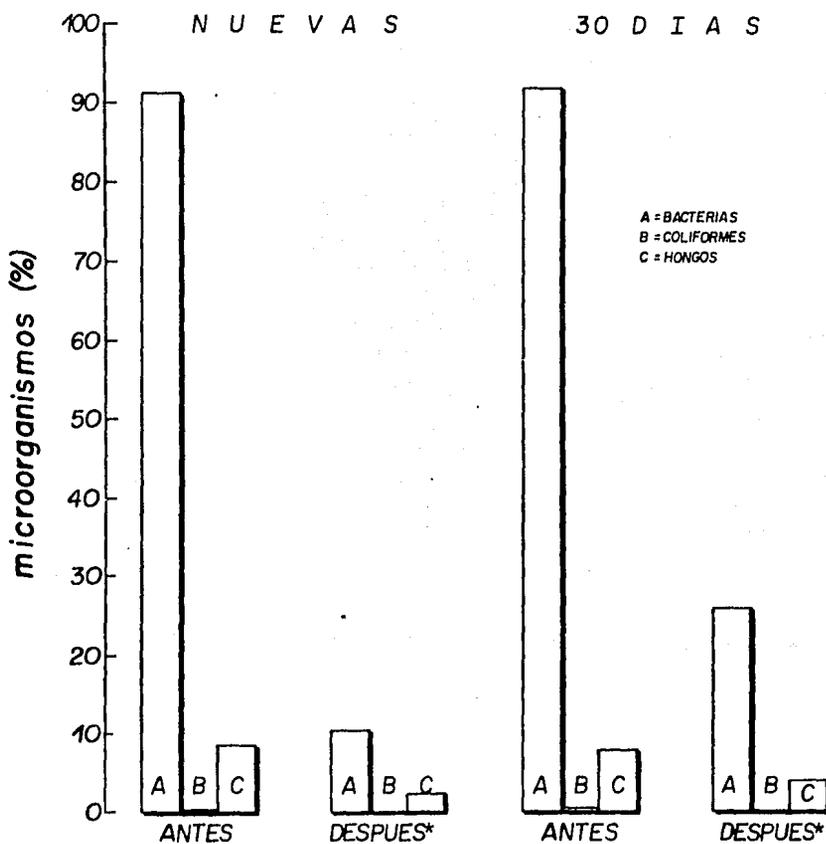


FIGURA 2 EL PORCIENTO DE LA FLORA MESOFILA PRESENTE EN ENVASES DE VIDRIO ANTES, Y DESPUES DE 30 DIAS DE USO.

* Simulación de Envasado en Caliente

residual 25.72% de bacterias, 0.135% de coliformes y 3.9% de hongos.

En la figura 3, se muestra el porciento de la flora psicrófila en envases antes, y después de 30 días de uso, con y sin simulación de envasado en caliente, encontrándose que en los envases antes de ser usados el promedio de la flora psicrófila es de 115 microorganismos por envase, existiendo 62.61% de bacterias, 37.39% de hongos; con la simulación de envasado en caliente, el promedio de la flora psicrófila se reduce el 98.76%; encontrándose en forma residual 1.034% de bacterias y 0.206% de hongos. En los envases de 30 días de uso el promedio de la flora psicrófila presente es de 147 microorganismos por envase, existiendo 90.98% de bacterias y 9.02% de hongos; con la simulación de envasado en caliente, el promedio de la flora se reduce el 97.72%, encontrándose en forma residual 2.3% de bacterias y 0.23% de hongos.

Morfología de las bacterias psicrófilas.

El tipo de crecimiento y características morfológicas se presentan en el cuadro No. 8, de las 12 cepas psicrófilas aisladas a 4°C

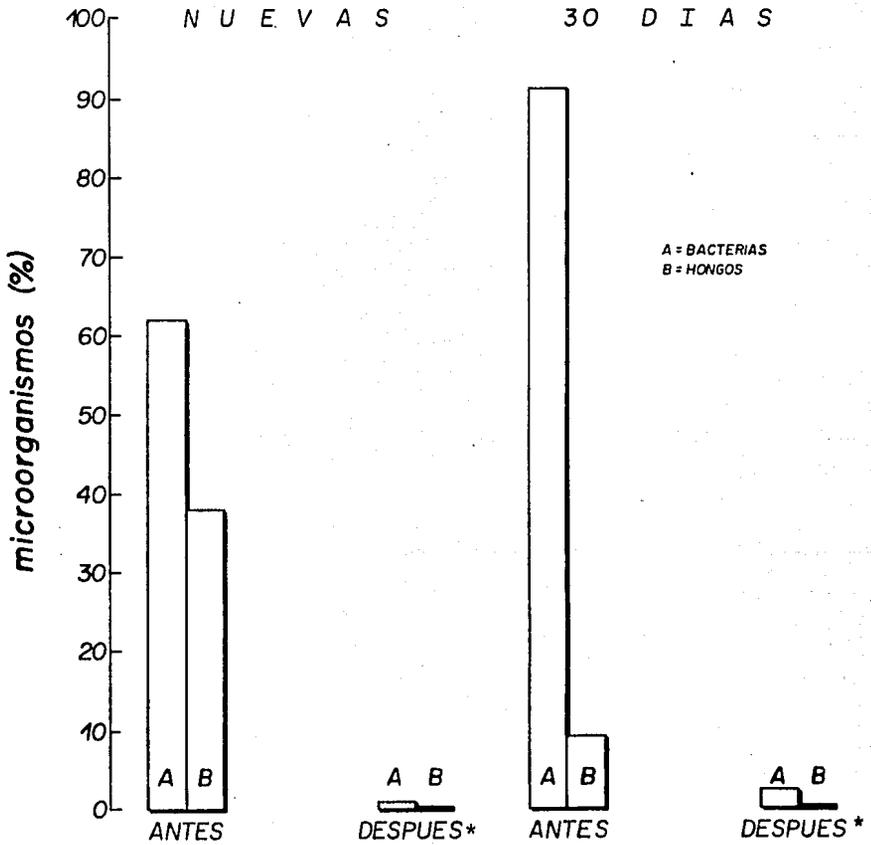


FIGURA 3 EL PORCIENTO DE LA FLORA PSICRÓFILA PRESENTE EN ENVASES DE VIDRIO ANTES, Y DESPUES DE 30 DIAS DE USO

* Simulación de Envasado en Caliente

CUADRO 8

MORFOLOGIA DE LAS COLONIAS DESARROLLADAS POR LAS CEPAS
PSICROFILAS PSICROTROFAS AISLADAS DE LOS ENVASES DE VI
DRIO

CEPA	COLOR	TIPO DE CRECIMIENTO EN EL AGAR	FORMA
M1	Crema	Sumergido	Redonda
M2	Crema	Sumergido	Redonda
M3	Crema	Sumergido	Redonda
M4	Crema	Sumergido	Redonda
M5	Crema	Superficial	Redonda
M6	Crema	Sumergido	Ovalada
M7	Crema	Sumergido	Ovalada
M8	Crema	Superficial	Redonda
M9	Crema	Superficial	Redonda
M10	Crema	Sumergido	Redonda
M11	Blanca	Sumergido	Redonda
M12	Blanca	Sumergido	Redonda

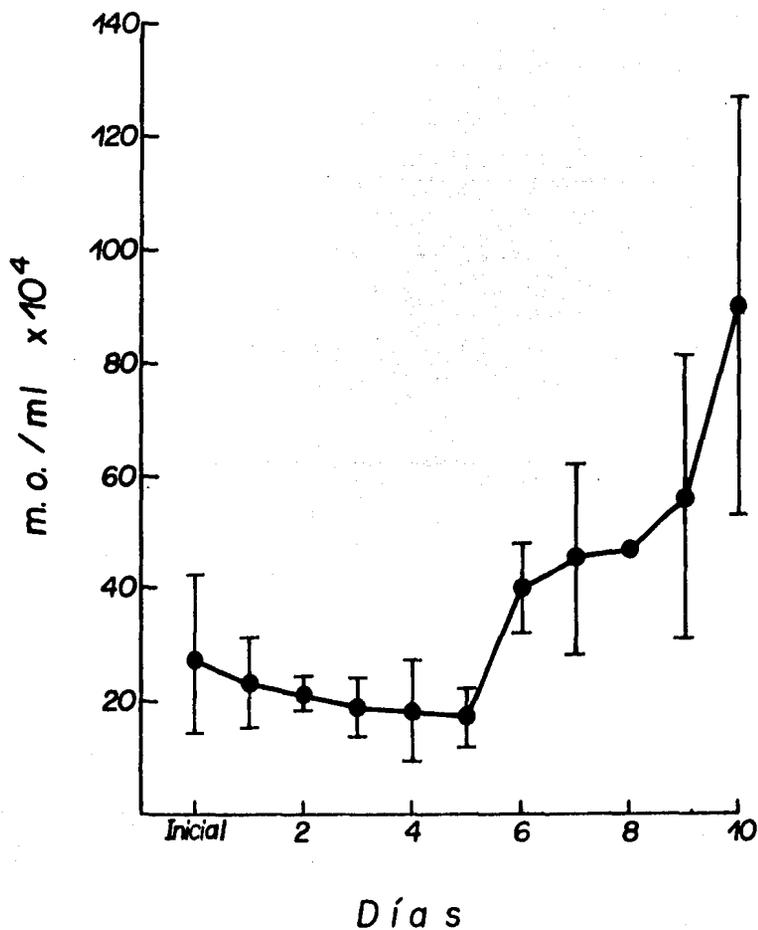
Determinación de los tiempos de duplicación a 4°C.

Los tiempos de duplicación a 4°C se pudieron determinar a 2 de las 12 bacterias psicrófilas aisladas de los envases de vidrio después de 30 días de uso.

La evolución de crecimiento de las bacterias psicrófilas se presentan en la gráfica 1 a 12. En la gráfica 1 y 2 se puede apreciar el crecimiento de dos cepas aisladas. En la gráfica 3 al tercer día decrece el número de microorganismos, en la gráfica 4 a 8, desde el segundo día existen cuentas menores de 10×10^4 microorganismos por mililitro; en la gráfica 9 y 10, de las cepas aisladas, al segundo día existen cuentas menores de 10×10^3 microorganismos por mililitro; en la gráfica 11 y 12, desde el inicio se observan que apenas si existen 10×10^2 microorganismos por mililitro, lo cual muestra la incapacidad de estas bacterias para crecer a 4°C utilizando como sustrato leche.

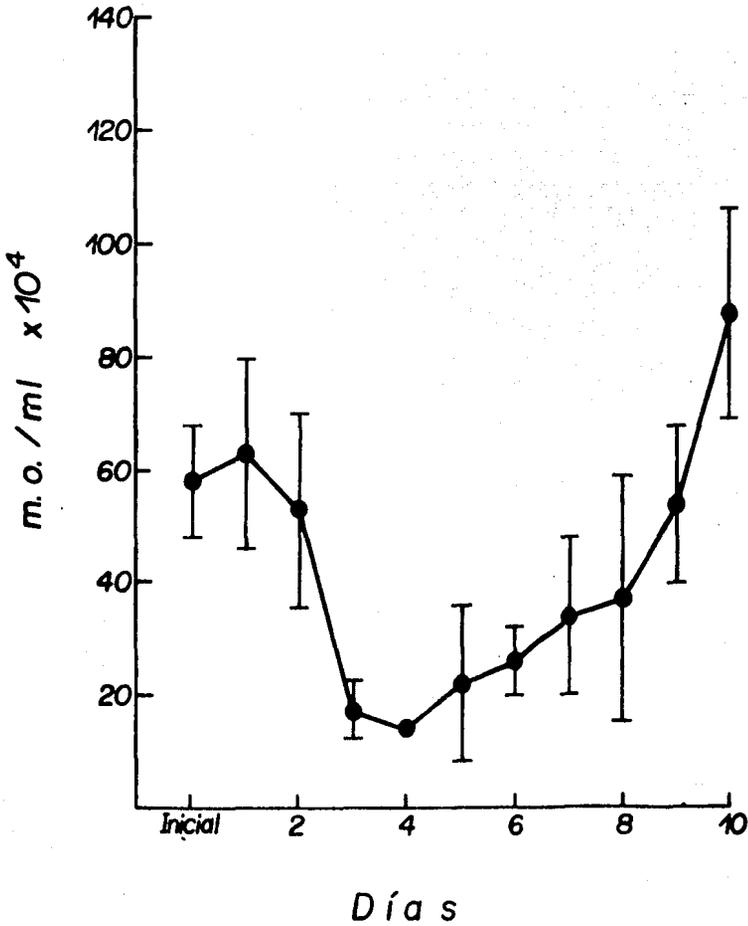
A las bacterias capaces de desarrollarse en leche a 4°C, se les determinó el tiempo de duplicación a 4°C y tiempo de reducción decimal ($D_{63^\circ\text{C}}$), siendo de :

CRECIMIENTO DE LAS CEPAS PSICROFILAS AISLADAS DE ENVASES, DESPUES DE 30 DIAS DE USO. M 9.



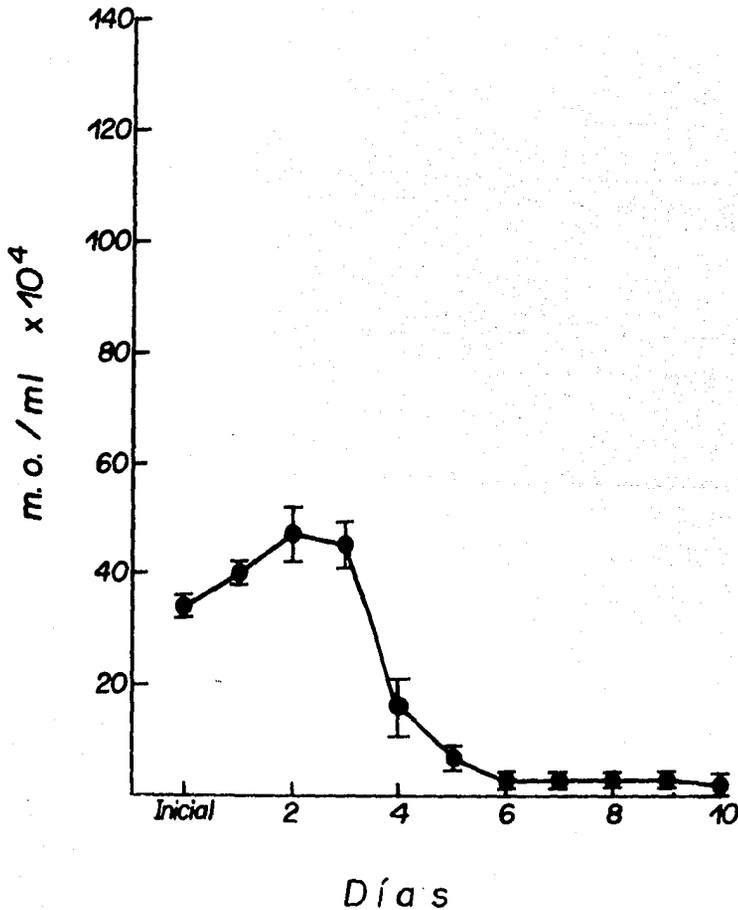
Gráfica 1. Crecimiento medido en leche descremada estéril a 4°C durante 10 días. Cada punto de la gráfica representa la media \pm D.E. de 3 determinaciones.

CRECIMIENTO DE LAS CEPAS PSICROFILAS AISLADAS DE ENVASES, DESPUES DE 30 DIAS DE USO. M 6.



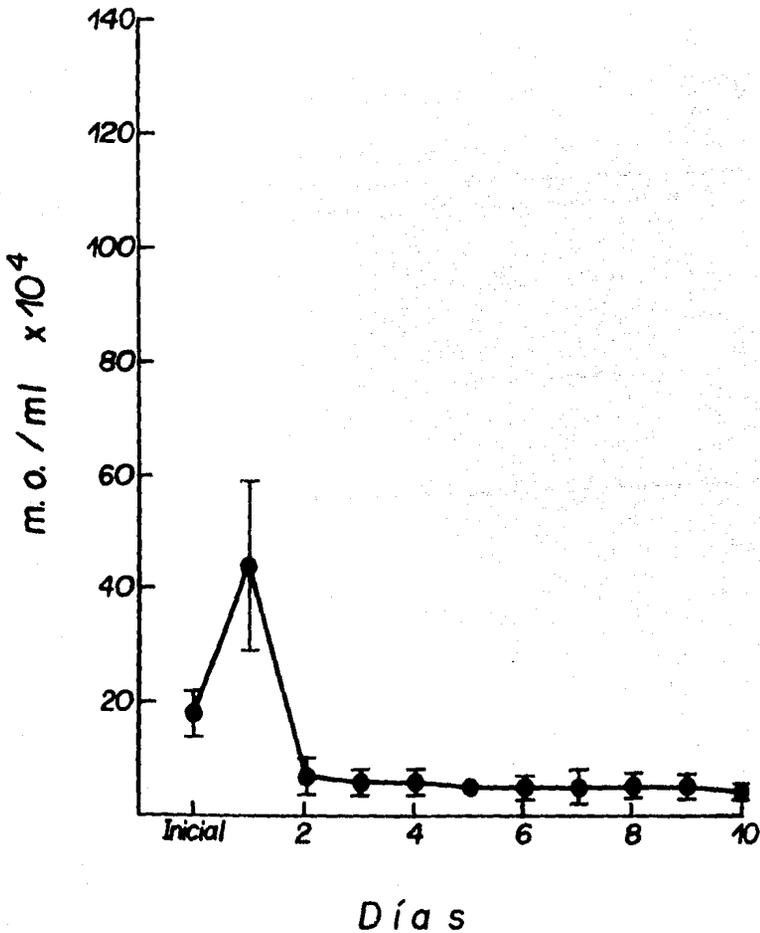
Gráfica 2. Crecimiento medido en leche descremada estéril a 4°C durante 10 días. Cada punto de la gráfica representa la media \pm D.E. de 3 determinaciones.

CRECIMIENTO DE LAS CEPAS PSICROFILAS AISLADAS DE
ENVASES, DESPUES DE 30 DIAS DE USO. M 8.



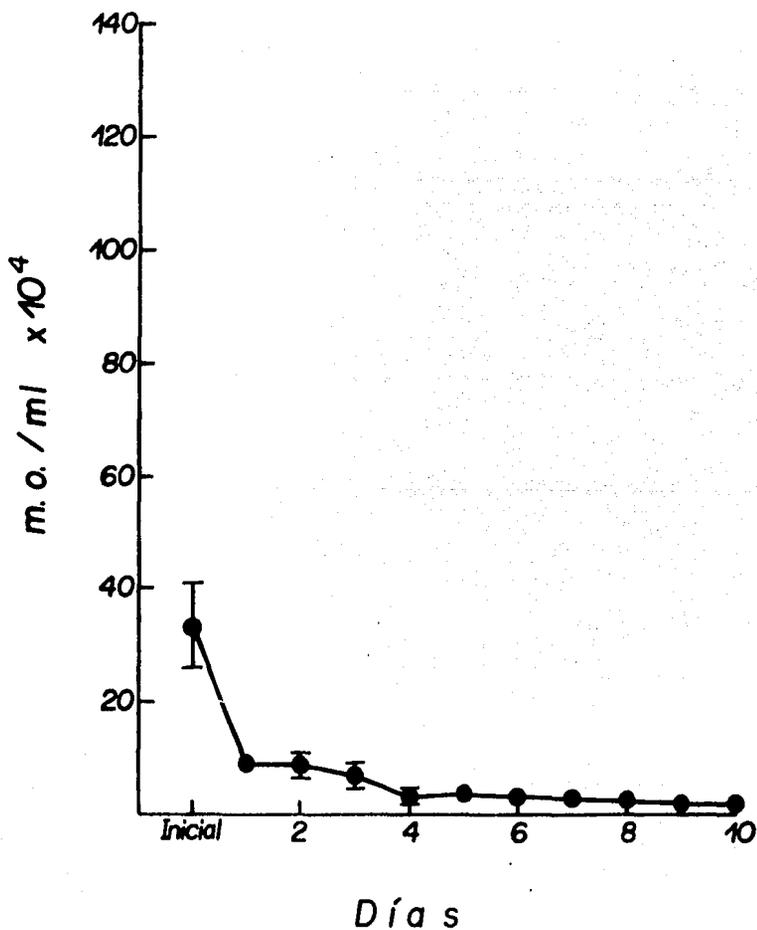
Gráfica 3. Crecimiento medido en leche descremada estéril a 4°C durante 10 días. Cada punto de la gráfica representa la media \pm D.E. de 3 determinaciones.

CRECIMIENTO DE LAS CEPAS PSICROFILAS AISLADAS DE
ENVASES, DESPUES DE 30 DIAS DE USO. M 5.



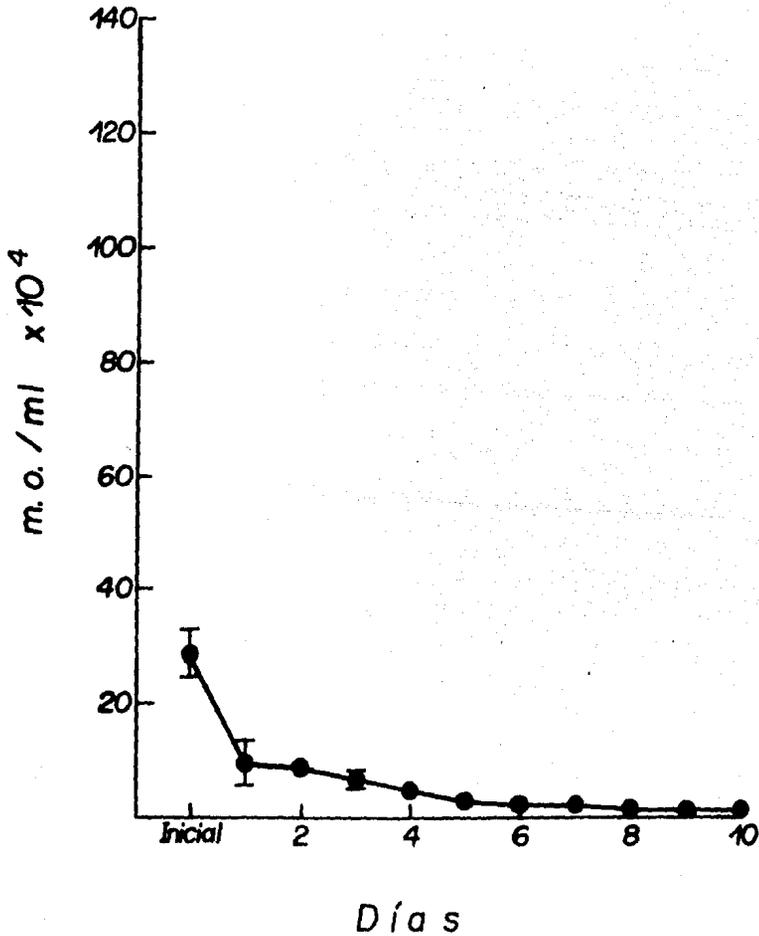
Gráfica 4. Crecimiento medido en leche descremada estéril a 4°C durante 10 días. Cada punto de la gráfica representa la media \pm D.E. de 3 determinaciones.

CRECIMIENTO DE LAS CEPAS PSICROFILAS AISLADAS DE ENVASES, DESPUES DE 30 DIAS DE USO. M 1.



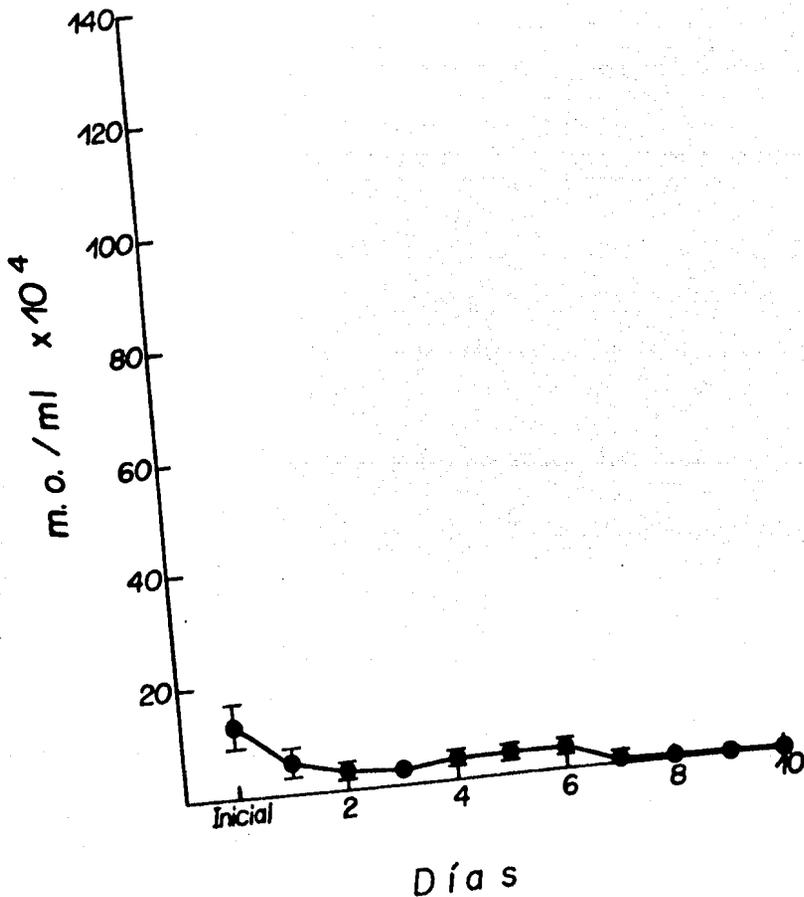
Gráfica 5. Crecimiento medido en leche descremada estéril a 4°C durante 10 días. Cada punto de la gráfica representa la media \pm D.E. de 3 determinaciones.

CRECIMIENTO DE LAS CEPAS PSICROFILAS AISLADAS DE
ENVASES, DESPUES DE 30 DIAS DE USO. M 4.



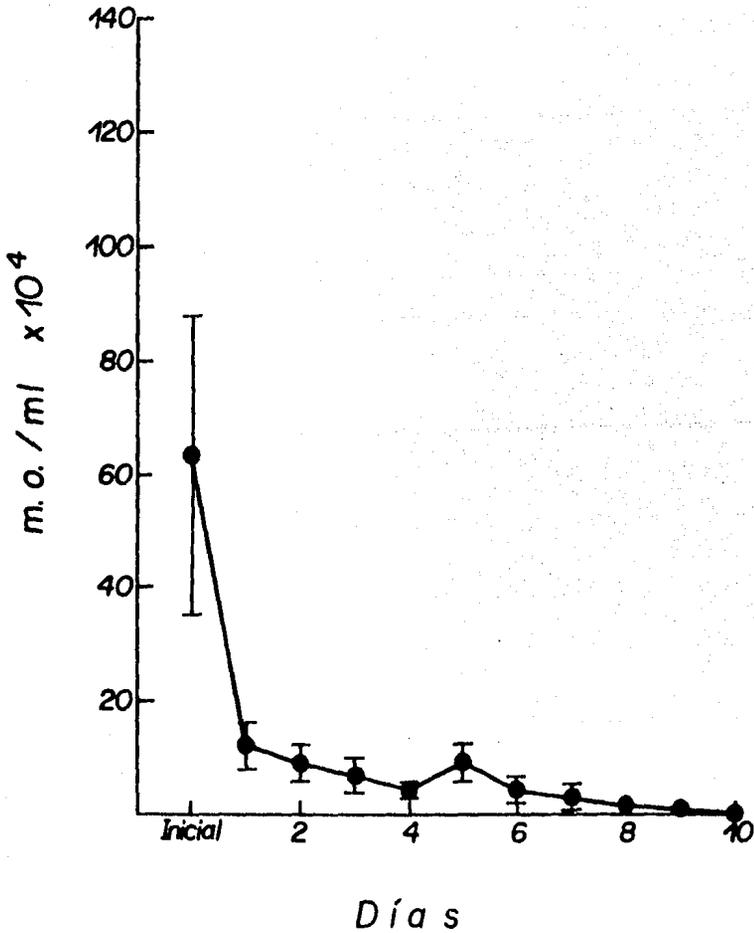
Gráfica 6. Crecimiento medido en leche descremada estéril a 4°C durante 10 días. Cada punto de la gráfica representa la media ± D.E. de 3 determinaciones.

CRECIMIENTO DE LAS CEPAS PSICROFILAS AISLADAS DE ENVASES, DESPUES DE 30 DIAS DE USO. M 7.



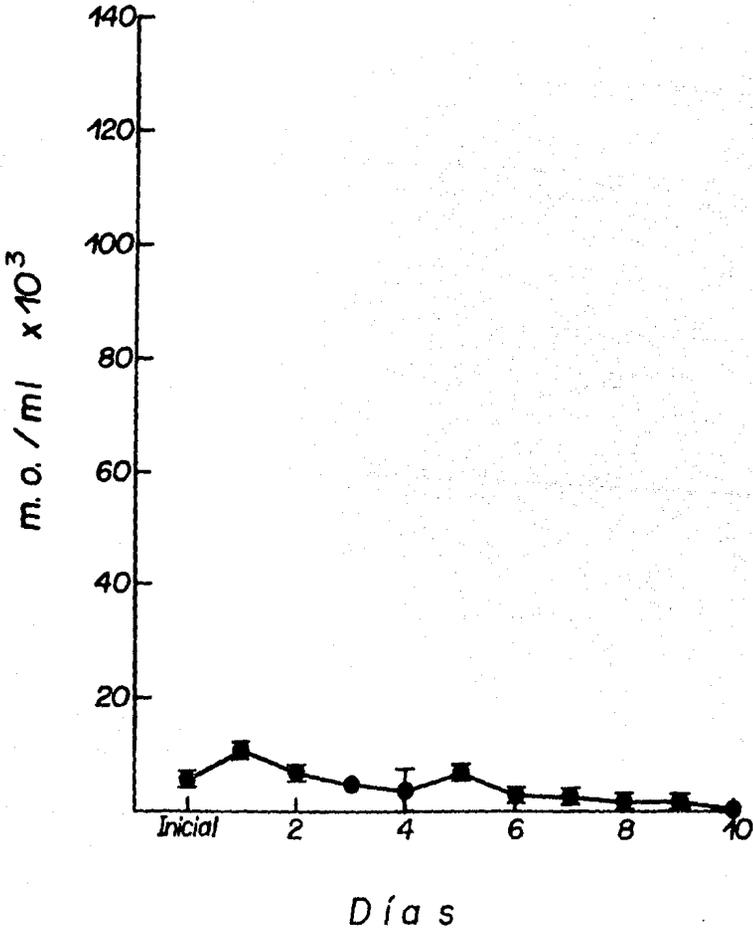
Gráfica 7. Crecimiento medido en leche descremada estéril a 4°C durante 10 días. Cada punto de la gráfica representa la media \pm D.E. de 3 determinaciones.

CRECIMIENTO DE LAS CEPAS PSICROFILAS AISLADAS DE ENVASES, DESPUES DE 30 DIAS DE USO. M 11.



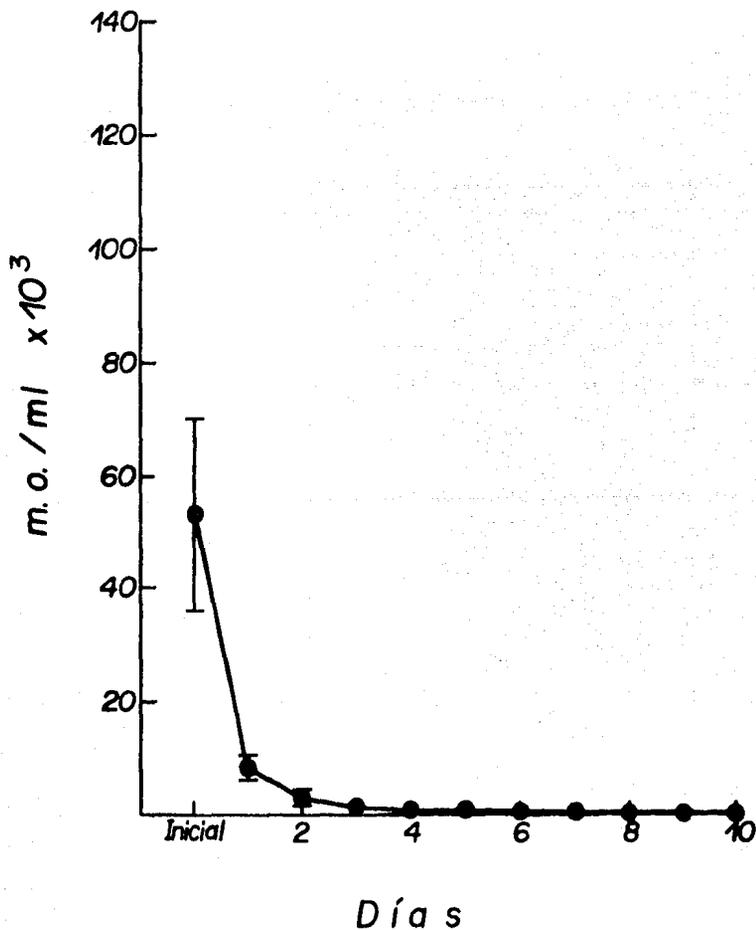
Gráfica 8. Crecimiento medido en leche descremada estéril a 4°C durante 10 días. Cada punto de la gráfica representa la media \pm D.E. de 3 determinaciones.

CRECIMIENTO DE LAS CEPAS PSICROFILAS AISLADAS DE ENVASES, DESPUES DE 30 DIAS DE USO. M 10.



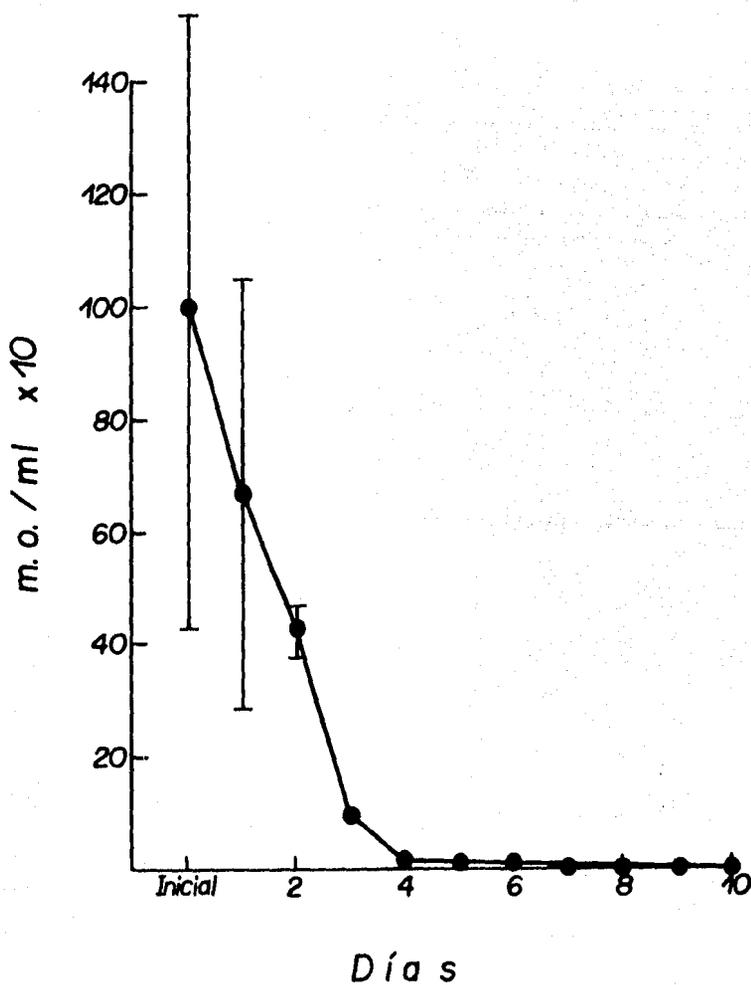
Gráfica 9. Crecimiento medido en leche descremada estéril a 4°C durante 10 días. Cada punto de la gráfica representa la media \pm D.E. de 3 determinaciones.

CRECIMIENTO DE LAS CEPAS PSICROFILAS AISLADAS DE ENVASES, DESPUES DE 30 DIAS DE USO. M 12.



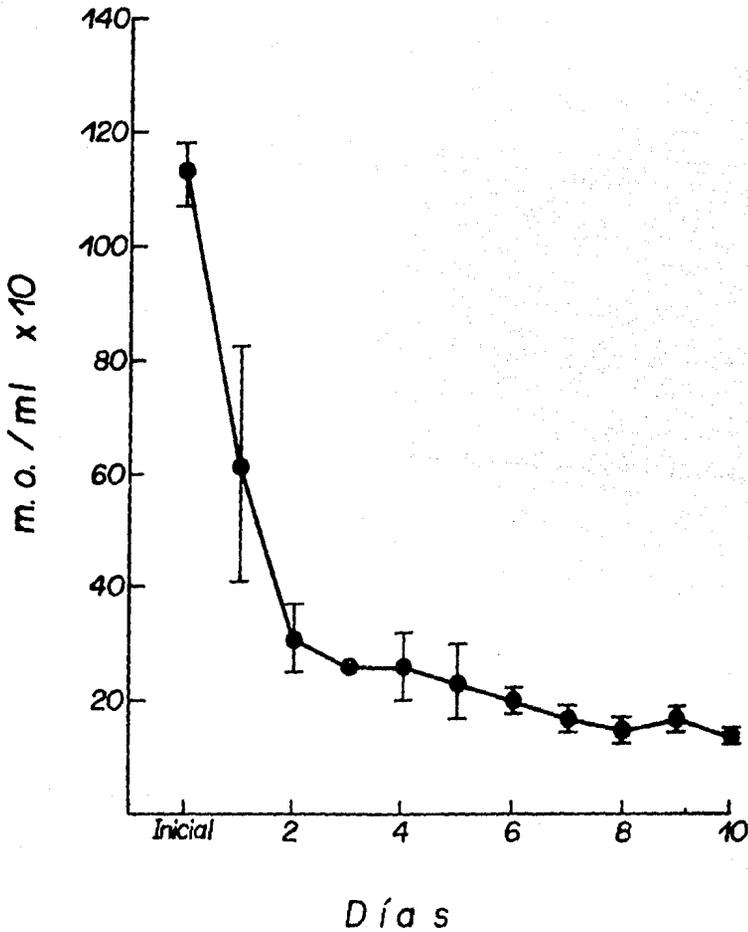
Gráfica 10. Crecimiento medido en leche descremada esterilizada a 4°C durante 10 días. Cada punto de la gráfica representa la media \pm D.E. de 3 determinaciones.

CRECIMIENTO DE LAS CEPAS PSICROFILAS AISLADAS DE ENVASES, DESPUES DE 30 DIAS DE USO. M 3.



Gráfica 11. Crecimiento medido en leche descremada estéril a 4°C durante 10 días. Cada punto de la gráfica representa la media ± D.E. de 3 determinaciones.

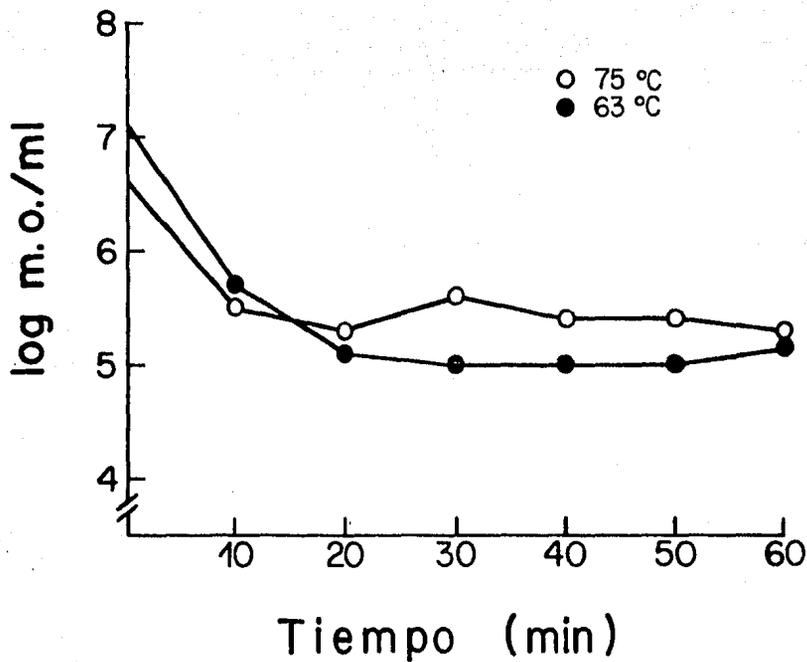
CRECIMIENTO DE LAS CEPAS PSICROFILAS AISLADAS DE ENVASES, DESPUES DE 30 DIAS DE USO. M 2.



Gráfica 12. Crecimiento medido en leche descremada estéril a 4°C durante 10 días. Cada punto de la gráfica representa la media \pm D.E. de 3 determinaciones.

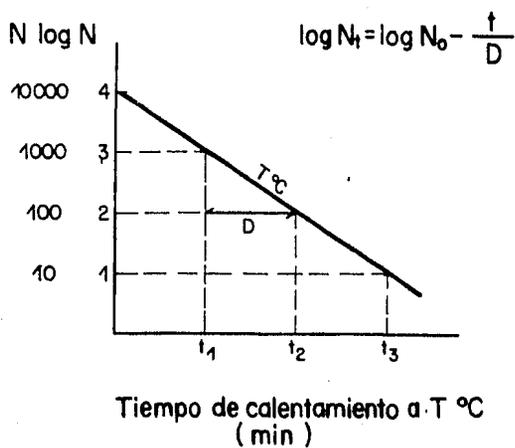
Cepa	Tiempo de Duplicación (4°C)	Tiempo de Reducción Decimal (D63°C)
M6	35.06 horas	_____
M9	34.06 horas	57.55 segundos

La cepa M6 como lo muestra la gráfica 13, durante un calentamiento a 63°C por 1 hora, a los 20 minutos un porcentaje de la población (29%) es destruida, durante los 40 minutos restantes el número de microorganismos es constante por lo cual se aumentó la temperatura siendo de 75°C, encontrándose que tienen el mismo comportamiento que a 63°C como se muestra en la gráfica 13, por lo cual no cumple la "Ley de la Destrucción térmica", ya que esta es una recta como se muestra en la figura 4. Por lo tanto se pensó: a) que existían dos poblaciones diferentes, b) la cepa es esporulada. Entonces se procedió a sembrarlas por el método de estría en 4 medios diferentes (Medio para Métodos Standar, Lee, Bilis y Rojo de Violeta, APT) encontrándose que solo existía un tipo de colonia, por lo tanto se procedió a incubarlas durante 72 horas a 29°C tomando muestras cada 12 horas. A estas muestras se les hizo cuenta microbiológica y tinción de esporas antes y después de pasteurizada, encontrándose que en las muestras tomadas cada 12 horas el número



Gráfica 13 Determinación del Tiempo de Reducción Decimal (D) a 63 y 75°C

a)



b)

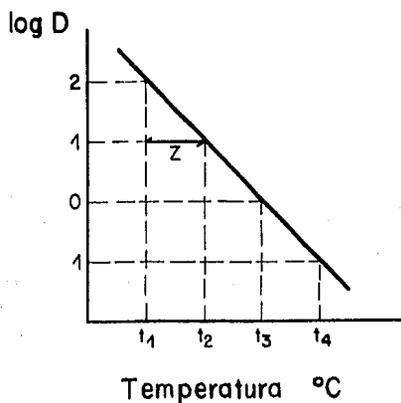
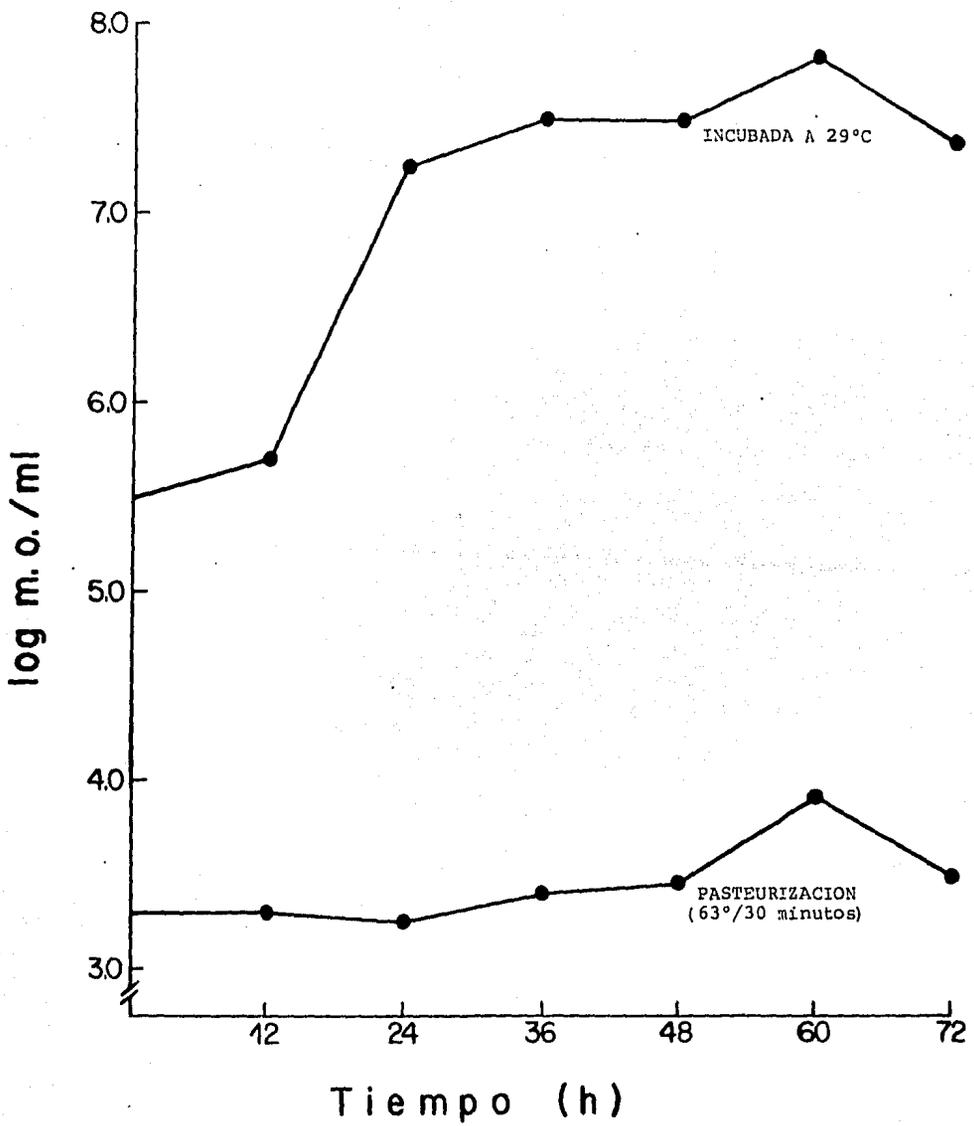


FIGURA 4 LEY DE LA DESTRUCCION TERMICA EXPRESADA COMO: a) Curva de Supervivencia, b) Curva de Tiempo de Reducción Térmica



Gráfica 14 Determinación de la Presencia de Esporas en la Cepa M6

de microorganismos que sobreviven la pasteurización, independientemente del número inicial de microorganismos, se mantiene constante como se muestra en la gráfica 14, no se identificaron esporas, por lo anterior esta bacteria es termoresistente a estas temperaturas (63 y 75°C), y no esporulada.

Moats en 1975 (33) en su investigación "Interpretation of Nonlogarithmic Survivor Curves of Heated" encontró que varios autores proponen diversas hipótesis sobre el comportamiento del tiempo de reducción decimal (D) de algunas bacterias:

a) Stumbo (1965), Rieman (1963), proponen que existe una formación de aglomeraciones de las bacterias durante el calentamiento. En base a esto se explica que al inicio de la gráfica las cuentas microbianas sean bajas, pero no debido a la mortalidad, sino a las aglomeraciones previas de las bacterias por lo que resultan cuentas erróneas.

b) Vas and Prosz (1957); Migaki and McCulloch (1949), proponen que este tipo de curvas se debe a factores fisiológicos y no genéticos ya que es característico de microorganismos tratados térmicamente de un cultivo como del subcultivo del mismo, encontrando que no existen diferencias en la termoresistencia.

c) Rahn (1945) and Schmidt (1957), propone que a concentraciones iniciales de 10^4 a 10^5 bacterias la muerte térmica de las bacterias no es verdaderamente logarítmica, por lo tanto el D calculado de la extrapolación es erróneo. Sin embargo al aumentar la concentración inicial (10^6 a 10^9 bacterias) el D calculado se acerca más al real.

d) Olson (1955), Moats (1971), propone que la muerte ocurre de la inactivación de una fracción de sitios críticos múltiples de las bacterias la cual puede reparar los daños causados durante el calentamiento y poder sobrevivir.

De acuerdo a lo anterior se propone la siguiente hipótesis: Las bacterias se pegan al vidrio y no reciben el mismo efecto de calor que las que están en contacto con el agua, por lo cual estas bacterias pueden sobrevivir. Lo que se recomienda es que al determinar el tiempo de reducción decimal además de que los tubos son sumergidos en el agua, estos estuvieran en agitación constante para que todas las bacterias recibieran el mismo efecto de calor y se pudiera comprobar si existe una destrucción térmica o es termo-resistente.

C O N C L U S I O N E S

- 1) Con el envasado en caliente se elimina entre un 70.31% y un 91.63% de la flora mesófila total de los envases de vidrio tipo "Bimbo".
- 2) Se elimina entre el 97.72% y el 98.76% de la flora psicrófila del envase.
- 3) La flora psicrófila remanente, 1 a 3 bacterias por envase, de las 12 aisladas, únicamente pudieron crecer en leche a 4°C, 2 bacterias con un tiempo de duplicación de 35 horas.
- 4) Si se tuviera una contaminación con las cepas remanente, 1 a 3 bacterias por envase. con un tiempo de duplicación a 4°C de 35 horas, la vida de anaerobio de la leche sería de 30 a 34 días.
- 5) Por lo anterior se concluye que la pasteurización de la leche inmediatamente después de la ordeña y envasada en caliente para pasteurizar el envase y mantenida en refrigeración tiene una vida de anaerobio mayor a 30 días.

B I B L I O G R A F I A

1. Alais, C. "Ciencia de la Leche" Ed. E.C.S.A. Méxi
co 1984
2. Equipo Regional de Fomento y Capacitación en Le--
chería para América Latina, "Manual de Composi---
ción y Propiedades de la Leche." FAO, 1981
3. Ensigmer, B.S. "Dairy Cattle Science" 2a Ed.
Theinterstate, Danville III, 1980
4. Oficina de Asesoría del C. Presidente, Sistema
Alimentario Mexicano, Primer Planteamiento de Me-
tas de Consumo y Estrategia de Producción de Ali-
mentos Básicos para 1981-1982 1980
5. Tablas Estadísticas de la Secretería de Agricul--
tura y Recursos Hidráulicos México 1986
6. Bachmann, M.R. "Our Industry Today: Milk Processing
in Rural Areas to Support Dairying in Developing
Countries." J.Dairy Sci 68:2134-2139(1985)
7. Roberts, T.A.; Hobbs, G. "Psichrotrophic Micro---
organisms in Spoilage and Pathogenicity" Academic
Press Britain 1981
8. Morita, R. "Psychrophilic Bacteria" Bacteriol Rev.
39(2):144-167(1975)

9. García, R.L.M. "Estudio de la Determinación Máxima de Bacterias Psicrófilas Psicrotrofas en Leche que pueden Destruirse por el Proceso de Pasteurización Tradicional" Tesis Universidad Iberoamericana México 1985
10. Cousin, M.A. "Presence and Actividad of Psychro -- trophic Microorganisms in Milk and Dairy Products" A Review J. Food Protection 45(2):172-207(1982)
11. Veisseyre, R. "Lactología Técnica" Acribia, Zaragoza España 1980
12. Collins, E.B. "Heat Resistant Psychrotrophic Micro-- organisms". J. Dairy Sci 64(1):157-160(1981)
13. Thomas, S.B.; Druce, R.G. "Psychrotrophic Bacteria in Refrigerated Milk." Dairy Ind. 34:430-433(1969)
14. Washam, C.J.; Olson, H.C.; Vedamuth, E.R. "Heat-Resistant Psychrotrophic Bacteria Isolated from Pasteurized Milk." J. Food Prot. 40:101-108(1969)
15. Mikolajcik, E.M.; Simon, N.T. "Heat Resistant Psychrotrophic Bacteria in Raw Milk and their Growth at 7 C" J. Food 41:93-95(1978)
16. Patel, G.B.; Blankenagel, G. "Bacterial counts of Raw Milk and Flavor of the Milk After Pasteurized and Storage". J. Milk Food Technol. 35:203-206 (1972).

17. Shehata, T.E.; Collins, E.B. "Sporulation and Heat Resistance of Psychrophilic Strains of Bacillus". J. Dairy Sci. 55:1405-1409(1972)
18. Coghill, D.; Juffs, H.S. "Incidencia of Psychrotrophic Spore Forming Bacteria in Pasteurized Milk and Cream Products and Effect of Temperature on their Growth Aust. J. Dairy Technol. 3:150-153 (1979)
19. Michels, M.J.M.; Visser, F.M.W. "Ocurrence and Thermo-Resistance of Sporas of Psychrophilic and Psychrotrophic Aerobic Sporeformers in Soil and Foods" J. Appl. Bacteriol. 41:1-11(1976)
20. Adams, D.M.; Barach, J.T.; Speck, M.L. "Effect of Psychrotrophic Bacteria from Raw Milk on Milk proteins and Stability of Milk Proteins of Ultrahigh Temperature Treatment". J. Dairy Sci. 59(5):823-827(1975)
21. Blankenagel, G. "Relationship between the Bacteriological Quality of Raw Milk and that of Pasteurized Milk and Cream". Invited Paper I.D.F. Symposium on Bacteriological Quality of Raw Milk Kiel 1981
22. Baker, S.K. "The Keeping Quality of Refrigerated Pasteurized Milk". The Australian J. Dairy Technology 38(3):124-127 (1983)

23. Allen, J.C.; Godfrey, J. "Deterioration of Pasteurized Milk on Storage". J. Dairy Research 52:469-487(1985)
24. Richard, J. "Observations on the Value of a Swab Technique for Determining the Bacteriological State of Milking Equipment Surfaces". J. Applied Bacteriology 49:19-27(1980)
25. Eddy, B.P. "The Use and Meaning of the Term Psychrophilic". J. Applied Bacteriology 23(2):189-196(1960)
26. Vázquez, D.N.H.; Pérez Gavilán, E.J.P. "Análisis Microbiológico de Leches Pasteurizadas" XIII Congreso Nacional de Microbiología, Guanajuato, Gto. 1982
27. García, R.L.M.; Pérez Gavilán, E.J.P. "Relación entre el Crecimiento y $D_{(63^{\circ}\text{C})}$ de las Bacterias Psicrotrofas en la Conservación de la Leche". Tecnología de Alimentos 20(4):9(1985)
28. Sokal, R. "Biometría, Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica". Ed. H. Blume Ediciones Rosario España, 1976
29. Rosell, J. "Métodos Analíticos de Laboratorio Lactológico y Microbiología de la Industria Láctea". Ed. Labor, S.A. España, 1952

30. Giono, S.C.; et al. "Manual de Laboratorio de Bacteriología Médica". 2a. Ed. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas México, 1976
31. Demeter, K.J. "Lactobacteriología". Acribia Zaragoza España, 1969
32. Moats, W.A.; Dabbah, R.; Edwards, V.M. "Interpretation of Nonlogarithmic Survivor Curves of Heated Bacteria". Journal of Food Science 36:523-26 (1971)
33. Stumbo, R.C. "Thermobacteriology in Food Processing" Second Edition, Academic Press United States of America 1973