



ARTÍCULO ORIGINAL

Efectos de *Bacillus* spp. y su actividad Metabólica sobre la calidad de la leche entera

Effects of *Bacillus* spp. and Its Metabolic Activity on the Quality of Whole Milk

Autores: Noelia Lessandra Moncada Núñez, Andrea Guadalupe Santos Tellez, Ligia Elizabeth Luna y Luis Maldonado

Efectos de *Bacillus* spp. y su actividad Metabólica sobre la calidad de la leche entera

Effects of *Bacillus* spp. and Its Metabolic Activity on the Quality of Whole Milk

Autor: 1. Noelia Lessandra Moncada Nuñez (ORCID: 0009-0002-5995-3407)

2. Andrea Guadalupe Santos Tellez (0009-0008-4607-6402)

3. Ligia Elizabeth Luna (ORCID: 0000-0002-2568-714X)

4. Luis Maldonado (ORCID: 0000-0003-0796-1288)

Sobre el autor: Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras

Información del manuscrito: Recibido/Received: 30-10-24

Aceptado/Accepted: 2-12-24

Contacto de correspondencia: noelia.moncada@est.zamorano.edu

Teléfono: (+504) 9809 - 8774

Resumen

Introducción: La refrigeración de la leche ralentiza el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, pero no previene la proliferación de bacterias psicrotróficas, como *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp., que prosperan a temperaturas inferiores a 7 °C. Estas bacterias producen enzimas que aceleran el deterioro de la leche, afectando su calidad y la de sus derivados. El objetivo del presente estudio fue evaluar como el retraso en la pasteurización impacta la calidad de la leche mediante la dinámica microbiana y los cambios fisicoquímicos durante el almacenamiento refrigerado. **Metodología:** Se analizaron las poblaciones de bacterias psicrotróficas y se midieron parámetros fisicoquímicos como acidez titulable (ATECAL), viscosidad y degradación de proteínas. Las muestras fueron recolectadas en siete intervalos: 0, 1, 6, 12, 24, 36 y 48 horas posteriores al ordeño. Se empleó un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones por punto de tiempo, aplicando análisis de varianza (ANDEVA) para evaluar las diferencias. **Resultados:** Se mostró que un mayor tiempo de almacenamiento antes de la pasteurización favoreció la proliferación de la bacteria psicrotrófica (*Bacillus* spp.), lo que incrementó la acidez y alteró las propiedades estructurales de la leche. Esta actividad microbiana redujo significativamente la estabilidad fisicoquímica, afectando la vida útil y la calidad del producto. **Conclusiones:** Aunque las buenas prácticas de ordeño contribuyen a reducir las cargas bacterianas iniciales, no son suficientes para mitigar el deterioro causado por las bacterias psicrotróficas. Reducir el tiempo entre el ordeño y la pasteurización es esencial para preservar la calidad de la leche durante el almacenamiento refrigerado, destacando la importancia del procesamiento oportuno. Este enfoque es crucial para mantener estándares de calidad en la industria láctea.

Palabras clave: Acidez titulable, deterioro de la leche, pasteurización, psicrotrófico, viscosidad

Introduction: Refrigeration of milk slows down the growth of most microorganisms, but it does not prevent the proliferation of psychrotrophic bacteria, such as *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp., which thrive at temperatures below 7 °C. These bacteria produce enzymes that accelerate the deterioration of milk, affecting its quality and that of its derivatives. The objective was to evaluate how the delay in pasteurization impacts the quality of milk through microbial dynamics and physicochemical changes during refrigerated storage. **Methodology:** Psychrotrophic bacterial populations were analyzed and physicochemical parameters such as titratable acidity (TTA), viscosity, and protein degradation were measured. The samples were collected at seven intervals: 0, 1, 6, 12, 24, 36, and 48 hours after milking. A completely randomized block design with three repetitions per time point was employed, applying analysis of variance (ANOVA) to evaluate the differences. **Results:** It was shown that a longer storage time before pasteurization favored the proliferation of psychrotrophic bacteria (*Bacillus* spp.), which increased acidity and altered the structural properties of the milk. This microbial activity significantly reduced the physicochemical stability, affecting the shelf life and quality of the product. **Conclusions:** Although good milking practices help reduce initial bacterial loads, they are not sufficient to mitigate the deterioration caused by psychrotrophic bacteria. Reducing the time between milking and pasteurization is essential to preserve the quality of the milk during refrigerated storage, highlighting the importance of timely processing. This approach is crucial for maintaining quality standards in the dairy industry.

Keywords: milk spoilage, pasteurization, psychrotrophic, titratable acidity, viscosity.

Introducción

La industria láctea enfrenta desafíos significativos relacionados con el deterioro de la calidad de la leche cruda, lo que resulta en pérdidas económicas considerables. La leche, aunque es estéril dentro de la glándula mamaria, es altamente susceptible a la contaminación microbiológica durante el ordeño, almacenamiento y procesamiento. Factores como la higiene deficiente en los establos, equipos contaminados y condiciones insalubres contribuyen a la presencia de microorganismos como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* (Yalew et al. 2024). Para mitigar estos riesgos, es fundamental implementar Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), que incluyen la limpieza adecuada de los pezones y el uso de equipos desinfectados, reduciendo así la carga inicial de bacterias en la leche (Lan et al. 2024).

La pasteurización se presenta como un proceso clave en la industria láctea, al calentar la leche a temperaturas específicas durante un tiempo controlado para eliminar la mayoría de los patógenos y reducir la carga microbiana total (Salwoom et al. 2019). Sin embargo, este método no es completamente infalible. Una alta carga bacteriana inicial, derivada de prácticas deficientes, puede permitir que algunos microorganismos sobrevivan incluso después del tratamiento térmico. Adicionalmente, la contaminación post-pasteurización representa otro riesgo significativo para la seguridad del producto final (Morandi et al. 2021).

Un desafío particular en el procesamiento lácteo es la presencia de bacterias psicrótroficas como *Bacillus* spp., que proliferan en condiciones de refrigeración y producen enzimas termorresistentes como proteasas y lipasas (Zarei et al. 2023). Estas enzimas sobreviven al tratamiento térmico y aceleran el deterioro de la leche, afectando su calidad a través de procesos como la desnaturalización de proteínas y la hidrólisis de grasas, lo que provoca rancidez, cambios en el sabor y sedimentación (Pereira et al. 2019). Estos defectos suelen manifestarse durante las evaluaciones de vida útil o como quejas de los consumidores, reduciendo significativamente la estabilidad y aceptabilidad del producto (Capodifoglio et al. 2016).

Este estudio busca evaluar cómo esta bacteria psicrótrófica y sus enzimas afectan la calidad y vida útil de la leche cruda y pasteurizada, analizando la dinámica microbiana y los cambios

fisicoquímicos durante el almacenamiento refrigerado. También explora la importancia de optimizar las condiciones de pasteurización y minimizar la contaminación inicial, con el objetivo de mejorar la calidad del producto, reducir el desperdicio y contribuir al logro del Objetivo de Desarrollo Sostenible 12: Producción y Consumo Responsable (United Nations Environment Programme, 2024).

Metodología

La información presentada en este trabajo se fundamenta en un estudio original que analiza la dinámica microbiológica y fisicoquímica de la leche bajo condiciones de almacenamiento refrigerado. Este estudio incluye el análisis de microorganismos psicrótrofos, como *Bacillus* spp., y evalúa los cambios en la calidad de la leche debido al retraso en la pasteurización. Para llevar a cabo este trabajo, se utilizaron metodologías validadas para los análisis microbiológicos y fisicoquímicos. Entre estas se incluye el método de Kjeldahl para la determinación de proteínas y medios de cultivo selectivos diseñados específicamente para la detección y cuantificación de microorganismos relevantes, como *Bacillus* spp. Además, se implementaron técnicas para el análisis de la viscosidad, acidez titulable y degradación proteica en leche bajo condiciones controladas de refrigeración.

El protocolo experimental incluye la aplicación del método AOAC 2001.11 para la evaluación de proteínas y otras técnicas estandarizadas ampliamente reconocidas. Así mismo, se recurrió al manual “Tecnología de la Leche” de Revilla R. (1996) como referencia para los procedimientos de medición de acidez titulable, asegurando así el cumplimiento de los estándares internacionales en la realización de los análisis.

La calidad de los estudios seleccionados se evaluó con base en la reproducibilidad de las metodologías descritas, el nivel de detalle en la documentación de los resultados y la validez de los protocolos empleados. Herramientas como PRISMA se usaron para garantizar que los estudios cumplieran con altos estándares científicos. Esta metodología permitió analizar la proliferación de *Bacillus* spp. y los cambios fisicoquímicos en la leche mediante una secuencia de análisis que incluyó pruebas microbiológicas y fisicoquímicas en diferentes puntos temporales, por lo cual, el estudio se dividió en dos fases. Los hallazgos proporcionaron una visión integral sobre el impacto del tiempo y las condiciones de almacenamiento en la calidad de la leche, destacando la importancia de un manejo adecuado y un procesamiento oportuno.

Este estudio se realizó bajo condiciones controladas en los laboratorios de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, en el Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

En la industria láctea, es común almacenar leche cruda a menos de 10 °C antes de su procesamiento durante 2 a 5 días para ralentizar el crecimiento de bacterias mesófilas y termófilas patógenas. Sin embargo, estas condiciones favorecen el desarrollo de bacterias psicrótrofas, que prosperan a temperaturas ≤ 7 °C, comprometiendo la calidad microbiológica de la leche si el almacenamiento excede las 48 horas (Yalew et al. 2024, 77).

Este estudio evaluó cambios en las poblaciones microbianas, específicamente de microorganismos psicrótrofos, en leche cruda almacenada por un máximo de 48 horas, un límite crítico basado en guías que aseguran calidad y seguridad. Se establecieron puntos de medición en intervalos clave:

0 horas: Para evaluar la carga microbiana inicial.

1 hora: Para identificar cambios inmediatos tras la recolección.

6 horas: Para capturar la proliferación temprana.

12 horas: Para observar la evolución durante media jornada de almacenamiento.

24 horas: Para comparar cambios tras un día completo.

36 horas: Para examinar el crecimiento cercano al límite crítico.

48 horas: Para evaluar el tiempo máximo de almacenamiento antes de un compromiso significativo en la calidad.

Estos intervalos permitieron rastrear la dinámica del crecimiento bacteriano, identificando los momentos críticos en que la carga microbiana supera niveles aceptables de seguridad. Este enfoque destaca la importancia de procesar la leche dentro del tiempo recomendado para evitar riesgos de contaminación (Poltronieri, 2017).

Fase I. Análisis microbiológico

El análisis microbiológico se enfocó en la identificación y cuantificación de *Bacillus* spp., Las muestras se sembraron directamente en Agar Selectivo para *Bacillus* spp. (dilución 10°). Las placas se incubaron a 24 °C durante 48 horas de acuerdo con el método desarrollado por Wehr y Frank (2004, 23). Tras el período de incubación, las colonias desarrolladas en el medio fueron contadas y el número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL).

Fase II. Análisis fisicoquímico

- Los parámetros fisicoquímicos evaluados fueron:
- Viscosidad: Medida con un viscosímetro Brookfield en siete intervalos de tiempo (0, 1, 6, 12, 24, 36 y 48 horas).
- Acidez titulable (ATECAL): Determinada mediante titulación con NaOH 0.1 N, expresando los resultados como porcentaje de ácido láctico.
- Proteína cruda y proteólisis: Cuantificada mediante el método Kjeldahl (AOAC 2001.11) con una adaptación que incluye precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA). Las proteínas precipitaron tras centrifugación, y se analizaron los péptidos solubles en TCA como indicadores de proteólisis.

Viscosidad (ASTM E83, ISO 9513)

La viscosidad de los tratamientos de leche se determinó mediante el método oficial ASTM E83, ISO 9513, utilizando un viscosímetro Brookfield con un husillo No. 02 de diámetro (cm) de 4.7. Este dispositivo mide la viscosidad de las muestras a través de mediciones repetidas en el tiempo, según el aumento de horas.

Preparación de las muestras: Las muestras de leche de los tratamientos (leche cruda y leche pasteurizada) que habían sido previamente congeladas para preservar las características fisicoquímicas en cada punto de tiempo se descongelaron a 4 °C para mantener su integridad. Una vez descongeladas, las muestras se llevaron a temperatura ambiente en el laboratorio para garantizar condiciones consistentes durante la medición de la viscosidad.

Este procedimiento se repitió para cada uno de los siete puntos de tiempo (0, 1, 6, 12, 24, 36 y 48 horas) con el objetivo de evaluar con precisión cómo la viscosidad cambió a lo largo del tiempo y entre los tratamientos.

Acidez titulable expresada en ácido láctico (TAELA)

Para este análisis, se utilizó el método de acidez titulable expresada como ácido láctico (TAELA) descrito en el libro de Revilla R. (1996, 38) “Tecnología de la Leche”. La acidez de la leche fue evaluada en los dos tratamientos. Se extrajeron 20 ml de leche de cada botella correspondiente a cada tratamiento y punto de tiempo, utilizando una pipeta graduada y una perilla de succión. Posteriormente, se añadieron 40 ml de agua destilada y 2 ml de fenoltaleína (preparada al 1 % en etanol al 95 %) en un matraz Erlenmeyer.

La mezcla se tituló con hidróxido de sodio (NaOH 0.1 N) contenido en una bureta. Se añadieron gotas de NaOH mientras se agitaba, registrándose los datos al observar el primer cambio de color a rosa, siempre que este persistiera durante 30 segundos. Asimismo, se leyó el volumen de NaOH 0.1 N utilizado en la bureta.

Para calcular el ácido láctico, se empleó la siguiente fórmula, expresando el resultado en porcentaje de TAELA:

$$\% \text{ Lactic Acid} = \frac{(\text{Volumen de NaOH (ml)} \times \text{Concentración (0.1 N)} \times 90\%)}{(\text{Volumen de Leche (ml)}) \times 100} \times 100$$

Determinación de proteína cruda (AOAC 2001.11 y método de Toss Ekmyr para proteólisis total)

La cuantificación de proteínas se realizó principalmente siguiendo el método AOAC 2001.11, que utiliza la técnica de Kjeldahl para determinar el nitrógeno total y convertirlo en contenido proteico. Este método incluye la digestión del nitrógeno orgánico con ácido sulfúrico, seguida de destilación y titulación con ácido clorhídrico. El porcentaje de nitrógeno obtenido se multiplicó por un factor de conversión para calcular el contenido proteico total. Esto permitió determinar la cantidad de proteína en leche sin tratar y en leche sometida a diferentes condiciones.

Para evaluar de manera indirecta la precipitación proteica causada por actividad microbiana, se empleó una modificación del enfoque de (Toss Ekmyr, 2020). Las proteínas fueron precipitadas usando ácido tricloroacético (TCA), un ácido débil comúnmente utilizado para este propósito debido a su capacidad para desnaturalizar proteínas al interrumpir las interacciones electrostáticas. Las muestras de leche se mezclaron con TCA para precipitar las proteínas, las cuales se separaron posteriormente mediante centrifugación.

Las proteínas precipitadas se depositaron en el pellet, mientras que el sobrenadante, que contenía péptidos solubles en TCA, se analizó para una evaluación adicional. Este proceso es esencial, ya que los péptidos solubles en TCA en el sobrenadante representan los productos de descomposición de la proteólisis, mientras que el contenido proteico restante en el precipitado refleja las proteínas no digeridas o no proteolizadas.

Este método permitió calcular el porcentaje de proteína que experimentó proteólisis durante el experimento. La combinación del método AOAC 2001.11 para la determinación de proteína cruda y la técnica de precipitación con TCA permitió realizar un análisis integral tanto del contenido proteico total como del grado de proteólisis en las muestras de leche.

Los resultados del análisis de proteínas, basados en los datos de titulación, se centraron en dos componentes principales: la masa de cada muestra y el volumen de HCl utilizado durante la titulación. Estos valores se emplearon para determinar el porcentaje de nitrógeno (%). Posteriormente, el contenido de nitrógeno se convirtió en porcentaje de proteína aplicando un factor de conversión de 6.38 %, correspondiente a las lactoproteínas en la leche. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%N = \frac{(\text{NHCl} \times \text{volumen del ácido (ml)})}{(\text{peso de la muestra (g)})}$$

Análisis estadístico

El experimento se diseñó y analizó estadísticamente utilizando un diseño de bloques completos al azar (CRBD, por sus siglas en inglés), seleccionado para controlar la variabilidad entre las unidades experimentales y garantizar resultados confiables. Se analizaron dos tratamientos principales: leche cruda y leche pasteurizada, con tres repeticiones cada uno, lo que permitió abordar la variación aleatoria y obtener un total de 42 unidades experimentales. Estas unidades se dividieron en tres bloques de 14 unidades, distribuidos para minimizar el impacto de posibles diferencias no controladas entre los bloques.

El protocolo incluyó mediciones repetidas en siete puntos temporales tras el ordeño: 0, 1, 6, 12, 24, 36 y 48 horas. El experimento se dividió en dos fases principales para un análisis integral: la fase I estuvo orientada a los análisis microbiológicos, mientras que la fase II incluyó mediciones fisicoquímicas como acidez titulable, viscosidad y estabilidad de proteínas, proporcionando una visión completa del impacto de los tratamientos a lo largo del tiempo.

El análisis estadístico se llevó a cabo con el software SAS (9.4M8), un sistema ampliamente reconocido por su precisión en análisis complejos. Se utilizó un análisis de varianza

(ANOVA) para determinar la significancia estadística entre los tratamientos y puntos de tiempo, seguido de la prueba post hoc de Tukey, la cual identificó diferencias significativas específicas entre tratamientos y momentos de medición. Además, se reportaron los intervalos de confianza para los efectos significativos, permitiendo una interpretación más precisa de los resultados.

Los métodos y términos estadísticos empleados, como ANOVA y la prueba de Tukey, están documentados y validados por literatura estándar. Este enfoque asegura que los análisis sean replicables y comprensibles para investigadores con acceso a los datos originales. El diseño cuidadoso y el uso de herramientas analíticas avanzadas refuerzan la solidez del estudio y garantizan la fiabilidad de las conclusiones obtenidas.

Los métodos estadísticos fueron descritos con suficiente detalle para permitir su replicación por parte de investigadores con acceso a los datos originales. La elección del análisis de varianza (ANDEVA) permitió identificar diferencias significativas entre tratamientos y a lo largo del tiempo, mientras que la prueba de Tukey proporcionó un análisis post hoc robusto para determinar qué grupos presentaban variaciones específicas. Además, los resultados fueron cuantificados y presentados con intervalos de confianza, proporcionando una interpretación más precisa de las estimaciones y del tamaño del efecto observado. La Tabla 1 muestra a detalle el diseño experimental utilizado en el estudio.

Tabla 1. Detalles diseño experimental

Parámetro	Detalles
Diseño experimental	Diseño de bloques completos al azar (CRBD)
Tratamientos	2 tratamientos: leche cruda y leche pasteurizada
Réplicas	3 bloques, cada uno con 14 unidades experimentales (total: 42 unidades)
Puntos de tiempo (horas)	7 puntos post-ordeño: 0, 1, 6, 12, 24, 36, 48
Fase I	Análisis microbiológico con 3 réplicas
Fase II	Análisis fisicoquímico (acidez titulable y viscosidad, proteína) con 3 réplicas
Análisis estadístico	ANOVA y prueba post hoc de Tukey

Fuente: Elaboración propia.

Resultados

Cargas de *Bacillus* spp. a través de tratamientos de leche cruda y pasteurizada y en intervalos temporales

La carga microbiana de *Bacillus* spp. en la leche cruda y la leche pasteurizada mostró aumentos estadísticamente significativos con el tiempo, como se observa en la Tabla 2 ($P < 0.0001$). En ambos tratamientos, la carga microbiana continuó incrementándose de manera constante a lo largo del tiempo. En el tratamiento de leche cruda, se registró un aumento significativo de 0.155 log UFC/ml, mientras que en la leche pasteurizada el incremento fue de 0.287 log UFC/ml. Estos valores reflejan cómo cada tratamiento afecta el crecimiento de *Bacillus* spp. con el paso de las horas, indicando que la leche cruda proporciona condiciones favorables para el desarrollo de estas bacterias (Gopal et al. 2015).

Por otro lado, al pasteurizar la leche, se observó una reducción significativa en la carga microbiana inicial en la hora 0. Sin embargo, cuando la leche cruda fue refrigerada durante 48 horas antes de ser pasteurizada, la carga microbiana en las muestras pasteurizadas alcanzó valores más altos, llegando a 2.417 log UFC/ml. Esto subraya cómo el almacenamiento prolongado previo a la pasteurización compromete la efectividad del proceso y la calidad general del producto. Este fenómeno se explica porque las células vegetativas de *Bacillus* spp. presentes en la leche cruda son eliminadas por el tratamiento térmico, pero las esporas de *Bacillus* spp., resistentes al calor, sobreviven (Lan et al. 2024). Durante el almacenamiento a bajas temperaturas, estas esporas pueden germinar y conducir a la proliferación bacteriana, lo que afecta la calidad de la leche debido a la producción de enzimas como proteasas y lipasas (Meer et al. 1991).

En el análisis de las cargas de *Bacillus* spp. a través del tiempo, la leche cruda mostró una carga inicial significativamente más alta en la hora 0 (3.168 log UFC/ml) en comparación con la leche pasteurizada (0.693 log UFC/ml). A lo largo del tiempo, la leche cruda mantuvo consistentemente mayores conteos de *Bacillus* spp. en todos los puntos temporales, mientras que la leche pasteurizada mostró incrementos graduales. Las diferencias significativas entre los tratamientos y los puntos temporales se reflejan mediante las letras (a, b, c) en las columnas de la Tabla 6.

Tabla 2. Comportamiento de *Bacillus* spp

Comportamiento de <i>Bacillus</i> spp. (Log UFC/ml) en diferentes tratamientos de leche a lo largo del tiempo (Medidas repetidas en el tiempo).								
TRT	0	1	6	12	24	36	48	C.V (%)
Leche cruda	3.168±0.01 1 ^{na}	3.520±0.01 2 ^{ya}	3.839±0.07 2 ^{na}	3.799±0.00 6 ^{na}	3.923±0.00 1 ^{na}	4.011±0.01 1 ^{na}	4.096±0.00 0 ^{na}	0.432
Leche Past	0.693±0.08 8 ^{nc}	0.800±0.03 9 ^{nc}	1.165±0.04 6 ^{nc}	1.566±0.02 5 ^{nc}	1.861±0.02 4 ^{nc}	2.285±0.01 7 ^{nb}	2.417±0.00 8 ^{nc}	3.638
C.V (%)	5.288	2.005	2.108	0.794	0.487	0.395	0.276	

Nota. ME ± DE (Media ± Desviación Estándar). Letras diferentes en la misma fila (t-z) indican diferencias significativas dentro de cada tratamiento en cada hora (P < 0.05). Letras diferentes en la misma columna (a-c) indican diferencias significativas entre tratamientos en cada hora (P < 0.05). C.V: Los coeficientes de variación en una fila representan el tratamiento en diferentes horas y, en las columnas, representan la misma hora en diferentes tratamientos. Past: Pasteurizado.

Fuente: Elaboración propia.

Acidez Titulable Expresada como Ácido Láctico (ATECAL) en diferentes tratamientos de leche y en intervalos temporales

La acidez titulable expresada como ácido láctico en los tratamientos de leche cruda y pasteurizada mostró aumentos estadísticamente significativos con el tiempo (Tabla 3), como lo evidencian las diferentes letras en la misma fila (P < 0.005). Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula que establece que todos los tratamientos de leche se comportan de manera similar o constante en términos de su acidez a lo largo del tiempo.

En la leche cruda, la acidez aumentó gradualmente de 0.149 a 0.194 ATECAL en 48 horas. Este incremento se atribuye probablemente a la actividad microbiana, ya que la leche cruda contiene bacterias productoras de ácido como subproducto de su metabolismo. La presencia de microorganismos, especialmente bacterias lácticas, contribuye al aumento de la acidez, lo que indica que la leche cruda es menos estable y más propensa a deteriorarse rápidamente en comparación con la leche pasteurizada.

En el caso de la leche pasteurizada, aunque la acidez también aumentó (de 0.150 a 0.213 ATECAL) durante las 48 horas, el incremento fue menor debido a que la pasteurización reduce significativamente la carga microbiana inicial, limitando la producción de ácidos por las bacterias. No obstante, el tratamiento térmico pudo contribuir a un ligero aumento de la acidez debido a la concentración de ácidos orgánicos por evaporación de agua durante el calentamiento y la desnaturalización de proteínas, que libera ácidos ligados y altera la

capacidad tampón de la leche. Estos cambios, junto con la activación gradual de ciertos microorganismos en condiciones de refrigeración, contribuyeron al incremento en la acidez con el tiempo.

Tabla 3. Acidez titulable a lo largo del tiempo

Acidez titulable en diferentes tratamientos de leche a lo largo del tiempo (Expresada en % de ácido Láctico) mediciones repetidas en el tiempo (Horas)								
TRT	0 ^{ns}	1 ^{ns}	6 ^{ns}	12 ^{ns}	24	36 ^{ns}	48 ^{ns}	CV%
Leche cruda	0.149±0.014 ^z	0.150±0.011 ^z	0.150±0.005 ^z	0.156±0.007 ^{yz}	0.167±0.009 ^{xy}	0.176±0.008 ^x	0.194±0.005 ^w	5.240
Leche Past	0.150±0.023 ^z	0.165±0.032 ^z	0.170±0.036 ^y	0.180±0.036 ^{xy}	0.189±0.036 ^x	0.197±0.032 ^{wx}	0.213±0.034 ^w	18.139
C.V (%)	9.479	10.931	10.189	10.095	9.607	10.507	7.671	

Nota. ME ± DE (Media ± Desviación Estándar). Las letras diferentes “w-z” en la misma fila indican diferencias significativas dentro de cada tratamiento en cada hora (P < 0.05). “ns” en la misma columna indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos en cada hora (P > 0.05). C.V: Los coeficientes de variación en una fila representan el tratamiento en diferentes horas y, en las columnas, representan la misma hora en diferentes tratamientos. Past: Pasteurizado.

Fuente: Elaboración propia.

Viscosidad en diferentes tratamientos de leche y en intervalos temporales de muestreo

La viscosidad inicial de los dos tipos de leche (Tabla 4) muestra diferencias importantes: la leche cruda comienza con 9.47±2.59 mPa·s y experimenta incrementos leves.

En las columnas, los valores marcados como “ns” indican que no hay diferencias estadísticamente significativas en la viscosidad entre los tratamientos en momentos específicos (1, 6 y 12 horas). Esto sugiere que, en estos tiempos, la actividad microbiana y la estructura de la leche eran similares en ambos tratamientos, probablemente debido a una fase inicial de adaptación microbiana y a la limitada influencia de factores externos como los exopolisacáridos (EPS) en este momento (Morandi et al. 2021).

Tabla 4. Viscosidad en los diferentes tratamientos de leche

Viscosidad (mPa·s) en diferentes tratamientos de leche a lo largo del tiempo medidas repetidas en el tiempo (Horas)								
TRT	0	1 ^{ns}	6 ^{ns}	12 ^{ns}	24	36	48 ^{ns}	C.V (%)
Leche cruda ^{ns}	9.47±2.59 ^b	10.00±3.11	10.37±1.65	10.23±2.38 ^b	10.27±2.88 ^b	10.70±3.63 ^b	10.61±3.23	27.14
Leche past	11.27±1.70 ^{wxab}	10.72±1.48 ^{wx}	10.17±2.16 ^{wx}	10.48±3.22 ^{wx}	8.58±0.31 ^{ab}	9.96±2.06 ^{wx}	12.02±3.45 ^w	19.13
C.V (%)	17.79	19.90	17.07	20.49	13.08	19.34	24.04	

Nota. ME ± DE (Media ± Desviación Estándar). Las letras diferentes “w-z” en la misma fila indican diferencias significativas dentro de cada tratamiento en cada hora (P < 0.05). “ns” en la misma columna indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos en cada hora (P > 0.05). “NS” en la misma fila indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos en cada hora (P > 0.05). C.V: Los coeficientes de variación en una fila representan el tratamiento en diferentes horas y, en las columnas, representan la misma hora en diferentes tratamientos. Past: Pasteurizado.

Fuente: Elaboración propia.

Precipitación de proteínas en diferentes tratamientos de leche a lo largo del tiempo

La leche cruda comienza con un contenido de proteínas de 0.11±0.03 y se mantiene estable hasta las 24 horas (0.12±0.02). A partir de ese punto, el contenido proteico disminuye drásticamente a 0.00±0.00 en las horas 36 y 48 (Tabla 5). Esta reducción puede atribuirse a la actividad microbiana en la leche cruda, que, al no haber sido sometida a tratamiento

térmico, conserva enzimas y bacterias activas que descomponen las proteínas, reduciendo su contenido. En la leche pasteurizada, el contenido proteico también muestra una tendencia a la baja, pasando de un valor inicial de 0.11 ± 0.01 a 0.05 ± 0.05 en las últimas horas. Aunque la pasteurización inactiva gran parte de la carga microbiana, no elimina por completo algunas bacterias y enzimas termorresistentes que pueden sobrevivir al proceso y afectar las proteínas, aunque de manera más lenta que en la leche cruda (Tirloni et al. 2022).

En las columnas, los tiempos marcados como “ns” indican que el análisis con SAS no detectó diferencias significativas en el contenido de proteínas entre los tratamientos en esos momentos específicos (0, 1, 6, 12 y 24 horas). Esto podría deberse a que, en esos primeros momentos, las actividades de degradación proteica no han avanzado lo suficiente como para mostrar diferencias significativas, especialmente en la leche pasteurizada, que inicialmente tiene menor actividad enzimática y bacteriana.

Tabla 5. Precipitación de proteína en diferentes tratamientos de leche

Precipitación de proteínas (%) en diferentes tratamientos de leche a lo largo del tiempo medidas repetidas en el tiempo (Horas)								
TRT	0 ^{ns}	1 ^{ns}	6 ^{ns}	12 ^{ns}	24 ^{ns}	36 ^{ns}	48 ^{ns}	C.V (%)
Leche cruda	0.11 ± 0.03^w	0.12 ± 0.03^w	0.11 ± 0.01^w	0.12 ± 0.03^w	0.12 ± 0.02^w	0.00 ± 0.00^x	0.00 ± 0.00^x	20.4
Leche Past ^{ns}	0.11 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.05 ± 0.05	0.05 ± 0.05	41.93
C.V (%)	14.22	14.67	9.11	12.85	15.4	0	0	

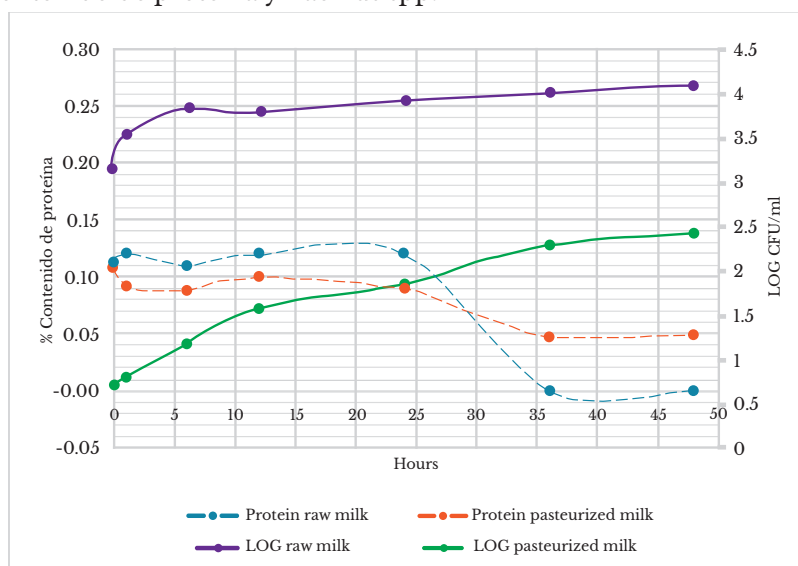
Nota. ME $\pm$ DE (Media $\pm$ Desviación Estándar). Las letras diferentes “w-z” en la misma fila indican diferencias significativas dentro de cada tratamiento en cada hora ($P < 0.05$). “ns” en la misma columna indica que no hay diferencias significativas entre tratamientos en cada hora ($P > 0.05$). “NS” en la misma fila indica que no hay diferencias significativas dentro de cada tratamiento en cada hora ($P > 0.05$). C.V: Los coeficientes de variación en una fila representan las horas y, en las columnas, representan el tratamiento. Past: Pasteurizado.

Fuente: Elaboración propia.

Tendencias en la biodinámica entre tratamientos y análisis químico Biodinámica del contenido de proteína y *Bacillus* spp.

La Figura 1 muestra los resultados del contenido de proteínas. En la leche cruda, la concentración de proteínas comenzó a disminuir gradualmente después de las 24 horas, reflejando la actividad proteolítica de *Bacillus* spp. presente. En la leche pasteurizada, el contenido proteico también mostró una disminución significativa entre las horas 24 y 48, lo que sugiere que, aunque la pasteurización reduce la carga microbiana inicial, las esporas de *Bacillus* spp. sobrevivientes continuaron afectando las proteínas, provocando su descomposición y pérdida de estabilidad en la leche.

Figura 1. Contenido de proteína y *Bacillus* spp.



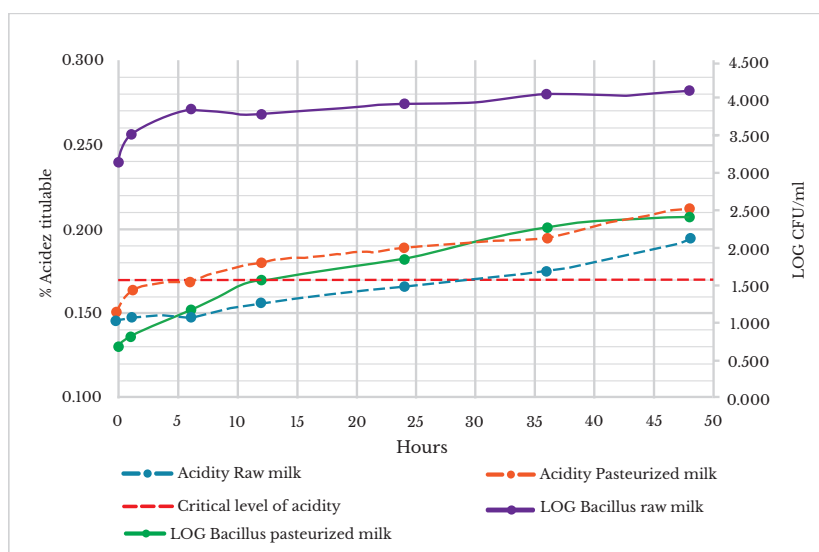
Nota. ME $\pm$ DE (Media $\pm$ Desviación Estándar). Las letras diferentes “w-z” en la misma fila indican diferencias significativas dentro de cada tratamiento en cada hora ($P < 0.05$). “ns” en la misma columna indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos en cada hora ($P > 0.05$). “NS” en la misma fila indica que no hay diferencias significativas entre los tratamientos en cada hora ($P > 0.05$). C.V: Los coeficientes de variación en una fila representan el tratamiento en diferentes horas y, en las columnas, representan la misma hora en diferentes tratamientos. Past: Pasteurizado.

Fuente: Elaboración propia.

Biodinámica de la acidez titulable y *Bacillus* spp.

La acidez titulable en la leche cruda (Figura 2) mostró un aumento gradual, superando el límite crítico a partir de la hora 24. Esto reflejó una rápida descomposición y pérdida de

Figura 2. Acidez titulable (ATECAL) y *Bacillus* spp.



Nota. El eje “X” representa las horas de los tratamientos, el eje “Y” izquierdo representa la acidez titulable expresada en ácido láctico (TAELA), y el eje “Y” derecho representa la carga microbiana expresada en logaritmos de UFC/ml. Las líneas punteadas representan la acidez titulable en los tratamientos y las líneas sólidas representan los microorganismos *Bacillus* en LOG UFC/ml.

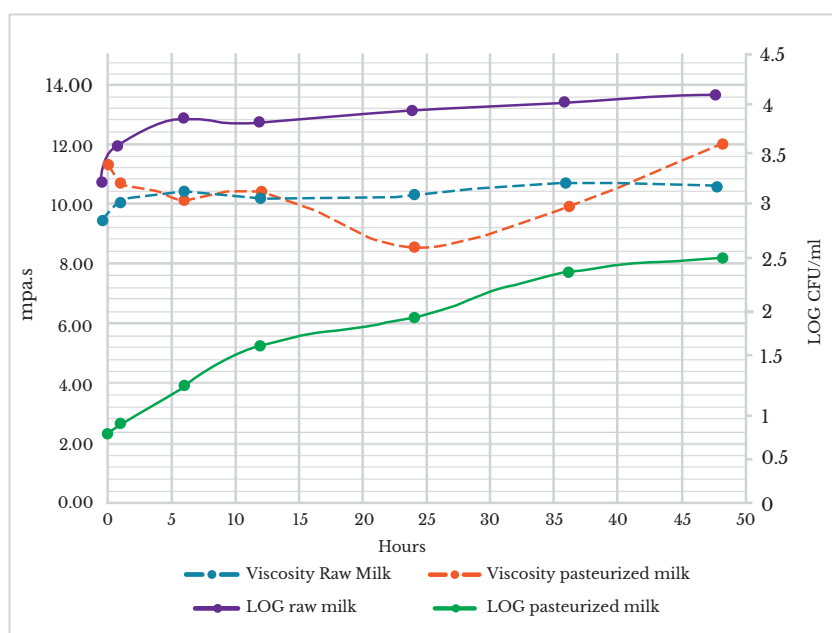
Fuente: Elaboración propia.

calidad debido a la actividad de *Bacillus* spp., una bacteria formadora de esporas capaz de sobrevivir en condiciones adversas y producir enzimas que descomponen proteínas y grasas, liberando ácidos que incrementan la acidez (Li et al. 2023). Estas enzimas, como proteasas y lipasas, generan subproductos que no solo aumentan la acidez, sino que también afectan la textura y el sabor, acelerando el deterioro de la leche.

Biodinámica entre viscosidad y *Bacillus* spp.

Como se muestra en la Figura 3, en la leche cruda la viscosidad se mantuvo estable durante las primeras 48 horas, lo que indica que la actividad de *Bacillus* spp. no afectó significativamente su estructura. En contraste, en la leche pasteurizada se evidenció un aumento en la viscosidad a partir de las 24 horas, lo que sugiere que las alteraciones estructurales inducidas por el tratamiento térmico, combinadas con la actividad de *Bacillus* spp., comenzaron a impactar la estabilidad estructural de la leche.

Figura 2. Viscosidad (mpa*s) y *Bacillus* spp.



Nota. El eje “X” representa las horas de los tratamientos, el eje “Y” izquierdo representa la viscosidad, y el eje “Y” derecho representa la carga microbiana expresada en logaritmos de UFC/ml. Las líneas punteadas representan la viscosidad en los tratamientos y las líneas sólidas representan los microorganismos psicrótrofos en LOG UFC/ml.

Fuente: Elaboración propia.

Discusión

Cargas de *Bacillus* spp. a través de tratamientos de leche cruda y pasteurizada y en intervalos temporales

Los altos conteos iniciales en la leche cruda se atribuyen a la ausencia de tratamiento térmico, lo que permite que las especies nativas formadoras de esporas permanezcan activas (Heyndrickx, 2011). En contraste, los conteos iniciales más bajos en la leche pasteurizada indican que este proceso reduce significativamente la carga microbiana al eliminar las células vegetativas, aunque las esporas resistentes al calor sobreviven y pueden germinar bajo refrigeración (Liu et al. 2020).

Los resultados destacan un incremento significativo de *Bacillus* spp. en ambos tratamientos, con mayores cargas observadas en la leche cruda. Estos hallazgos resaltan la limitada efectividad de la pasteurización frente a bacterias formadoras de esporas, ya que las esporas de *Bacillus* spp. son altamente resistentes al calor. Además, la refrigeración no inhibe la multiplicación de estas bacterias psicrótrofas, lo que permite su proliferación y contribuye al deterioro de la calidad. La significancia estadística ($P < 0.0001$) confirma que cada tratamiento influye de manera distinta en la proliferación de *Bacillus* spp., enfatizando la necesidad de medidas estrictas de control durante el manejo y procesamiento de la leche para minimizar los riesgos microbianos.

Acidez Titulable Expresada como Ácido Láctico (ATECAL) en diferentes tratamientos de leche y en intervalos temporales

El análisis a través de las columnas muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos en un mismo momento. Según la Tabla 5, la marca “NS” indica que no se encontraron diferencias significativas en los niveles de acidez entre los tratamientos de leche en horas específicas. Esto significa que, a pesar de las diferencias en los tratamientos, en los tiempos marcados como “NS” el comportamiento de la acidez fue similar entre las leches cruda y pasteurizada, según el análisis de varianza (ANDEVA) realizado.

En las primeras horas de almacenamiento, la leche cruda y pasteurizada mostraron niveles similares de acidez, probablemente debido a la fase de latencia, en la que la actividad bacteriana es baja. Durante este período, las bacterias acidificantes necesitan tiempo para adaptarse antes de comenzar a producir ácido, lo que explica la ausencia de diferencias significativas iniciales en la acidez.

Jonghe et al. (2011) señala que algunas plantas receptoras o procesadoras de leche rechazan lotes cuando tienen un 0.20 % o más de acidez, ya que se generaliza erróneamente que niveles superiores al 0.18 % son de origen bacteriano. En este estudio, tanto la leche cruda como la pasteurizada mostraron una tendencia creciente en la acidez durante el almacenamiento (Tabla 5) (Hantsis-Zacharov y Halpern 2007).

La acidez en la leche cruda aumenta significativamente durante la refrigeración, principalmente debido a la actividad de lipasas y bacterias productoras de ácido, como las bacterias lácticas. En la leche pasteurizada, el tratamiento térmico inactiva la mayoría de las lipasas, lo que retrasa el aumento de acidez en comparación con la leche cruda. Sin embargo, a medida que las bacterias acidificantes proliferan, el proceso de acidificación se acelera, resultando en una mayor acidez y calidad reducida en ambas leches (Sharma et al. 2014).

Según Revilla R. (1996) entre los ácidos grasos presentes en los glicéridos, el ácido butírico es el principal responsable del sabor agradable de la crema y la mantequilla. Sin embargo, cuando se libera, genera un sabor rancio. Otros ácidos grasos, como el caproico, caprílico, cáprico y láurico, también contribuyen a sabores indeseables cuando son liberados.

Además, el aumento de la acidez en la leche cruda y pasteurizada también puede influir en la estabilidad de las proteínas y grasas, acelerando su desestabilización durante el almacenamiento. Este fenómeno se debe en parte a la interacción de los ácidos orgánicos con las micelas de caseína y los glóbulos de grasa, lo que puede dar lugar a floculación o precipitación de proteínas, afectando negativamente la textura y el valor nutricional de la leche (Brasca et al. 2017). Asimismo, los ácidos grasos liberados, además de contribuir a sabores indeseables, pueden actuar como sustratos para nuevas reacciones químicas o enzimáticas que agravan el deterioro del producto, reduciendo su vida útil y calidad sensorial. Este efecto acumulativo subraya la importancia de controlar estrictamente las condiciones de almacenamiento para minimizar el impacto de estos procesos.

Viscosidad en diferentes tratamientos de leche y en intervalos temporales de muestreo

El aumento puede relacionarse a la presencia de lisozimas, que posiblemente controlaron la microbiota inicial en la leche (Yuan et al. 2019). En la leche pasteurizada, la viscosidad inicial es moderada, disminuyendo ligeramente antes de aumentar gradualmente con el tiempo. Este aumento puede atribuirse a las modificaciones estructurales inducidas por el tratamiento térmico y a la actividad de microorganismos sobrevivientes que interactúan con los componentes de la leche (Toss Ekmyr 2020).

La leche procesada en este experimento no fue homogeneizada industrialmente, lo que implica que los glóbulos de grasa no se redujeron en tamaño como ocurre en procesos industriales. La falta de homogeneización afecta la estabilidad de la emulsión de grasa y, por lo tanto, la consistencia y viscosidad de la leche. En condiciones no homogeneizadas, la grasa puede acumularse en la superficie o en forma de grumos, causando variaciones en la viscosidad medida con el tiempo. (Fava et al. 2013). Además, la ausencia de homogeneización permite que los microorganismos y enzimas interactúen de manera diferente con los componentes grasos, lo que puede aumentar o disminuir la viscosidad dependiendo de la actividad microbiana y la producción de EPS.

En la leche cruda, la viscosidad se mantuvo estable con el tiempo, probablemente debido a la ausencia de desestabilización de proteínas y grasas, ya que no se aplicó tratamiento térmico. Los tratamientos térmicos como la pasteurización pueden alterar la estructura natural de la leche, provocando cambios en las interacciones entre proteínas y grasas (Zamora y Ferragut 2013). Esta estabilidad en la leche cruda sugiere que, aunque los microorganismos puedan haber producido lipasas y proteasas, estas enzimas no afectaron significativamente la viscosidad bajo estas condiciones. Sin embargo, esto sigue siendo especulativo, ya que la actividad de estas enzimas podría variar según las poblaciones microbianas y las condiciones de almacenamiento.

En contraste, la viscosidad en la leche pasteurizada cambió progresivamente con el tiempo. Esta variación puede atribuirse a las alteraciones térmicas de las proteínas y las grasas causadas por la pasteurización, que pueden modificar propiedades físicas de la leche, como la estabilidad de la emulsión (Cousin 1982). Los cambios estructurales inducidos por el calor, junto con la actividad de microorganismos sobrevivientes, probablemente expliquen el aumento progresivo en la viscosidad observado en la leche pasteurizada con el paso del tiempo.

En la leche pasteurizada, el aumento progresivo de la viscosidad también podría estar relacionado con la formación de agregados proteicos inducidos por el calor, específicamente entre proteínas del suero como la beta-lactoglobulina y la kappa-caseína. Estos agregados pueden contribuir a un ligero aumento en la viscosidad con el tiempo, especialmente bajo condiciones de refrigeración, donde la movilidad molecular es limitada. Además, la pasteurización puede desencadenar interacciones secundarias entre los glóbulos de grasa y las micelas de caseína, alterando la dinámica de la matriz láctea y promoviendo una mayor consistencia en la leche procesada (Schmiedt et al. 2020). Estas interacciones estructurales, junto con la actividad residual de enzimas o microorganismos sobrevivientes, refuerzan los cambios observados en la viscosidad durante el almacenamiento.

Precipitación de proteínas en diferentes tratamientos de leche a lo largo del tiempo

La susceptibilidad de las proteínas de la leche a cambios estructurales es mayor cuando la leche pasa por tratamientos térmicos. Como señalan estudios previos (Hiroshi S et al. 2020), el tratamiento térmico, como la pasteurización, puede causar cierta desnaturalización de proteínas, afectando su estabilidad. Además, las proteínas tienden a perder estabilidad y descomponerse más rápidamente, como se observa en la disminución de proteínas en la Tabla 7.

Las proteínas son un indicador clave de la calidad de la leche. La tendencia a la baja en el contenido proteico en la leche cruda y pasteurizada refleja un deterioro en la calidad, como lo mencionan estudios (Heyndrickx 2011). En la leche cruda, esta disminución es más rápida debido a la actividad de microorganismos que producen enzimas proteolíticas, las cuales descomponen las proteínas. En la leche pasteurizada, aunque el descenso es más lento, los cambios estructurales inducidos por el calor también afectan la estabilidad de las proteínas y las interacciones con las grasas, lo que puede alterar propiedades como la emulsión y la textura (Pereda et al. 2007).

Tendencias en la biodinámica entre tratamientos y análisis químico biodinámica del contenido de proteína y *Bacillus* spp.

La disminución del contenido de proteínas en ambos tratamientos puede atribuirse a la actividad de enzimas proteolíticas producidas por *Bacillus* spp., como las proteasas termoestables, que permanecen activas incluso después de la pasteurización. Estas enzimas descomponen las cadenas proteicas, generando péptidos más pequeños y aminoácidos libres, lo que no solo reduce la estabilidad de la leche, sino que también afecta su valor nutricional y funcionalidad. Este proceso de proteólisis, además, puede favorecer la formación de precipitados y alterar la textura, destacando la importancia de minimizar la actividad de estas bacterias mediante un manejo adecuado y tiempos de almacenamiento controlados (Meng et al. 2017).

Biodinámica de la acidez titulable y *Bacillus* spp.

En contraste, la leche pasteurizada superó este límite del 0.17 % mucho antes, desde la hora 12. Esto sugiere que, aunque la pasteurización inactiva una gran parte de las bacterias vegetativas, las esporas de *Bacillus* spp., resistentes al calor, sobreviven al tratamiento térmico y germinan durante el almacenamiento. La rápida proliferación de estas bacterias después del tratamiento puede atribuirse a la ausencia de competencia microbiana, lo que les permite desarrollarse más rápidamente en comparación con la leche cruda. Además, el calor de la pasteurización puede alterar la capacidad tampón de la leche, facilitando el aumento de acidez (Perin 2012). Estos resultados subrayan la importancia de implementar controles estrictos durante el almacenamiento y procesamiento de la leche para minimizar los riesgos asociados con la actividad de bacterias resistentes como *Bacillus* spp. Estudios adicionales han demostrado que la calidad y estabilidad de la leche se ven significativamente influenciadas por las condiciones de almacenamiento, destacando la necesidad de limitar el tiempo entre el ordeño y el procesamiento para reducir el impacto de estas bacterias (Kuo y Gunasekaran 2009).

Biodinámica entre viscosidad y *Bacillus* spp.

El aumento de viscosidad en la leche pasteurizada puede estar relacionado con la interacción de las proteínas desnaturalizadas durante el tratamiento térmico y la actividad enzimática residual de *Bacillus* spp. Estas bacterias pueden producir exopolisacáridos (EPS), compuestos que contribuyen al espesor y la consistencia de la leche, afectando su estructura física. Además, la alteración de las micelas de caseína y la emulsión de grasa tras la pasteurización facilita estos cambios estructurales, lo que explica el incremento progresivo en la viscosidad observado a lo largo del tiempo (Fox y McSweeney 2015).

Conclusiones

La descomposición de la leche durante el almacenamiento refrigerado está fuertemente influenciada por la actividad de bacterias resistentes al calor, como *Bacillus* spp., que pueden sobrevivir y proliferar incluso en condiciones de baja temperatura. Estas bacterias generan un impacto significativo en las propiedades fisicoquímicas de la leche, promoviendo la descomposición de proteínas (proteólisis), el aumento de la acidez y

alteraciones sensoriales como cambios en el sabor y la textura. Estos procesos no solo reducen la calidad nutricional de la leche, sino que también acortan su vida útil. Según los resultados de este estudio, pasteurizar la leche dentro de las primeras 24 horas de refrigeración es fundamental para minimizar la actividad bacteriana y evitar un deterioro acelerado. Después de este período, la proliferación de estos microorganismos contribuye de manera crítica a la degradación de la calidad del producto, lo que puede generar pérdidas económicas y dificultades para mantener estándares de inocuidad.

Si bien las buenas prácticas de ordeño, como la higiene en el manejo del ganado y los equipos, son esenciales para reducir las cargas bacterianas iniciales, este estudio confirma que estas medidas por sí solas no son suficientes para garantizar la estabilidad de la leche cruda. Los microorganismos resistentes al calor, como *Bacillus* spp., tienen la capacidad de persistir y multiplicarse durante el almacenamiento refrigerado previo a la pasteurización. La actividad de estas bacterias puede comprometer seriamente la calidad del producto final, al provocar cambios en la composición química y las propiedades físicas de la leche. Por lo tanto, además de implementar prácticas de ordeño adecuadas, es indispensable minimizar los tiempos de espera antes de la pasteurización, ya que cada hora adicional en refrigeración favorece la proliferación de microorganismos responsables del deterioro. Esta estrategia resulta clave para preservar tanto la calidad sensorial como la microbiológica de la leche.

El deterioro de la leche a lo largo del tiempo se debe principalmente a la actividad de bacterias que comprometen su calidad química al aumentar la proteólisis y la acidez. Este fenómeno no solo afecta las propiedades nutricionales de la leche, sino que también altera sus características sensoriales, como el sabor y la textura, lo que la hace menos atractiva para los consumidores. El almacenamiento prolongado antes de la pasteurización agrava estos efectos, ya que proporciona un entorno favorable para la proliferación de bacterias resistentes al calor, las cuales contribuyen significativamente al deterioro del producto. Reducir al máximo los tiempos previos a la pasteurización es crucial para preservar la calidad de la leche, garantizar su estabilidad y prolongar su vida útil. Este enfoque es esencial para mantener estándares de inocuidad y competitividad en la cadena de suministro lácteo.

Agradecimientos

Un profundo agradecimiento a la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano por el acceso a sus instalaciones y recursos. Agradecemos especialmente a nuestros asesores, M.Sc. Ligia Luna y PhD. Luis Maldonado, por su guía y apoyo intelectual en cada etapa del proyecto, así como a los asistentes de laboratorio que colaboraron con dedicación en el desarrollo de los experimentos. Finalmente, extendemos nuestro reconocimiento al gobierno de Honduras, a través de SEDESOL, por el apoyo económico brindado durante nuestra formación en Zamorano, lo que hizo posible la culminación de este trabajo.

Referencias

- Brasca, M., Decimo, M., Morandi, S., Machado, S. G., Bagliniére, F. y Vanetti, M. C. D. 2017. "Psychrotrophic bacteria". En P. Poltronieri (Ed.), *Microbiology in Dairy Processing* 37-61. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119115007.ch3>
- Capodifoglio, E., Centola Vidal, A. M., Santos Lima, J. A., Bortoletto, F., D'Abreu, L. F., Gonçalves, A. C. S., Vaz, A. C. N., Balieiro, J. C. de C., & Saran Netto, A. 2016. (Lipolytic and proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. isolated during milking and storage of refrigerated raw milk). *Journal of Dairy Science* 99, núm. 7: 5214–5223. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10453>

- Cousin, M. A. 1982. (Presence and Activity of Psychrotrophic Microorganisms in Milk and Dairy Products: A Review 1). *Journal of Food Protection* 45 núm. 2: 172–207. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-45.2.172>
- Fava, L. W., Serpa, P., Külkamp-Guerreiro, I. C. y Pinto, A. T. 2013. “Evaluation of viscosity and particle size distribution of fresh, chilled and frozen milk of Lacaune ewes”. *Small Ruminant Research* 113, núm. 1: 247–250. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.03.010>
- Gopal, N., Hill, C., Ross, P. R., Beresford, T. P., Fenelon, M. A. y Cotter, P. D. 2015. “The Prevalence and Control of Bacillus and Related Spore-Forming Bacteria in the Dairy Industry”. *Frontiers in Microbiology* 6, 1418. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01418>
- Hantsis-Zacharov, E. y Halpern, M. 2007. “Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits”. *Applied and Environmental Microbiology* 73, núm. 22: 7162–7168. <https://doi.org/10.1128/AEM.00866-07>
- Heyndrickx, M. 2011. “The Importance of Endospore-Forming Bacteria Originating from Soil for Contamination of Industrial Food Processing”. *Applied and Environmental Soil Science* 1–11. <https://doi.org/10.1155/2011/561975>
- Hiroshi S, H., Guemra, S., Bosso, A., Pádua A, É. de y Rodrigo Ito M, L. 2020. “Reducción de proteínas y glucosa por reacción de Maillard en leche con lactosa hidrolisada”. *Revista Chilena De Nutrición* 47, núm. 1: 14–21. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182020000100014>
- Jonghe, V. de, an Coorevits, van Hoorde, K., Messens, W., van Landschoot, A., Vos, P. de y Heyndrickx, M. 2011. “Influence of storage conditions on the growth of Pseudomonas species in refrigerated raw milk”. *Applied and Environmental Microbiology* 77, núm. 2: 460–470. <https://doi.org/10.1128/aem.00521-10>
- Kuo, M.-I. y Gunasekaran, S. 2009. “Effect of freezing and frozen storage on microstructure of Mozzarella and pizza cheeses. LWT”. *Food Science and Technology* 42, núm. 1: 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.07.003>
- Lan, X., Wu, S., Du, Q. y Min, L. 2024. “The Investigation of Changes in Bacterial Community of Pasteurized Milk during Cold Storage”. *Foods (Basel, Switzerland)* 13, núm. 3: <https://doi.org/10.3390/foods13030451>
- Li, Y., Weng, P., Wu, Z. y Liu, Y. 2023. “Extending the Shelf Life of Raw Milk and Pasteurized Milk with Plantaricin FB-2”. *Foods (Basel, Switzerland)* 2, núm. 3: <https://doi.org/10.3390/foods12030608>
- Liu, X.-Y., Hu, Q., Xu, F., Ding, S.-Y. y Zhu, K. 2020. “Characterization of Bacillus cereus in Dairy Products in China”. *Toxins* 12, núm. 7: <https://doi.org/10.3390/toxins12070454>
- Meer, R. R., Baker, J., Bodyfelt, F. W. y Griffiths, M. W. 1991. “Psychrotrophic Bacillus spp. In Fluid Milk Products: A Review”. *Journal of Food Protection* 54, núm. 12: 969–979. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-54.12.969>
- Meng, L., Zhang, Y., Liu, H., Zhao, S., Wang, J. y Zheng, N. 2017. “Characterization of Pseudomonas spp. And Associated Proteolytic Properties in Raw Milk Stored at Low Temperatures”. *Frontiers in Microbiology* 8, 2158. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02158>
- Morandi, S., Pica, V., Masotti, F., Cattaneo, S., Brasca, M., Noni, I. de y Silvetti, T. 2021. “Proteolytic Traits of Psychrotrophic Bacteria Potentially Causative of Sterilized Milk

Instability: Genotypic, Phenotypic and Peptidomic Insight”. *Foods (Basel, Switzerland)* 10, núm. 5: <https://doi.org/10.3390/foods10050934>

- Pereda, J., Ferragut, V [V.], Quevedo, J. M., Guamis, B. y Trujillo, A. J. 2007. “Effects of ultra-high pressure homogenization on microbial and physicochemical shelf life of milk”. *Journal of Dairy Science* 90, núm. 3: 1081–1093. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71595-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71595-3)
- Perin, L. M. 2012. “Intereference of storage temperatures in the development of mesophilic, psychrotrophic, lipolytic and proteolytic microbiota of raw milk”. *Semina: Ciências Agrárias* 33, núm. 1: 333–342. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n1p333>
- Poltronieri, P. (Ed.). 2017. *Microbiology in Dairy Processing*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119115007>
- Revilla R., A. 1996. *Tecnología de la leche* (3. ed. rev). Escuela Agrícola Panamericana.
- Schmiedt, J. A., Tadielo, L. E., Bellé, T. H., Rodrigues, C. D., Montanhini, M. T. M., Barcellos, V. C. y Bersot, L. D. S. 2020. “Influence of time and storage temperature on raw milk deteriorating microbiota”. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 57(1), e156883. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2020.156883>
- Sharma, P., Bremer, P., Oey, I. y Everett, D. W. 2014. “Bacterial inactivation in whole milk using pulsed electric field processing”. *International Dairy Journal* 35, núm. 1: 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.10.005>
- Tirloni, E., Stella, S., Celandroni, F., Mazzantini, D., Bernardi, C. y Ghelardi, E. 2022. “Bacillus cereus in Dairy Products and Production Plants”. *Foods (Basel, Switzerland)* 11, núm. 17. <https://doi.org/10.3390/foods11172572>
- Toss Ekmyr, E. 2020. *Total Proteolysis in Bovine Raw Bulk Milk of Northern Sweden*. Swedish University of Agricultural Sciences. https://stud.epsilon.slu.se/16358/4/toss_ekmyr_e_210105%20%281%29.pdf
- United Nations Environment Programme. 2024. Optimizing food processing to reduce waste and achieve the Sustainable Development Goals. <https://www.unep.org>
- Wehr, H. M. y Frank, J. F. 2004. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (17th edition). American Public Health Association.
- Yalaw, K., Pang, X., Huang, S., Zhang, S., Yang, X., Xie, N., Wang, Y., Lv, J. y Li, X. 2024. “Recent Development in Detection and Control of Psychrotrophic Bacteria in Dairy Production: Ensuring Milk Quality”. *Foods (Basel, Switzerland)* 13, núm. 18. <https://doi.org/10.3390/foods13182908>
- Yuan, L., Sadiq, F. A., Burmølle, M., Wang, N. I. y He, G. 2019. “Insights into Psychrotrophic Bacteria in Raw Milk: A Review”. *Journal of Food Protection* 82, núm. 7: 1148–1159. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-032>
- Zamora, A. y Ferragut, V [V.] 2013. “Changes in rheology and microstructure of skim milk during refrigerated storage: Impact of acidification and microbial growth”. *International Dairy Journal* 2, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.12.007>
- Zarei, M., Elmi Anvari, S., Maktabi, S., Saris, P. E. J., & Yousefvand, A. 2023. “Identification, proteolytic activity quantification and biofilm-forming characterization of Gram-positive, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from cold raw milk”. *Plos one* 18, núm. 9. e0290953.