



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

ARTÍCULO CIENTÍFICO

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD HIGIÉNICA SANITARIA DE LECHE CRUDA MEDIANTE LA PRUEBA DE LACTO FERMENTACIÓN A NIVEL DE CENTROS DE ACOPIO EN LA PROVINCIA DEL CARCHI

Autor: Mayra Anabel Pérez Lomas

Director: Ing. José País, PhD

Asesores: Dra. Lucia Yépez, MSc
Ing. Jimmy Núñez, MSc
Ing. Miguel Aragón Esparza, MSc

**IBARRA – ECUADOR
2019**

DATOS INFORMATIVOS



Apellidos: Pérez Lomas

Nombres: Mayra Anabel

Cédula: 040186853-4

Teléfono celular: 0939994486

Correo electrónico: anabelpl26@hotmail.com

Dirección: Av. Cristóbal de Troya 4-11 y Prof. Julio Miguel Paredes

Año: 2019

REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

FICAYA – UTN

Fecha: 07 de enero del 2019

MAYRA ANABEL PÉREZ LOMAS. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA DE LECHE CRUDA MEDIANTE LACTOFERMENTACIÓN A NIVEL DE CENTROS DE ACOPIO EN LA PROVINCIA DEL CARCHI/ TRABAJO DE GRADO. Universidad Técnica del Norte. Carrera de Ingeniería Agroindustrial. Ibarra. EC. ENERO 2019.

DIRECTOR: ING. JOSÉ PAÍS, PhD

La presente investigación tuvo como objetivo principal establecer una correlación entre parámetros cuantitativos que muestran la calidad de la leche, como son: el contenido de células somáticas, el contenido de bacterias totales con respecto a la prueba cualitativa de la lacto-fermentación. Se tomaron, para ello, un total de 616 muestras. Cada muestra de productor dentro de la asociación, así como, la muestra de todas las leches unidas en tina. Cada una de las muestras fue enviada al laboratorio de Agrocalidad. Adicionalmente se realizó la *prueba cualitativa de la reductasa extendida* (PRE), obteniéndose uno de los siguientes cuatro tipos de coágulos: PRE 1: gelatinoso, PRE 2: con copos, PRE 3: gaseoso y PRE 4: con copos + gaseoso. Se llegó a la conclusión que la prueba de la reductasa extendida o lacto-fermentación correlaciona cada uno de los cuatro tipos de coágulo con relación a la calidad de la leche, correspondiendo el PRE 1 - gelatinoso con leche de alta calidad, PRE 2 – con copos y PRE 3 – gaseoso con calidad intermedia y la PRE 4 – con copos + gaseoso a leche de baja calidad.



Ing. José País, PhD

Director de tesis



Anabel Pérez Lomas

Autor

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Título: EVALUACIÓN DE LA CALIDAD HIGIÉNICA SANITARIA DE LECHE CRUDA MEDIANTE LA PRUEBA DE LACTOFERMENTACIÓN A NIVEL DE CENTROS DE ACOPIO EN LA PROVINCIA DEL CARCHI

Autor: Mayra Anabel Pérez Lomas

Director: Ing. José País, PhD

RESUMEN

La calidad de la leche para uso industrial debe tener valores mínimos aceptables de contenido de proteínas, grasa, sólidos totales, y contenidos máximos de bacterias totales y células somáticas. Los ensayos para determinar estos parámetros se realizan en laboratorios acreditados. Las asociaciones ganaderas agrupan a ganaderos individuales de las zonas rurales y se localizan lejos de estos laboratorios. Se muestreó durante 8 meses consecutivos a seis asociaciones ganaderas. Se tomaron 616 muestras, a las que se le determinó: porcentaje de sólidos totales (%ST), proteína total, grasa, acidez, prueba de la reductasa y densidad; así como, contenido de bacterias totales (CBT, cel/ml) y células somáticas (CCS, cel/ml). Adicionalmente, se le realizó a cada muestra la prueba de la lactofermentación (LF) (10 ml de muestra, se incubaron a 37°C por 24 h, con 0.5 ml de azul de metileno). Como resultado de esta prueba se produce un coágulo que puede ser clasificado en una de las siguientes cuatro categorías: coágulo gelatinoso (normal), con

copos, gaseoso y con copos + gaseoso. Del total de muestras, el 43.3% clasificó como coágulo normal, el 21.8% como coágulo con copos, el 18.7% como coágulo gaseoso y el resto (16.2%) como coágulo con copos + gaseoso. De las muestras que presentaron coágulo normal, el 95% presentó valores de CBT y CCS que la ubican como leche de primera calidad ($CBT \leq 300 \times 10^3$ cel/ml y $CCS \leq 300 \times 10^3$ cel/ml), mientras que, el 5% tuvo valores de uno de los parámetros que superaba ligeramente el valor umbral de calidad. Las muestras que presentaron coágulo con copos cumplían con el umbral de primera calidad de CBT, sin embargo, excedían los valores permitidos de CCS, mientras que, las de coágulo gaseoso cumplen con los valores de CCS, pero sobrepasan los límites aceptables de CBT. Por último, las muestras con coágulos con copos + gaseosos, sobrepasan ampliamente los valores permitidos de CBT y CCS. Se demostró, por tanto, que la prueba de la lactofermentación ofrece información certera de la calidad microbiológica de la leche, sin

embargo, las características físico-químicas de la leche no afectan el tipo de coágulo formado. Adicionalmente, esta prueba es barata (0.46 USD/muestra (LF) vs 9.53 USD/muestra (laboratorio)), fácil de realizar y rápida (1 día (LF) vs 3 días (laboratorio)); y puede ser implementada por las asociaciones para autoevaluar la calidad microbiológica de la leche, tanto de los ganaderos individuales, como de toda la asociación.

Palabras claves: Calidad microbiológica de la leche, Prueba de lactofermentación, Contenido de bacterias totales, Contenido de células somáticas.

SUMMARY

The quality of milk for industrial use should have minimum acceptable values of protein content, fat, total solids, and maximum contents of total bacteria and somatic cells. The tests to determine these parameters are carried out in accredited laboratories. The livestock associations' group individual farmers in rural areas, which are located far from these laboratories. A total of six livestock associations were sampled during 8 consecutive months. 616 samples were taken, in which were determined: percent of total solids (%ST), total protein, fat, acidity, reductase and density; as well as, total bacterial counts (TBC, cells/mL) and somatic

cell counts (SCC, cells/mL). Additionally, each sample was tested for lactofermentation (LF) (10 mL of sample, incubated at 37°C for 24 h, with 0.5 mL of methylene blue). As a result of this test, a clot is produced that can be classified into one of the following four categories: gelatinous (normal), flaky, gaseous, and flaky + gaseous. Of the total samples, 43.3% classified as a normal clot, 21.8% as a clot with flakes, 18.7% as a gaseous clot and the rest (16.2%) as clot with flakes + gas. Of the samples that presented normal clot, 95% presented values of TBC and SCC that place it as first quality milk ($TBC \leq 300 \times 10^3$ cells/mL and $SCC \leq 300 \times 10^3$ cel/ml), while, 5% had values of one of the parameters that slightly exceeded the quality threshold value. The samples that presented coagulum with flakes fulfilled the threshold of first quality of TBC, however, exceeded the allowed values of SCC, while those of coagulum gaseous comply with the values of SCC, but exceed the acceptable limits of TBC. Finally, the samples with clots with gaseous + flakes, widely exceed the allowed values of TBC and SCC. It was demonstrated, therefore, that the lactofermentation test offers accurate information on the microbiological quality of the milk; however, the physical-chemical characteristics of the milk do not affect the type of clot formed. Additionally, this test is cheap

(0.46 USD/sample (LF) vs 9.53 USD/sample (laboratory)), easy to perform and fast (1 day (LF) vs 3 days (laboratory)); and can be implemented by associations to self-assess the microbiological quality of milk, in

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador se producen diariamente alrededor de 5.5 millones de litros de leche y su producción ha ido en aumento sostenido en los últimos años (Real, 2013). Alrededor del 75% de dicha producción se realiza en la región andina, de esta, gran parte es producida por pequeñas asociaciones de campesinos ganaderos, localizados en la serranía y alejados de los grandes centros urbanos.

La calidad microbiológica de la leche es esencial para garantizar la calidad de los productos lácteos. La salud de la masa ganadera, combinada con las buenas prácticas de manejo y ordeño garantizan esta calidad. De manera casi unánime los productores de lácteos comprueban esta calidad a través de la medición de la carga microbiana total, el contenido de células somáticas y la prueba de reducción del azul de metileno [3].

Sin embargo, dichas pruebas son, como norma, realizadas en laboratorios debidamente acreditados, localizados en las zonas urbanas, alejados de los pequeños productores

both; individual farmers, and the entire association.

Keyword: Microbiological quality of milk, lactofermentation test, total bacterial counts, somatic cell counts.

serranos y sus asociaciones. Este inconveniente, trae como consecuencia elevados costos y que los resultados tarden en conocerse por los interesados en mantener e incrementar la calidad microbiológica de la leche.

OBJETIVOS

El objetivo de esta investigación fue evaluar durante 8 meses (desde octubre 2017 hasta mayo 2017) el comportamiento de la calidad de la leche de un grupo de asociaciones de campesinos ganaderos de la provincia del Carchi, Ecuador; y sugerir una metodología barata, rápida y confiable que les permitiera a las asociaciones evaluar *in situ* la calidad microbiológica de su leche.

MARCO TEÓRICO

La leche es un producto excepcional para la alimentación. La humanidad ha adoptado a la leche, especialmente la proveniente del ganado bovino, como alimento para todas las edades (Singh & Bennett, 2002). Entre los derivados más consumidos por la humanidad están el queso, yogurt, mantequilla, etc. (Torres, 2009).

Calidad Composicional Fisicoquímica de la Leche

La leche es una sustancia coloidal formada por distintos componentes químicos: proteínas, grasas, azúcares, vitaminas y minerales (Gigli, 2014).

Tabla 1 Composición de la leche de vaca

Composición %	
Agua	87.0
Grasa	4.0
Proteína	3.5
Lactosa	4.7
Ceniza	0.8

Fuente: Eidualimentaria, 2015

Calidad Microbiológica

La calidad microbiológica de la leche se refiere a la cantidad y tipo de bacterias presentes en la leche como consecuencia del manejo durante el ordeño.

La leche cruda puede considerarse un producto vivo, ya que contiene un gran número de microorganismos por mililitro; esto es lo que se denomina carga microbiana (Gante, 2004).

Entre los microorganismos presentes en la leche están los estreptococos, lactobacilos y bacterias patógenas.

Conteo Bacteriano Total

El conteo bacteriano total (CBT) de una leche es indicativo, entre otros, del estado de salud del rebaño, de la calidad higiénico-sanitaria de la granja (por ejemplo, limpieza del equipo de ordeño) y la temperatura de almacenamiento de la leche en la granja (Berry, 2006).

AGROCALIDAD maneja una tabla de rangos para determinar la calidad de leche por Conteo Bacteriano Total.

Tabla 2 Rangos de Calidad de Leche por CBT

Rangos de calidad de leche por CBT (cel/ml)		
Calidad alta	Calidad media	Calidad baja
$CBT \leq 300 \times 10^3$	$300 \times 10^3 > CBT \geq 600 \times 10^3$	$CBT > 600 \times 10^3$

Fuente: (AGROCALIDAD, Mapas Calidad de Leche Cruda, 2016)

Conteo de Células Somáticas

El contenido de células somáticas (CCS) de la leche es un factor que ayuda a conocer el estado sanitario de la ubre de la vaca (Kleinschroth, 1991).

La mastitis bovina es una de las enfermedades más importantes que atacan al ganado vacuno y que afecta económicamente a los hatos lecheros. Elevados valores de CCS, son un indicador confiable de la salud de la ubre y como consecuencia, de la posterior calidad de la leche (Bradley & Green, 2005) Por lo tanto, elevados valores de CCS reducen el precio de comercialización de la leche (Olguín, 2017). La leche normal proveniente de cuartos sanos generalmente contiene menos de 300×10^3 cel/ml. Valores de células somáticas por encima de $300\,000$ cel/ml es un indicador de la inflamación y enfermedad de la ubre (Romero, 2016).

Tabla 3 Rangos de Calidad de leche por CCS

Rangos de calidad de leche por CCS (cel/ml)		
Calidad alta	Calidad media	Calidad baja
$CCS \leq 300 \times 10^3$	$300 \times 10^3 > CCS \geq 700 \times 10^3$	$CCS > 700 \times 10^3$

Fuente: AGROCALIDAD, 2016

Prueba de la Reductasa

La prueba de reducción de azul de metileno indica la variación de potencial de óxido reducción en la leche por cambios en la tonalidad del colorante en solución, dependiendo de la actividad reductora de los microorganismos y de las sustancias reductoras presentes en la leche. La reductasa es una enzima que reduce el azul de metileno. Cuantos más microorganismos contenga la leche, antes se decolora el azul de metileno; la temperatura óptima para reducción por la reductasa es entre 37 y 38°C.

Tabla 4 Rangos de calidad para la prueba de la reductasa.

	Calidad alta	Calidad media	Calidad baja
Prueba de la Red. de azul metileno (TRAM), h	$t_{TRAM} > 5$ Excelente	$3 < t_{TRAM} \leq 5$ Buena $1 < t_{TRAM} \leq 3$ Aceptable	$t_{TRAM} < 1$ No apta

Prueba de Lacto-fermentación

Una manera barata, fácil y práctica para detectar problemas de calidad higiénica-sanitaria de la leche es la prueba de lacto-fermentación (Dilanjan, 1984) o prueba de reductasa extendida (PRE). La lacto-

fermentación se realiza a continuación de la prueba de reductasa. Primero se determina el tiempo de decoloración del azul de metileno y luego se dejan los mismos tubos en el baño maría o incubadora a 37°C por 24 h hasta que se produzca la coagulación de la leche (Dubach, 1988).

Esta prueba cualitativa se basa en el tipo de coagulación que sufre la leche bajo la influencia de los microorganismos que contiene (Gerber, 1994) y permite conocer los rangos de valores de la carga microbiana presente en la leche.

De acuerdo a los resultados de esta prueba se clasifica de la siguiente manera:

Coagulación Homogénea y

Gelatinosa

Leche líquida o coagulada de forma homogénea y gelatinosa. Sabor claramente ácido, escasa o inexistente separación de suero lácteo (Dubach, 1988). Se debe al desarrollo y actividad de las bacterias acidolácticas (BAL) que existen normalmente en la leche (Gerber, 1994). Es una leche apta para la producción de quesos.

Según Dubach (1998), si la leche no coagula y se retrasa la reducción del azul de metileno se puede sospechar de la presencia de antibióticos en la leche, como consecuencia del tratamiento veterinario y en este caso

se considera la leche como no apta para quesería.

Coagulación en Copos

Coagulación en copos o con grumos, con notable exudación de suero; no hay desprendimiento de gas y el coágulo está destrozado (Dubach, 1988).

Los agentes que permiten la coagulación en gránulos son una asociación de los lactococos ordinarios en la leche (Gerber, 1994).

Coagulación Gaseosa

La coagulación con gas, sustancia caseosa muy desgarrada y pendiente de la pared del tubo de ensayo, coágulo flotante y haciendo predominancia por encima del borde (Dubach, 1988).

Las temperaturas próximas a 40°C son favorables para el desarrollo de las bacterias responsables de la hinchazón, entre las que dominan el grupo coliforme y particularmente *Escherichia coli* y otros géneros como *Aerobacter spp.* (Gerber, 1994).

Coagulación Gaseosa y Con Copos

Coagulación granulosa y acentuada separación de suero; coagulación gaseosa y burbujas, con actividad de gérmenes gasógenos del grupo coliforme.

METODOLOGÍA

El estudio involucró 6 Asociaciones, con una masa ganadera de 814 vacas lecheras. Se tomaron, para ello, un total de 616 muestras. Cada muestra de productor dentro de la asociación, así como, la muestra de todas las leches unidas, permitió juzgar, no solo la calidad de la leche de asociación, sino también la calidad de cada productor y como esta última contribuye o afecta la calidad de toda la asociación. Cada una de las muestras fue enviada al laboratorio de Agrocalidad de Tumbaco (Pichincha, Ecuador), debidamente acreditado por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca del Ecuador, donde se evaluó su calidad microbiológica contabilizando la carga total microbiana (CBT, cél./ml), las células somáticas (CCS, cél./ml) y la prueba de reducción del azul de metileno (TRAM, h).

Adicionalmente se realizó la *prueba cualitativa de la reductasa extendida* (PRE), la cual se realiza de manera similar a la prueba de reducción del azul de metileno, pero extendiendo la prueba por 24 h, y obteniéndose al cabo de ese tiempo, uno de los siguientes cuatro tipos de coágulos: PRE 1: gelatinoso, PRE 2: con copos, PRE 3: gaseoso y PRE 4: con copos + gaseoso.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

La calidad microbiológica de la leche de las seis asociaciones evaluadas muestra que solo la Asoc. “20 de Marzo” logró mantener, sostenidamente, durante los 8 meses evaluados los parámetros de alta calidad de su leche, lo cual hace que sea apta para la producción de cualquier producto lácteo (Figura 1).

La Asoc. “Progresista Mirador” tuvo períodos en que su leche tuvo categoría de alta calidad y otros en que cayó a calidad intermedia, lo que denota cierta inconsistencia en los controles de calidad, mientras que el resto de las asociaciones presentan problemas asociados a la calidad microbiológica de la leche lo que denota un pobre cumplimiento de las buenas prácticas de manejo y ordeño (Figura 1).

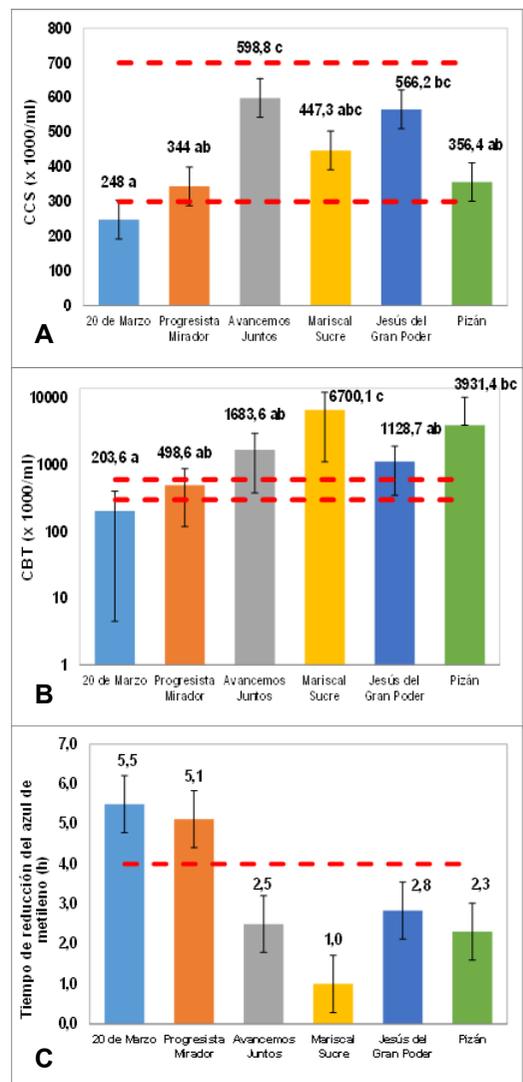


Figura 1. Promedio de las características higiénico-sanitarias de la leche por asociación (A) CCS (x 10³ cel/ml); (B) CBT (x 10³ cel/ml); (C) Prueba de la reductasa. Leyenda: la línea discontinua roja inferior indica el valor mínimo que exige la norma INEN, y la línea superior indica el límite entre la calidad intermedia y la de calidad pobre, según la norma INEN. Letras iguales denotan que no existen diferencias significativas (p > 95%) entre los valores medios comparados.

Al comparar los resultados rigurosos de los conteos de CBT y CCS, y el TRAM, con la prueba de la reductasa extendida (PRE), se observa una

excelente correlación. Cuando la PRE corresponde con un coágulo homogéneo y gelatinoso (PRE 1) en >95% de los casos corresponde con leche de calidad alta, la calidad media corresponde con la PRE de coágulo heterogéneo grumoso (PRE 2) y coágulo heterogéneo gaseoso (PRE 3), mientras que, la calidad baja de la leche correspondió a una PRE de coágulo heterogéneo grumoso + gaseoso (PRE 4) (Figura 2).

La PRE muestra así una correspondencia con los análisis rigurosos realizados. Esta prueba cualitativa puede ser fácilmente implementada en las asociaciones ganaderas, sólo se requiere un baño termostático, tubos de vidrio y el reactivo de azul de metileno. Adicionalmente, ésta prueba es más barata (0.46 vs 9.53 US\$/muestra) y sólo tarda 24 h, contra la demora de unos tres días de espera para los análisis tradicionales (Figura 3).

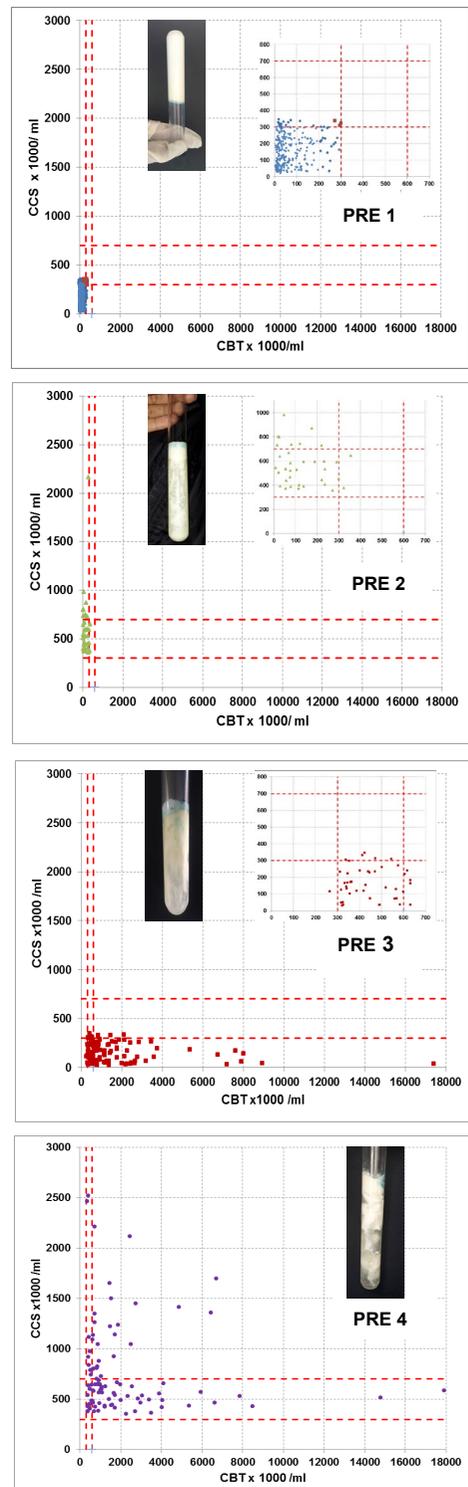


Figura 2. Tipos de coágulo según CBT y CCS: (PRE 1) coágulo gelatinoso, (PRE 2) coágulo con copos, (PRE 3) coágulo gaseoso, (PRE 4) coágulo con copos y gaseoso.

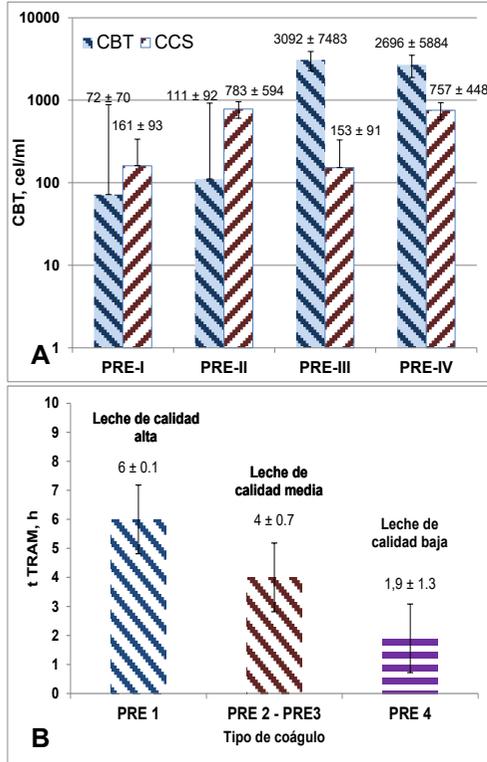


Figura 3. (A) Promedio de CBT Y CCS **(B)** Tiempo promedio de reducción de azul de metileno. PRE1: coágulo gelatinoso, PRE2 – PRE3: coágulo con copos y gaseosa, PRE4: coágulo con copos + gaseoso.

CONCLUSIONES

Se logra producir leche de buena calidad higiénica sanitaria realizando pruebas de plataforma al momento de recepción de la leche en los Centros de Acopio y aplicando acuerdos de

BIBLIOGRAFÍA

- AGROCALIDAD. (2016). *Mapas Calidad de Leche Cruda*. Quito.
- Agudelo, A. (2005). *Composición Nutricional de la Leche de*

rechazo de leche por mastitis, estabilidad proteica (prueba de alcohol) y pruebas de la reductasa como lo demuestra los positivos resultados obtenidos en este trabajo por la Asoc. “20 de Marzo”. Adicionalmente, la prueba de la reductasa extendida (PRE) o lactofermentación, es un procedimiento válido para el análisis de calidad higiénica- sanitaria de la leche cruda ya que ofrece múltiples ventajas, entre las más importantes, su bajo costo, es reproducible y confiable, es una prueba visual con resultados sencillos de interpretar, es de fácil realización en los centros de acopio y permite la implementación de medidas correctivas a cualquier falencia de los productores de las asociaciones.

RECOMENDACIONES

Los centros de acopio de leche deben capacitar periódicamente a los productores para el mejoramiento continuo de la calidad higiénica-sanitaria, es recomendable que dichas capacitaciones estén establecidas mediante un calendario.

Ganado Vacuno. *Lasallista de Investigación*.

- Anónimo. (2003). *Introducción al Control de calidad de Leche Cruda*. Maracaibo.

- Bobbo, T. (2016). The nonlinear effect of somatic cell count on milk composition, coagulation. *American Dairy Science Association*, 16.
- Bradley & Green . (2005). Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. <https://doi.org/10.1136/inpract.27.6.310>, 2.
- Butendieck, N. (2016). Células Somáticas, Mastitis y Calidad de Leche . *CIR - Carrilanca* , 16.
- Bylund, G. (1995). *Dairy Processing Handbook*. LP Grafiska AB.
- Castellanos, A. (2010). *Bovinos Productores de Leche y Carne*.
- Celik, S. (2003). Beta-Lactoglobulin genetic variants in Brown Swiss breed and its association with compositional properties and rennet clotting time of milk. *International Dairy Journal* .
- Chandan. (2013). *Manufacturing Yogurt and Ferment Milks*.
- D. P. Berry. (2006). Temporal Trends in Bulk Tank Somatic Cell Count and Total Bacterial. *American Dairy Science Association*.
- Dilanjan. (1984). *Fundamentos de la Elaboración del Queso*. Zaragoza: Acibia.
- Fox. (1996). *Cheese: Physical, Biochemical, And Nutritional Aspects*. Cork.
- Fuentes, A. (2014). Determinación de la calidad higiénica de la leche mediante la medición indirecta del tiempo de reducción del azul de metileno o prueba de la reductasa microbiana. *Universidad Politécnica de Valencia*.
- Gante, A. V. (2004). *Tecnología quesera*. Trillas.
- Gerber. (1994). *Tratado Práctico de los Análisis de la Leche y del Control de los Productos Lácteos*. Madrid: Santander.
- Hazard, S. (2017). Variación de la Composición de la Leche . *CRI - Carrilanca*, 33.
- INIFAP. (2011). *Mejora Continua de la Calidad Higiénico - Sanitaria de la leche de Vaca*. México.
- Kleinschroth, E. (1991). *Mastitis*. España: SALIMGRAF, S.A.L.
- Martegani, H. (2017). Leche como materia prima para la elaboración de quesos. *Portal Lechero*.
- Martinez, M. (2014). *Calidad Composicional e Higiénica de Leche Cruda Recibida de en Industrias Lácteas de Sucre, Colombia*. Manizales .
- Ministerio de Protección Social Colombia. (2006). *Resolución 616: Por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se comercializa expenda, importe o exporte en el país*. Colombia.
- NTE INEN 9. (2015). *Leche Cruda. Requisitos*.

Romero, A. R. (2016). Mastitis Bacteriana En Ganado Bovino: Etiología Y Técnicas De Diagnóstico.

Singh & Bennett. (2002). Milk and Milk Processing. En R. Robinson, *The Microbiology of Milk and Milk Products*. New York: Wiley.

Tellez, G. (2005). *La Calidad Como Factor De Competitividad En La*

Cadena Láctea. Colombia: Ediciones Hispanoamericanas.

Wedholm, A. (2006). Effect of protein composition on the cheese-making properties of milk from individual dairy cows. *Journal Dairy Science*.