

# UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Programa de doctorado:  
BIOCIENCIAS Y CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

Título de la tesis:  
**EVALUACIÓN DE LOS FACTORES DE  
PRODUCCIÓN PRIMARIA Y TRANSFORMACIÓN  
INDUSTRIAL SOBRE LA CALIDAD Y SEGURIDAD  
MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE**

Directores:

ANTONIO VALERO DÍAZ

FERNANDO PÉREZ-RODRÍGUEZ

Responsable designado por la empresa:

MANUELA HERNANDEZ GARCÍA

Tesis presentada por:

LUCÍA REGUILLO GRANADOS

Fecha de depósito Tesis en IDEP: 11/10/2020

TITULO: *EVALUACIÓN DE LOS FACTORES DE PRODUCCIÓN PRIMARIA Y TRANSFORMACION INDUSTRIAL SOBRE LA CALIDAD Y SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE*

AUTOR: *Lucía Reguillo Granados*

---

© Edita: UCOPress. 2021  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es>

---





**TÍTULO DE LA TESIS:** EVALUACIÓN DE LOS FACTORES DE PRODUCCIÓN PRIMARIA Y TRANSFORMACIÓN INDUSTRIAL SOBRE LA CALIDAD Y SEGURIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE

**DOCTORANDO:** Dña. Lucía Reguillo Granados

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

La presente Tesis Doctoral se presenta en la modalidad de doctorado con mención Industrial en el título de Doctor, según el artículo 15 bis del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado, cumpliendo las circunstancias reflejadas en su texto, ya que la línea principal de investigación ha sido llevada a cabo en la Cooperativa Ganadera del Valle de los Pedroches (COVAP), en el marco del Programa de ayudas a Doctores en Empresas concedidas por el ceiA3, y financiadas a través del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte y Santander Universidades. Gracias además a los recursos propios aportados por la empresa COVAP, así como por el grupo HIBRO de la Universidad de Córdoba: PAIDI AGR-170, se pudo disponer de todo el material fungible y equipamiento necesario para la realización de las actividades experimentales. De este modo, todo el trabajo de campo y de laboratorio ha sido llevado a cabo íntegramente en las instalaciones de la empresa, así como en el Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba (Grupo HIBRO). Por otro lado, la recogida de muestras ha sido realizado en diferentes explotaciones situadas en el Valle de los Pedroches y adscritas a la empresa. Se trata, por tanto, de un claro ejemplo de investigación aplicada al sector industrial y cuya finalidad es la formación en el tejido productivo de personas cualificadas y de alto rigor científico que sean capaces de llevar a cabo actividades de I+D+i de forma continuada.

Con una filosofía orientada al origen y la tradición, mejorada con la tecnificación, innovación y eficiencia, COVAP ha permitido que en su seno se desarrollen proyectos de mejora como el que se expone en la Tesis. Uno de los grandes desafíos de la empresa reside en mejorar desde el punto de vista microbiológico la leche cruda, para ofrecer al consumidor un producto con mejores características organolépticas, con mayor frescura y garantías de estabilidad tras su envasado y almacenamiento a lo largo de toda su vida útil.

Para abordar dicho objetivo, la Tesis Doctoral se ha enfocado en proporcionar un marco de conocimiento sobre la cadena de producción de leche, incluyendo las fases previas al tratamiento térmico de la leche cruda. Dicho marco engloba el control de calidad y microbiología, así como aspectos comerciales y de consumo de la cadena de producción de la leche.

Con esta base, el enfoque de la Tesis está justificado hacia los sistemas de gestión de calidad, la monitorización de los recuentos microbiológicos a lo largo de la cadena y la investigación del efecto de ciertas medidas en los mismos. La presente Tesis aporta una profunda actualización sobre el efecto de los factores relacionados con la fase de obtención de leche cruda y su repercusión sobre la calidad y seguridad del producto final. Para ello, el desarrollo y aplicación de modelos de microbiología predictiva y evaluaciones de riesgo microbiológico a lo largo de la cadena de producción láctea se postulan como herramientas imprescindibles para la modernización de los sistemas de gestión de calidad y mejora de la salud pública.

El contenido de la Tesis Doctoral se divide en siete capítulos, de los que tres consisten en los resultados obtenidos a lo largo de la investigación.

> El Capítulo 4 se titula: Propuesta de medidas de control de calidad en la cadena de producción de leche, y parte de su contenido ha sido publicado como poster y comunicación oral en el XX Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos (SEM).

> El Capítulo 5 se titula: Evaluation of the Influence of Frequency of Milk Collection and Milking Dayshift on the Microbiological Quality of Raw Milk, y ha sido objeto de una publicación como artículo científico en Journal of Food Quality. Parte de su contenido ha sido también presentado como póster en el International Conference of Predictive Modelling in Food (2017).

> El Capítulo 6 se titula: Food Quality Management Systems in the Dairy Industry: A Case Study on the Application of Predictive Microbiology in the Microbial Quality of Milk, y ha sido publicado como capítulo en el libro con título “Technological Approaches for Novel Applications in Dairy Processing”. Parte de su contenido ha sido también presentado como póster en el VII Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba.

La Tesis Doctoral se ha llevado a cabo desde un enfoque multidisciplinar a lo largo de cuatro años de estudio (2015-2019), utilizando métodos oficiales de detección y cuantificación de microorganismos en leche a partir de muestras de leche cruda en las tres distintas etapas de la cadena: granjas, transporte e industria, así como herramientas de microbiología predictiva, y evaluación de riesgos, a lo que hay que sumar un considerable número de visitas a explotaciones ganaderas para la obtención de muestras para analíticas físico-químicas y microbiológicas y mejora y de sistemas de autocontrol en la empresa. Los resultados generados en el presente estudio constituyen una fuente de información relevante para la comunidad científica, el sector industrial y las autoridades sanitarias en materia de calidad y seguridad alimentaria, siendo la base a su vez para el desarrollo de futuros trabajos científicos

Por todo ello, se autoriza la presentación de la Tesis Doctoral.

Córdoba, 06 de Octubre de 2020

Firmado digitalmente  
por VALERO DIAZ  
ANTONIO -  
50869563A  
Fecha: 2020.10.06  
14:48:10 +02'00'

**Fdo.: D. Antonio Valero Díaz**

Firmado por PEREZ RODRIGUEZ  
FERNANDO - 30825948Z el día  
06/10/2020 con un certificado emitido por  
AC FNMT Usuarios

**Fdo.: D. Fernando Pérez Rodríguez**

# UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Programa de doctorado:  
BIOCIENCIAS Y CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

Título de la tesis:  
**EVALUACIÓN DE LOS FACTORES DE  
PRODUCCIÓN PRIMARIA Y TRANSFORMACIÓN  
INDUSTRIAL SOBRE LA CALIDAD Y SEGURIDAD  
MICROBIOLÓGICA DE LA LECHE**

Directores:

ANTONIO VALERO DÍAZ

FERNANDO PÉREZ-RODRÍGUEZ

Responsable designado por la empresa:

MANUELA HERNANDEZ GARCÍA

Tesis presentada por:

LUCÍA REGUILLO GRANADOS

Fecha de depósito Tesis en IDEP: 11/10/2020



# AGRADECIMIENTOS

Al grupo Higiene Bromatológica (PAIDI AGR 170 - HIBRO) por su asesoramiento y supervisión, en especial a mis directores de Tesis, por su paciencia, comprensión y disponibilidad.

Al Centro de Investigación y Calidad Agroalimentaria de los Pedroches (CICAP) por ceder sus instalaciones para las analíticas, a las personas que colaboraron en la investigación y en especial a Manuela Hernández, persona responsable de mi Tesis en la empresa, por su capacidad de resolución y generosidad.

Al ceiA3 por ofrecer becas para la incorporación de Doctores en Empresas, a través de la financiación del Santander y MINECO. Gracias por esta oportunidad para las empresas y doctorandos.

A la Sociedad Cooperativa del Valle de los Pedroches, (COVAP), empresa que me acogió durante la beca “Doctores en Empresas”. En especial agradecer su apoyo a D<sup>o</sup> Ricardo Delgado Vizcaíno y D<sup>o</sup> José María Calero quienes siempre estuvieron dispuestos a ofrecer la ayuda necesaria para acabar mi Tesis. No puedo olvidarme de su departamento de I+D, servicios técnicos de vacuno de leche, el departamento de cogeneración, el departamento de calidad, en especial recepción de cisternas y a los socios y transportistas que forman parte de esta gran familia.

Por último, quiero agradecer a mis seres queridos la fuerza e interés que me han demostrado, pues nunca han dejado de creer en mí. Este es el resultado de mi trabajo, pero también de vuestro apoyo y cariño.

GRACIAS DE TODO CORAZÓN.

# INDICE

AGRADECIMIENTOS	1
INDICE DE TABLAS	1
INDICE DE FIGURAS	3
LISTA DE ABREVIATURAS	5
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. SITUACIÓN ACTUAL Y TENDENCIAS DE PRODUCCIÓN Y CONSUMO EN EL SECTOR LÁCTEO DE VACUNO	11
2.2. ASPECTOS NUTRICIONALES Y VALOR BIOLÓGICO DE LA LECHE	20
2.3. ALTERACIONES, ADULTERACIONES, Y PELIGROS DE LA LECHE	29
2.4. DESCRIPCIÓN DE LA CADENA DE PRODUCCIÓN LÁCTEA	47
2.5. SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE LECHE	52
2.6. ETIQUETADO	64
2.7. HERRAMIENTAS PARA EL CONTROL Y LA MEJORA DE LOS SISTEMAS DE GESTIÓN DE CALIDAD DE LA LECHE	65
CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	76
CAPÍTULO 4. PROPUESTA DE MEDIDAS DE CONTROL DE CALIDAD EN LA CADENA DE PRODUCCIÓN DE LECHE	81
4.1. RESUMEN	81
4.2. INTRODUCCIÓN	82
4.3. MATERIAL Y MÉTODOS	84
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	90
4.5. CONCLUSIÓN	97
CAPÍTULO 5. EVALUATION OF THE INFLUENCE OF FREQUENCY OF MILK COLLECTION AND MILKING DAYSHIFT ON THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF RAW MILK	102
5.1. ABSTRACT	102
5.2. INTRODUCTION	102
5.3. MATERIALS AND METHODS	104
5.4. RESULTS AND DISCUSSION	108
5.6. CONCLUSIONS	117

CAPÍTULO 6. FOOD QUALITY MANAGEMENT SYSTEMS IN THE DAIRY INDUSTRY: A CASE STUDY ON THE APPLICATION OF PREDICTIVE MICROBIOLOGY IN THE MICROBIAL QUALITY OF MILK	122
6.1. ABSTRACT	122
6.2. INTRODUCTION	123
6.3. QUALITY MANAGEMENT SYSTEM OF THE DAIRY PRODUCTION CHAIN	124
6.4. CASE STUDY ON THE APPLICATION OF PREDICTIVE MICROBIOLOGY TOOLS TO DETERMINE THE EFFECT OF PRODUCTION CHAIN CONDITIONS ON THE MICROBIAL QUALITY OF MILK	128
6.5. CONCLUSIONS	137
CAPÍTULO 7. REFLEXIÓN FINAL Y CONCLUSIONES	141
CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA	148

# INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características de las explotaciones de vacas lecheras por comunidad autónoma en 2019 .....	17
<b>Tabla 2.</b> Promedio de la composición básica de nutrientes de la leche comparada entre especies .....	20
<b>Tabla 3.</b> Contenido medio de distintos minerales en leche de vaca .....	23
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de microorganismos según sus necesidades de oxígeno .....	31
<b>Tabla 5.</b> Clasificación de peligros/alteraciones por fase de la cadena .....	32
<b>Tabla 7.</b> Composición media de leche y leche en polvo .....	40
<b>Tabla 8.</b> Descripción de los principales sistemas antimicrobianos de la leche .....	42
<b>Tabla 9.</b> Rangos de temperatura (° C) para el crecimiento de los distintos tipos de microorganismos .....	44
<b>Tabla 10.</b> Comparativa entre los elementos del PCH y APPCC .....	54
<b>Tabla 11.</b> Definición de términos incluidos en el APPCC según el Codex Alimentarius.....	55
<b>Tabla 12.</b> Clasificación del nivel de riesgo en función de la probabilidad y gravedad .....	56
<b>Tabla 13.</b> Preguntas y respuestas de un árbol de decisiones (P0, P1, P2 y P3) donde las respuestas previas determinan las preguntas posteriores en la serie .....	57
<b>Tabla 14.</b> Valores aceptables del control de calidad y de composición de la leche cruda.....	61
<b>Tabla 15.</b> Descripción de las tres etapas del Análisis del riesgo microbiológico .....	69
<b>Tabla 16.</b> Número de ordeños, horarios y censo de vacas en ordeño de las ganaderías participantes en el estudio .....	86
<b>Tabla 17.</b> Tiempos de duración medios (P) y temperaturas medias (T) alcanzadas en cada periodo identificado por fluctuación de temperatura .....	90
<b>Tabla 18.</b> Recuentos de microorganismos (UFC/mL) de cada ganadería tras primer ordeño (MAB1 y PSI1) y último ordeño (MAB2 y PSI2) .....	91
<b>Tabla 19.</b> Comparativa de los recuentos de bacterias totales (MAB) obtenidos para recogida cada 48 horas (48 h) y recogida cada 24 horas (24 h) en la fase de cisternas y silos (UFC/mL) .....	94
<b>Tabla 20.</b> Reducción de los recuentos de bacterias totales (MAB) obtenidos en cada tipo de recogida (48h y 24h) para cisternas y silos, expresando en porcentaje (%).....	95
<b>Tabla 21.</b> Medias de punto crioscópico obtenido para las muestras recogidas cada 48 horas y cada 24 horas en cada etapa (cisternas y silos) .....	97

<b>Table 22:</b> Mesophilic aerobic bacteria (MAB, CFU/mL) and psychrotrophic bacteria (PSI, CFU/mL) counts obtained according to the frequency of milk collection (24 and 48 h) .....	109
<b>Table 23:</b> Mesophilic aerobic bacteria (MAB, CFU/ml) and psychrotrophic bacteria (PSI, CFU/ml) counts obtained according to the milking dayshift (morning and evening).....	112
<b>Table 24:</b> Percentage of samples according to the quality standards of the industry and frequency of milk collection (24 and 48 h) for mesophilic aerobic bacteria (MAB) and psychrotrophic bacteria (PSI) .....	113
<b>Table 25:</b> Percentage of samples according to the quality standards of the industry and milking dayshift (morning and evening) for mesophilic aerobic bacteria (MAB) and psychrotrophic bacteria (PSI) .....	113
<b>Table 26:</b> Total energy savings expressed as key performance index (KPI) during 2015 (typical heat treatment) and 2016 (heat treatment reducing 4° C) and percentage savings per unit of energy.....	115
<b>Table 27.</b> Classification of hazards according to their level of tolerance based on their occurrence probability and importance .....	127
<b>Table 28.</b> Description of the profile of selected experts .....	131
<b>Table 29.</b> Representative values for temperature (C) and time (h) along the different steps from farm to industry for the milk production chain and initial concentration of <i>Pseudomonas</i> spp. at farm (log CFU/ml) [28] .....	133

# INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución de la producción de leche por regiones o continentes ..	11
<b>Figura 2.</b> Evolución de la producción de leche de vaca en la UE durante el periodo 2001 – 2015 en relación con la cuota láctea .....	13
<b>Figura 3.</b> Comparativa en los años 2016, 2017, 2018 y 2019 de la producción anual de leche de vaca.....	15
<b>Figura 4.</b> Evolución del consumo mundial de lácteos relacionando los litros consumidos per cápita con la población mundial .....	18
<b>Figura 5.</b> Modelo que representa la estructura de la caseína de la leche .....	21
<b>Figura 6.</b> Glóbulos grasos de leche de vaca al microscopio y estructura de la membrana .....	22
<b>Figura 7.</b> Prevalencia mundial de intolerancia a la lactosa.....	28
<b>Figura 8.</b> Tanque en granja con leche refrigerada a punto de ser recogida por el camión cisterna .....	49
<b>Figura 9.</b> Camión cisterna efectuando la recogida de leche en el tanque a través de una manguera conectada al mismo (ver Figura 8) .....	51
<b>Figura 10.</b> Esquema del árbol de decisiones sobre puntos críticos de control (PCCs).....	57
<b>Figura 11.</b> Representación de la curva de crecimiento microbiano .....	66
<b>Figura 12.</b> Etapas para el desarrollo de un modelo .....	68
<b>Figura 13.</b> Esquema de las etapas de un proceso dosis – respuesta .....	70
<b>Figura 14.</b> Esquema de las fases de la cadena de producción de leche y número de ordeños .....	87
<b>Figura 15.</b> Representación gráfica de la comparación de recuentos medios de MAB y PSI de primer ordeño (MAB1 y PSI1) y último ordeño (MAB2 y PSI2) en ganaderías con dos ordeños (24h) y ganaderías con cuatro ordeños (48h) ....	92
<b>Figure 16:</b> Steps in the milk primary production chain from the farm to the dairy industry considering two frequencies of milk collection at the farm (i.e., 24 and 48 h) .....	105
<b>Figure 17:</b> Graphical representation of milk production (liters) and the key performance index (KPI) during the 8-month study period, comparing 2015 (+4° C) and 2016 (-4° C) .....	116
<b>Figure 18:</b> Graphical representation of megawatt consumption (MW) during the 8-month study period, comparing 2015 (+4° C) and 2016 (-4° C) .....	116
<b>Figure 19.</b> Flow diagram showing the stages considered for the exposure assessment model .....	130
<b>Figure 20.</b> Simulated output distribution for final concentration of <i>Pseudomonas</i> after silo storage and before heat treatment at industry obtained using MicroHibro software.....	135
<b>Figure 21.</b> Simulated percentiles for the concentration of <i>Pseudomonas</i> versus storage time (h). The blue and yellow lines represent for the 99th and 5th percentiles, respectively .....	135

**Figure 22.** Simulated percentiles for the concentration of *Pseudomonas* versus storage temperature (° C). The blue and yellow lines represent for the 99th and 5th percentiles, respectively ..... 136

# LISTA DE ABREVIATURAS

<b>24h</b>	Recogida de leche cada 24 horas
<b>48h</b>	Recogida de leche cada 48 horas
<b>AEMPS</b>	Agencia Española del Medicamento y Productos sanitarios
<b>AESAN</b>	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria y Nutrición
<b>APPCC</b>	Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico
<b>ATP</b>	Acuerdo sobre transporte de productos
<b><math>a_w</math></b>	Actividad agua
<b>BAL</b>	Bacterias ácido-lácticas
<b>CE</b>	Comisión Europea
<b>CFU</b>	Unidad formadora de colonias (en capítulos 5 y 6 en inglés)
<b>CMT</b>	California mamitis test
<b>CO</b>	Control Oficial
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization
<b>FENIL</b>	Federación Nacional de Industrias Lácteas
<b>HPLC/PAD</b>	High-performance Liquid Chromatography with Pulsed Amperometric Detector
<b>HRS</b>	Heat Resistant Spores
<b>IFCN</b>	International Farm Comparison Network
<b>IFS</b>	International Food Standard
<b>ISO</b>	International Organization for Standardization
<b>LETRA Q</b>	LEche cruda de vaca, TRAzabilidad y Qualidad
<b>MAPA</b>	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
<b>MARM</b>	Ministerio de Agricultura, Medio Rural y Marino

<b>MAB</b>	Microorganismos Aerobios Mesófilos
<b>OCM</b>	Organización Común de Mercados
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>PAC</b>	Política Agraria Común
<b>PCH</b>	Prácticas Correctas de Higiene
<b>PSI</b>	Microorganismos psicrotrofos
<b>RCS</b>	Recuento de células somáticas
<b>RENGRATI</b>	Red Nacional de Granjas Típicas
<b>UE</b>	Unión Europea
<b>UHT</b>	Ultra High Treatment



# CAPÍTULO 1

---

## Introducción



# CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La Tesis doctoral se presenta en la modalidad de doctorado con mención Industrial en el título de Doctor, según el artículo 15 bis del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado, cumpliendo las circunstancias reflejadas en su texto, ya que la línea principal de investigación ha sido llevada a cabo en la Cooperativa Ganadera del Valle de los Pedroches (COVAP), en el marco del Programa de ayudas a Doctores en Empresas concedidas por el ceiA3, y financiadas a través del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte y Santander Universidades. La tipología de doctorado industrial surge de la necesidad de consolidar la colaboración científica y tecnológica con empresas e industrias, favoreciendo la incorporación de personas con una alta cualificación que promuevan la innovación en las empresas e industrias.

Por su parte, COVAP es una cooperativa de primer grado que se crea en 1959, a través de un grupo de ganaderos en el Valle de los Pedroches. Está situada al norte de la provincia de Córdoba y su actividad se inició con el objetivo de negociar mejores precios de cereales para sus animales a través de compras conjuntas, concentrar la oferta de sus producciones y obtener mejores precios de venta para sus productos. Desde entonces hasta ahora, la Cooperativa ha experimentado un crecimiento enorme, consagrándose como una de las más importantes cooperativas andaluzas con más de 800 trabajadores, una facturación de 476 millones de euros en 2019, y una producción de leche de 977.000 toneladas. La estructura cooperativa promueve la concentración de la oferta, permitiendo una mayor competitividad en el mercado al integrar diferentes eslabones de la cadena, lo que le permite recoger el valor añadido de los productos de sus socios, contribuyendo a fijar el tejido social de las zonas rurales que abarca. Con una filosofía orientada al origen y la tradición, mejorada con la tecnificación, innovación y eficiencia, COVAP ha permitido que en su seno se desarrollen proyectos de mejora como el que se expone en la Tesis.

De entre aquellos proyectos, y como firme compromiso de calidad con el consumidor, nació el desafío de mejorar desde el punto de vista microbiológico

la leche cruda, para ofrecer al consumidor un producto con mejores características organolépticas, con mayor frescura y garantías de estabilidad tras su envasado y almacenamiento a lo largo de toda su vida útil.

Para abordar dicho objetivo, la Tesis Doctoral se ha enfocado en proporcionar un marco de conocimiento sobre la cadena de producción de leche, incluyendo las fases previas al tratamiento térmico de la leche cruda. Dicho marco se basa en aspectos comerciales, de consumo y de producción, así como de la cadena de producción de leche, control de calidad y microbiología.

La necesidad de una Tesis enfocada en los objetivos anteriormente descritos es consecuencia por un lado de su peso en el sector agroalimentario y, por otro, del desafío que asume a diario el departamento de calidad de la industria láctea, al liberar productos aptos para consumo y con garantías sanitarias. En este sentido, la producción de leche representa un sector con particularidades que merece la pena señalar. Por un lado, forma parte del sector agrario, que se caracteriza por ser uno de los sectores económicos con especial carácter estratégico, dada la necesidad de abastecer de alimentos a una sociedad creciente, y demandante a su vez de seguridad alimentaria y calidad. De esta manera, la producción y comercialización de la leche en óptimas condiciones sanitarias, organolépticas y nutricionales se convierten en uno de los principales compromisos no sólo de COVAP sino de cualquier industria láctea.

La producción de alimentos, y concretamente, la producción de leche implica una cadena en la que distintos eslabones intervienen en su obtención, lo que puede comprometer la calidad microbiológica de la leche cruda, la cual, al mismo tiempo es rica en nutrientes *per se*, y un medio idóneo para la proliferación de microorganismos. La inelasticidad de la oferta y la demanda que caracteriza al sector agroalimentario implica eventuales desajustes en la planificación industrial, lo que en ocasiones puede retrasar el tratamiento térmico y, por tanto, la eliminación de la mayor parte de estos microorganismos, permitiendo un crecimiento exponencial y proporcional al tiempo de espera previo a dicho tratamiento. La proliferación microbiana puede provocar efectos a medio – largo plazo en la leche a pesar de que el tratamiento térmico acabe con su viabilidad y todo ello dificulta que la garantía ofrecida por la industria sea completa incluso

tras el tratamiento térmico y envasado. Hay que tener en cuenta, además, el potencial impacto de una toxiinfección ocasionada por un producto alimenticio en el consumidor, la cual puede llevar a consecuencias en la seguridad alimentaria, pérdida de confianza y consiguiente rechazo del consumidor respecto a la empresa o industria con las correspondientes repercusiones económicas.

Por todo lo anterior, se justifica el enfoque de la Tesis hacia los sistemas de gestión de calidad, la monitorización de los recuentos microbiológicos a lo largo de la cadena y la investigación del efecto de ciertas medidas en los mismos. Por tanto, a través de la presente Tesis, se aporta una profunda actualización sobre el efecto de los factores relacionados con la fase de obtención de leche cruda y su repercusión sobre la calidad y seguridad del producto final.

Su contenido se divide en siete capítulos, de los que tres consisten en los resultados obtenidos a lo largo de la investigación. El Capítulo 4 se titula: **Propuesta de medidas de control de calidad en la cadena de producción de leche**, y parte de su contenido ha sido publicado como poster y comunicación oral en el **XX Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos (SEM)**. El Capítulo 5 se titula: **Evaluation of the Influence of Frequency of Milk Collection and Milking Dayshift on the Microbiological Quality of Raw Milk**, y ha sido objeto de una publicación como artículo científico en **Journal of Food Quality**. Parte de su contenido ha sido también presentado como póster en el **International Conference of Predictive Modelling in Food**. El Capítulo 6 se titula: **Food Quality Management Systems in the Dairy Industry: A Case Study on the Application of Predictive Microbiology in the Microbial Quality of Milk**, y ha sido publicado como capítulo en el libro con título **Technological Approaches for Novel Applications in Dairy Processing**. Parte de su contenido ha sido también presentado como póster en el **VII Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba**.

La revisión bibliográfica se ha centrado en la importancia de la leche y sector lácteo a nivel mundial, comunitario y nacional, abordando aspectos comerciales, de consumo y producción de leche de vaca, lo que pone de manifiesto el impacto económico que este tipo de alimento genera en todos los niveles. Se incluye a continuación una revisión específica de las características de la leche y los aspectos microbiológicos y peligros que intervienen en la calidad y seguridad alimentaria de las industrias lácteas, así como de los factores que afectan a la proliferación de microorganismos en la leche cruda. Dicho contenido se completa con una descripción de la cadena de producción de leche, dividida en tres fases: producción primaria en granjas, transporte y transformación industrial, y los sistemas de gestión de la calidad de la cadena de producción, los cuales permiten la detección de riesgos y la aplicación y evaluación de medidas de gestión conducentes a su mitigación y/o eliminación. Finalmente, la revisión incluye un resumen de las principales herramientas y actuaciones dirigidas a detectar, cuantificar y/o predecir los riesgos en los alimentos, como los modelos predictivos y la evaluación del riesgo.

La matriz investigada en la Tesis ha sido la leche, término que se aplica en su contexto, única y exclusivamente a la leche natural de vaca, siendo la leche de otras especies diferentes a la de vaca, designada especificando el nombre de la especie correspondiente. La investigación que en este trabajo se presenta, se inicia con el propósito de minimizar las incidencias con respecto a la calidad y seguridad alimentaria de la leche envasada. Cabe decir en este sentido que, tras el tratamiento térmico de la leche cruda, ya sea mediante UHT o pasteurización, la mayor parte de microorganismos presentes en la leche son eliminados dando lugar a un producto apto para consumo y, por tanto, para ser envasado de manera aséptica en condiciones normales. Sin embargo, a pesar de la eliminación y/o inactivación de la mayoría de estos microorganismos, existen especies capaces de producir esporas termorresistentes (HRS) y/o enzimas con capacidad lipolítica y proteolítica, las cuales pueden provocar alteraciones en producto estéril y envasado, a medio o largo plazo. Esto supone un grave problema para las industrias lácteas, al liberar productos que en el momento de liberación resultan aptos para consumo y de calidad y que, al cabo del tiempo, manifiestan evidencias de alteración que afectan a su calidad organoléptica.

Con el objetivo de detectar factores predisponentes a los que se pudieran atribuir eventuales incidencias, se planteó aplicar la medida de recogida diaria (cada 24 horas) que implicaba incrementar la frecuencia de recogida de leche por parte de los camiones cisterna en granjas y, por tanto, los estudios estarían encaminados a comparar los recuentos microbiológicos de la recogida 24h frente a la recogida convencional (cada 48 horas). Como estudio inicial se planteó conocer la fluctuación de temperatura que puede experimentar la leche en los tanques según su eficiencia, mediante la monitorización de rampas de temperatura y los recuentos microbiológicos a lo largo de los 4 ordeños que tienen lugar antes de la recogida convencional, es decir, cuando la recogida de leche por parte de los camiones cisterna se realiza cada dos días (48h) y a lo largo de 2 ordeños, que se producían al implantar la medida de recogida diaria (24h). De este modo se obtuvo una propuesta para evaluar la eficiencia de refrigeración de los tanques en las granjas, cuyos resultados permiten realizar ajustes o propuestas adaptadas a las deficiencias detectadas,

Habiendo evaluado el funcionamiento de los tanques, se propuso analizar los recuentos obtenidos en la leche refrigerada de los tanques, comparando los recuentos de la leche recogida 48h con los recuentos de la leche recogida 24h. Este estudio se amplió a las fases posteriores para comparar los recuentos de mesófilos totales para cada fase (granjas, transporte e industria), así como la posible influencia de la recogida diaria en parámetros como el punto crioscópico de la leche. Los resultados se incorporan junto a los anteriores en un mismo capítulo, a modo de propuesta conjunta de control de calidad (Capítulo 4).

A continuación, se enfocó el estudio a seguir evaluando el efecto de la medida de recogida diaria en granjas en base al recuento no sólo de mesófilos totales sino también de especies microbianas con capacidad psicrotrófica y detectar diferencias significativas entre los recuentos obtenidos asociados a determinados factores (Capítulo 5). En este sentido, el análisis estadístico realizado ha permitido demostrar que existen diferencias significativas entre los recuentos microbianos obtenidos en el ordeño de la mañana, comparado con el de la tarde, que resultaron mayores. Este estudio ha permitido además cuantificar el impacto económico que generó dicha medida como consecuencia

de una reducción de temperatura usada para el tratamiento UHT, motivada por la mejora microbiológica de la leche asociada a la recogida diaria.

Finalmente, los resultados de los estudios anteriores, tanto de monitorización de tanques como de la evaluación del impacto de la medida de recogida diaria en los recuentos microbiológicos de la leche, sugirieron la necesidad de aportar una revisión de los Sistemas de Gestión de la Calidad de la Leche, así como de añadir un ejemplo del comportamiento de los microorganismos psicrotrofos en la leche bajo distintas condiciones de almacenamiento, que facilitará la predicción de su proliferación de manera cuantitativa para el establecimiento de límites de seguridad en cuanto a las condiciones de almacenamiento (temperatura y tiempo). Esto se llevó a cabo mediante el desarrollo de un modelo de evaluación de exposición para *Pseudomonas fluorescens* sobre su crecimiento ante distintas condiciones de almacenamiento (Capítulo 6).

Para concluir con la Tesis, se realizó una recopilación de conclusiones basada en los resultados obtenidos y presentados como capítulos, siguiendo la secuencia real que ha tenido lugar dentro de la investigación.

Para los objetivos anteriormente planteados se utilizaron los métodos oficiales de detección y cuantificación de microorganismos en leche a partir de muestras de leche cruda en las tres distintas etapas de la cadena: granjas, transporte e industria. Se recogieron muestras del tanque en las granjas, en las cisternas de los camiones en el transporte y en los silos de recepción en la industria. Para la toma de muestras se siguieron las pautas recogidas en el Real Decreto 1728/2007.

Respecto al estudio de evaluación de la refrigeración de la leche en los tanques, se utilizaron equipos Datalogger para su medición, cuya sonda permaneció sumergida en el tanque entre 30 – 50 h.

Por otro lado, se utilizaron los recursos actualmente disponibles para microbiología predictiva, que permitieron predecir el crecimiento de *P. fluorescens*, escogida como ejemplo de especie psicrotrofa, bajo distintas condiciones de almacenamiento. En los Capítulos 4, 5 y 6, se especifica con mayor detalle la metodología empleada para cada estudio, como la

monitorización de los tanques de refrigeración, los métodos analíticos tanto para el recuento de mesófilos aerobios totales (MAB) y microorganismos psicrotrofos (PSI) y, para medir el punto crioscópico de la leche, las herramientas utilizadas para los análisis estadísticos y para llevar a cabo el modelo predictivo.

Entre los principales resultados obtenidos de la presente Tesis, cabe destacar la mejora de la calidad de la leche obtenida tras aumentar la frecuencia de recogida de leche, reduciéndose en consecuencia el tiempo de almacenamiento de la misma (pasando de recogida 48h a 24h), tanto para MAB como para PSI.

En definitiva, como resultado de las citadas investigaciones, en la presente Tesis se ha tratado de ofrecer un mayor conocimiento sobre el comportamiento de los microorganismos presentes en la leche cruda a lo largo de la cadena y la influencia de su manipulación sobre dichos microorganismos, en cada fase. El estudio de ciertas medidas y estudios que se incluyen en el presente trabajo puede tener un impacto muy positivo en las industrias lácteas, por la información mostrada y aplicabilidad de esta.

A continuación, se muestra un diagrama que resume el contenido de la presente Tesis:

## 1ª PARTE: Revisión Bibliográfica

¿Cómo es el sector lácteo?

¿Qué características tiene la cadena de producción de leche?

¿Qué factores afectan a la calidad y seguridad alimentaria?

¿Qué controles son necesarios?

## 2ª PARTE: Resultados

### CAPÍTULO 4

Propuestas sobre medidas de calidad y de control en tanques y en fases posteriores al ordeño

### CAPÍTULO 5

Evaluación del impacto que determinados factores tienen en recuentos microbianos en tanques

### CAPÍTULO 6

Revisión de Sistemas de Gestión de Calidad de Leche: aplicación de los modelos predictivos

## 3ª PARTE: Conclusiones



# CAPÍTULO 2

---

## Revisión bibliográfica

## CAPÍTULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

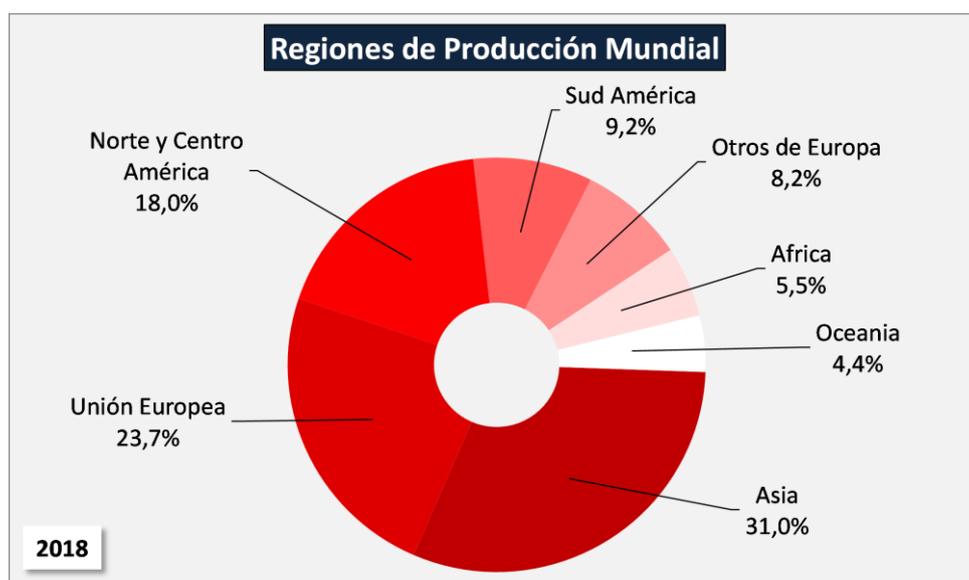
### 2.1. SITUACIÓN ACTUAL Y TENDENCIAS DE PRODUCCIÓN Y CONSUMO EN EL SECTOR LÁCTEO DE VACUNO

#### 2.1.1. Perspectiva histórica y situación actual de la producción láctea

A nivel mundial, la producción de leche de vaca constituye una de las producciones más extendidas por la gran evolución tecnológica que ha experimentado, así como por su presencia en la mayoría de los países en desarrollo en los que la leche es producida por agricultores con pocos animales, constituyendo su principal sustento.

La producción de leche de vaca a nivel mundial alcanzó 703 millones de toneladas en 2019, siendo la Unión Europea (UE), Asia y Norteamérica y América Central, los principales productores, tal y como se muestra en la Figura 1.

**Figura 1.** Distribución de la producción de leche por regiones o continentes



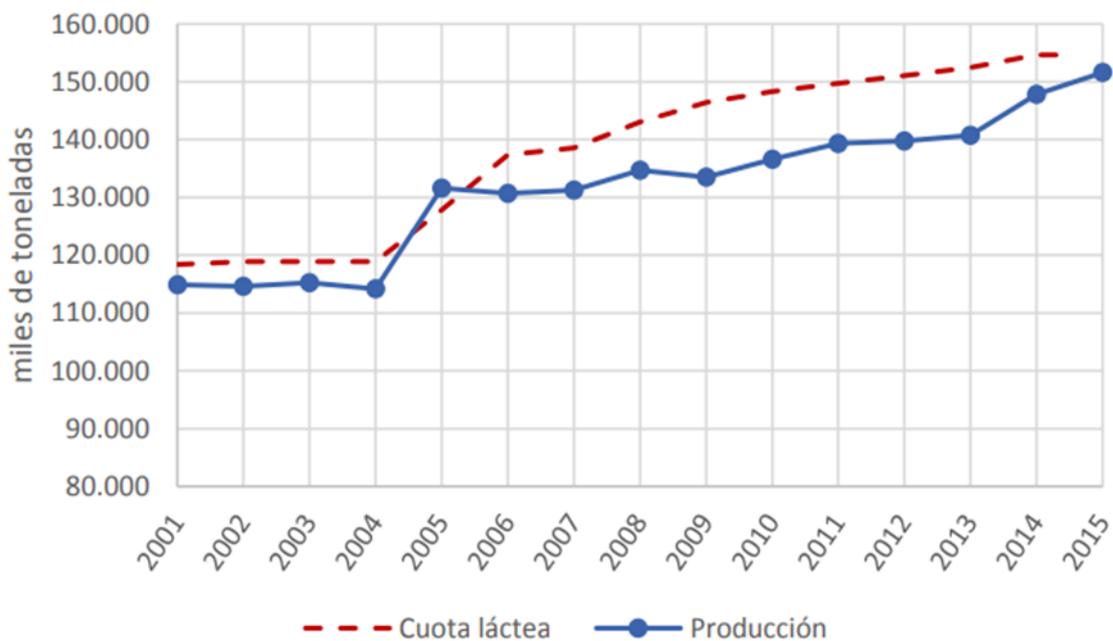
Fuente: FIL/IDF: World Dairy Situation 2019

A pesar de la importante producción de leche a nivel mundial y lo estratégico de su producción para determinadas regiones, la crisis económica se instaló en el sector primario debido al incremento de los costes de producción y la reducción de los márgenes de los ganaderos. En este sentido, las granjas lecheras de todo el mundo experimentaron de manera generalizada, una caída del precio de la leche del 33% en 2015 con respecto a años anteriores (IFCN Dairy Report, 2016). Por otro lado, según un estudio sobre tendencias y oportunidades del sector lácteo mundial (Deloitte, 2017), los países productores de leche se exponen a importantes retos como la urbanización y la limitación de cantidad de tierra cultivable, una población mundial creciente, mayor demanda de alimentos y necesidad de abastecimiento, el cambio climático y dependencia ambiental o la necesidad de fuentes alternativas de energía y de sostenibilidad. Para suplir el incremento que la demanda de productos lácteos ha ido experimentando en los últimos años, las granjas deben hacerse más productivas y tecnológicamente más avanzadas, lo cual no implica en cambio, un incremento del número de ganaderías, ya que este se ha visto reducido de manera importante según los datos recogidos a través de la Red IFCN, si no que estas cuenten con un elevado nivel productivo y un mayor número de animales en producción.

Dada la importancia del sector lechero en la UE, tuvo lugar la implantación precoz de la OCM a través del Reglamento (CEE) N° 804/1968, la cual incluyó diferentes regímenes de actuación, abarcando (i) los precios, (ii) las ayudas específicas, (iii) el apoyo al mercado y (iv) el intercambio con terceros países. Como consecuencia de estos regímenes, el sector lácteo se ha desarrollado dentro de un marco de estabilidad, que experimentó, en primer lugar, un incremento de las producciones por encima de lo esperable, provocando en segundo lugar, excedentes con un aumento de los gastos para darle salida a los mismos, por parte del órgano financiero existente en la época y equivalente al de la actual PAC. Dicha crisis de excedentes promovió el sistema de cuotas, la contención de precios y un ajuste en las estructuras de producción, ya que, con el objetivo de reducir los excedentes, se creó una corriente exportadora, originando tensiones comerciales generadas por una cuota de mercado por

encima de lo esperable en cuanto a competitividad directa. Por todo ello, y habiéndose expandido el sector durante más de una década, se desencadenó una cuota máxima de producción comunitaria, así como una tasa a abonar por los ganaderos según los volúmenes producidos que superaran la cantidad de referencia o cuota individual. Dicha situación ha tenido lugar desde la campaña 1984/85 hasta abril de 2015 (Reglamento (CE) 1308/2013). En 2003, la PAC experimentó una modificación relevante, basada por un lado en la disminución de precios de los productos intervenidos y cantidades que podrían acogerse al régimen de compra y/o almacenamiento a favor de los productos de mayor calidad. En este sentido, el sector lechero se incorpora al régimen de pago único, y continuó con el sistema de cuotas hasta la campaña 2014/2015, manteniéndose desde ese momento hasta la actualidad, libre de restricciones, tras la reconfiguración estructural experimentada por el sector. Este sistema ha dado lugar a un ajuste de la producción a la cuota láctea establecida a lo largo de los años, tal y como se muestra en la Figura 2, en base a datos de la Comisión Europea.

**Figura 2.** Evolución de la producción de leche de vaca en la UE durante el periodo 2001 – 2015 en relación con la cuota láctea



Fuente: RENGRATI, 2016

En relación con la OCM específica de la leche, se establece junto con el resto de los sectores en la OCM única a través del Reglamento (CE) 1234/2007, dando como resultado una nueva revisión en 2008 llamado Minipaquete lácteo.

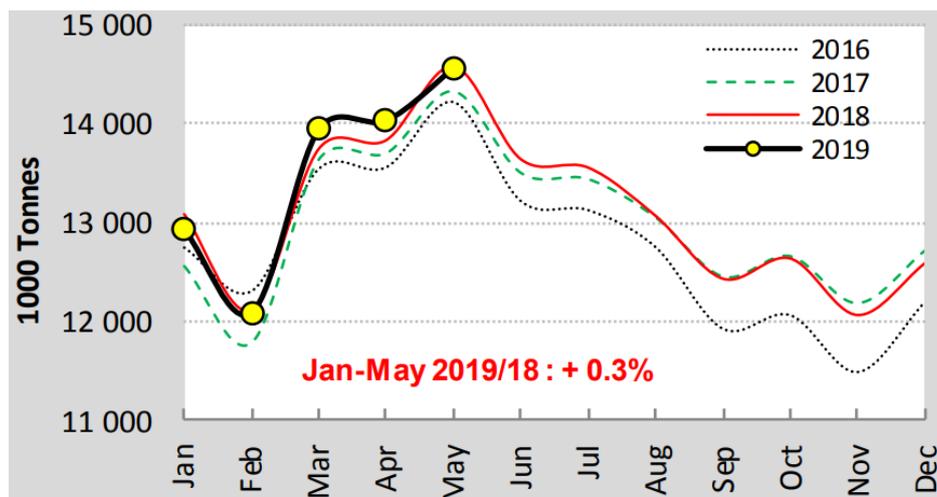
Haciendo balance de la situación de cuotas implantada para corregir los excedentes, la producción lechera mundial en los últimos años se ha incrementado un 22 %, beneficiándose Nueva Zelanda y Estados Unidos de la situación experimentada en Europa.

En la actualidad, según el Informe anual de producción láctea (European Commission, 2019), España contribuye a la producción láctea de la Unión Europea con un 4,5 %, es decir, más de 7 millones de toneladas, siendo el séptimo país productor de leche, tras Alemania, Francia, Reino Unido, Países Bajos, Italia y Polonia. Andalucía aporta aproximadamente un 8 %, justo por debajo de Asturias, Castilla y León, Cataluña y Galicia, que entre todas suponen casi el 80% del abastecimiento de leche en nuestro país. A pesar de que la contribución no es demasiado elevada, cabe resaltar que sigue una tendencia ascendente según datos recientes del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2020).

En cuanto a la evolución en el número de granjas destinadas a vacuno de leche en España, tras su incorporación en la UE a mediados de la década de los 80, el sector lácteo nacional se enfrentó a una reducción de ganaderías de vacuno de leche desde 1992 a 2018, pasando de 140,000 a 14,000 granjas. A pesar de ello, las granjas que han persistido cuentan con un mayor número de efectivos medios por explotación (40 - 50 vacas de ordeño) y mejores rendimientos, con una producción que se ha visto incrementada en 4.500 kg/lactación en 2018 respecto a 1992. De este modo se aprecia la mayor eficiencia de las ganaderías dedicadas a este tipo de producción lo que no sólo ocurre en España sino también en el resto de Europa. La mayor eficiencia experimentada por las ganaderías han sido consecuencia de un adecuado manejo reproductivo y sanitario (como por ejemplo la prevención de mamitis) así como la selección genética, factor que sin duda ha sido relevante en la obtención de ganaderías cada vez más eficientes. La mejora genética en vacuno de leche experimentada a lo largo de varias décadas ha permitido la selección de vacas

lecheras con una conformación y fisiología capaces de alargar la lactancia e incrementar los litros de leche producidos, optimizando no sólo los gastos en alimentación y sanidad, sino otros aspectos de su productividad como la precocidad de las hembras (Calo y cols, 1973). En la actualidad, las vacas destinadas a ordeño son capaces de producir 40 – 50 litros de leche al día durante un máximo de 305 días con 60 días de secado, lo que supone un intervalo entre partos de 365 días (Bach y Juaristi, 2008). Otro dato para tener en cuenta es que, analizando distintos años, la estacionalidad de este tipo de producción es evidente. No obstante, la mejora genética asociada a este tipo de producción, entre otros factores, deja patente cómo los picos de producción máxima en toneladas de leche producida en la UE se van incrementando con los años, tal y como se muestra en la Figura 3.

**Figura 3.** Comparativa en los años 2016, 2017, 2018 y 2019 de la producción anual de leche de vaca



Fuente: EU Milk Market Observatory, 2019

Con respecto al manejo del rebaño, es importante tener en cuenta el valor que actualmente ha cobrado el manejo de las novillas, para las que la edad de primer parto constituye un factor esencial para la rentabilidad de la ganadería ya que es el momento en el que empiezan a producir leche. Por ello, se llevan a cabo medidas que garantizan un buen desarrollo de las novillas para detectar el momento óptimo de primera cubrición, y se asocian a una mejora genética orientada a adelantar la precocidad sexual de las hembras (Rengrati, 2016).

Según datos de la Subsecretaría de Agricultura, Pesca y Alimentación, a través de la Subdirección General de Análisis, Coordinación y Estadística, en España, la cabaña ganadera de vacuno de leche se caracteriza por su alta productividad, contando con 849.405 vacas en ordeño y 14.860 productores de leche de vaca en 2018 (una media de 57 vacas por productor), que sumaron un volumen de más de 7 millones de toneladas de leche producida, un 2,4 % más que en 2017. Galicia es la región con mayor censo de vacas productoras de leche, seguida de Castilla y León, Cataluña y Asturias. Sin embargo, se ha experimentado una reducción del 17 % de ganaderos con entregas con respecto a 2015, lo que, sumado a un aumento de la producción de leche, ha hecho que la ganadería de vacuno de leche se haya tecnificado y profesionalizado en el caso de aquellos ganaderos que mantienen a sus vacas produciendo (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2020).

Por otro lado, existen diferencias entre censos de vacas y el tamaño del rebaño en función de la comunidad autónoma, siendo el clima y la disponibilidad de pastos, factores condicionantes de dichas diferencias.

Extraídos los siguientes datos del Informe de entregas de leche correspondiente al mes de enero de 2020 por parte del MAPA y con base legal en el Real Decreto 319/2015, y del Informe sobre la estructura del sector vacuno lechero en España y en la Unión Europea 2015-2018 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2020), en la Tabla 1 se exponen las características de las explotaciones españolas de vacas de leche, según las comunidades autónomas (CCAA) más relevantes en producción láctea. Estos datos han sido calculados en base a las distintas fuentes oficiales anteriormente citadas.

Con estos datos se pone de manifiesto la influencia de la situación geográfica y factores asociados a la misma, como la disponibilidad de pastos que condicionan el régimen de producción de leche, asociándose las explotaciones intensivas (aquellas con bajo número de granjas asociadas a un mayor número de cabezas por granja) a las comunidades autónomas sin pastos, como Cataluña, y explotaciones extensivas (con mayor número de granjas y menor número de cabezas por granja) a la cornisa cantábrica y Galicia, con mayor disponibilidad de pastos. Estas circunstancias obligan a los productores a

invertir en genética, instalaciones y manejo para hacer rentables sus ganaderías en zonas cuya climatología dificulta el ahorro de costes asociados a otras zonas con praderas disponibles durante la mayor parte del año (Rengrati, 2016).

**Tabla 1.** Características de las explotaciones de vacas lecheras por comunidad autónoma en 2019

<b>Comunidad Autónoma</b>	<b>Número de ganaderos con entregas</b>	<b>Total de leche producida (toneladas)</b>	<b>Porcentaje de producción por CCAA</b>	<b>Censo de vacas lecheras</b>
Andalucía	542	577.775	8,0	58.219
Asturias	1.761	548.866	7,6	74.853
Cantabria	1.219	433.316	6,0	66.536
Castilla y León	1.084	909.963	12,6	99.804
Cataluña	406	758.303	10,5	83.170
Galicia	7.454	2.780.444	38,5	324.363

Elaboración propia

### 2.1.2. Tendencias de consumo de leche y productos lácteos

El ritmo de vida actual de los países desarrollados implica que los actos de compra del consumidor sean cada vez menos frecuentes. En este sentido, los alimentos de vida útil prolongada ganan protagonismo y por ello, el canal de distribución persigue que esta se prolongue al máximo, con el objetivo de disponer de un margen mayor de tiempo para su venta, ajustándose de este modo a los hábitos de compra actuales.

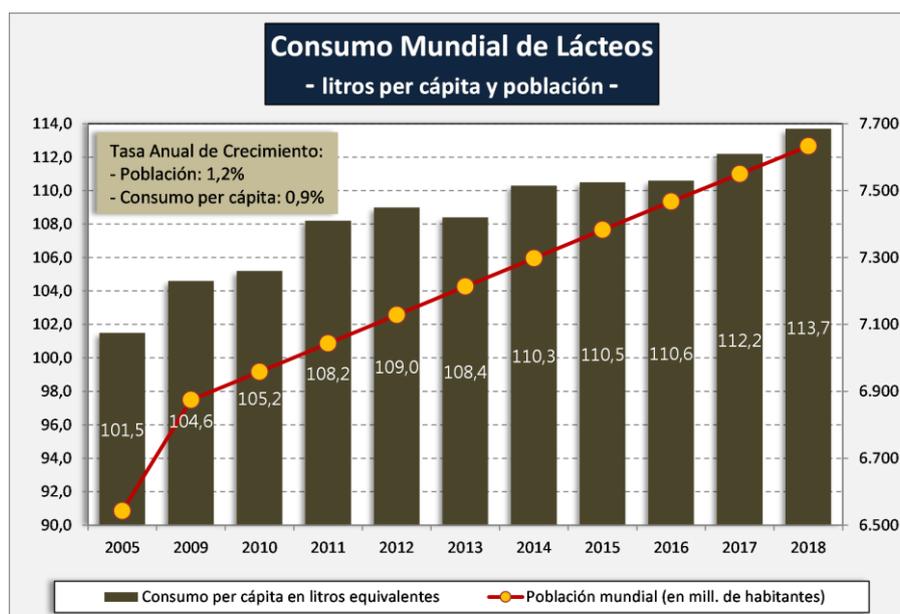
Los cambios en los patrones de demanda de los consumidores están afectando a los sistemas de producción de alimentos, con una tendencia hacia alimentos saludables y sostenibles. Para satisfacer esta demanda, las industrias necesitan mejorar la transparencia, para lo que deben apostar por la innovación de sus productos sin comprometer la calidad y seguridad alimentaria de los mismos (Deloitte, 2018).

En relación con el consumo de leche de vaca a nivel mundial, existen grandes diferencias entre países, dadas las distintas culturas y costumbres, destacando el caso de Nueva Zelanda como productor que consume apenas un 2 % de la leche que produce, lo que le lleva a ser un importante exportador, y la India, cuyo nivel de autoabastecimiento está bastante equilibrado con el consumo registrado en dicho país, según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (OCDE-FAO, 2019).

A pesar de que el consumo de productos lácteos en España ha experimentado un descenso en los últimos años, la demanda interna resulta mayor que su abastecimiento (MAPA, 2019), por lo que sigue siendo necesario aumentar la producción de leche mediante estrategias focalizadas en una ganadería eficiente, capaz de producir más cantidad de litros por animal.

La demanda internacional de consumo de lácteos ha crecido a razón de 20 millones de toneladas anuales y las tendencias parecen estar marcadas por una población mundial creciente, la demanda de productos más saludables y los cambios demográficos (FENIL, 2017). Sin embargo, dicha demanda se acompaña de un promedio de consumo mundial de leche per cápita por debajo de la recomendación FAO-OMS (180 litros anuales) con diferencias importantes de consumos entre países europeos y países en desarrollo, 240 y 80 litros por persona y año. En la Figura 4 se correlaciona el consumo de leche per cápita con el crecimiento demográfico, mostrando que la tasa anual de crecimiento de consumo per cápita de leche no es proporcional a la del crecimiento demográfico.

**Figura 4.** Evolución del consumo mundial de lácteos relacionando los litros consumidos per cápita con la población mundial



Fuente: OCLA en base a datos FAOSTAT y World Dairy Situation 2019

### 2.1.3. Tendencias en la comercialización de la leche y productos lácteos

El comercio exterior lácteo ha presentado históricamente un saldo negativo para España, ya que las importaciones han constituido históricamente más del doble e incluso el triple en volumen y valor que las exportaciones, debido a una producción interna insuficiente para abastecer al mercado nacional. Sin embargo, según la información aportada por la Federación Nacional de Industrias lácteas (FENIL) desde el año 2010, la producción nacional de leche de vaca ha aumentado un 17 % contribuyendo a hacer crecer las exportaciones, desplazando las importaciones (FENIL, 2017). Concretamente, en 2018 se produjo un incremento de las exportaciones de leche de vaca del 7% y una reducción de las importaciones del 27% (MAPA, 2019).

Con respecto a los destinos de las exportaciones españolas de leche y productos lácteos que hasta 2015 estaban dirigidas en un 91,8% del comercio en volumen y el 82,8% en valor hacia otros países de la Unión Europea, en la actualidad siguen siendo los principales destinos otros estados miembros como Bélgica, Países Bajos, Italia, Francia y Portugal, así como Reino Unido, que entra a formar parte de la lista de terceros países consolidados como destino de las exportaciones de leche española, como EEUU, Arabia, China, Siria o Chile.

## 2.2. ASPECTOS NUTRICIONALES Y VALOR BIOLÓGICO DE LA LECHE

La leche está compuesta por un 87% de agua y un 12 – 13% de sólidos totales, con una composición compleja que determina su valor nutricional, tratándose de una matriz variable tanto en términos cualitativos como cuantitativos, sometida a factores como el número de lactación, la raza (Wilcox y cols., 1959), la zona de producción, la estación del año, la alimentación (Linn, 1988), el manejo y la sanidad (Waite, 1961), entre otras.

El contenido de lactosa y cenizas presente en la leche de vaca comparada con la de otras especies es similar. Sin embargo, la leche de vaca contiene menos grasa y proteína (Jennes, 1988). La Tabla 2 muestra una comparación de la composición nutritiva de la leche procedente de diferentes especies animales.

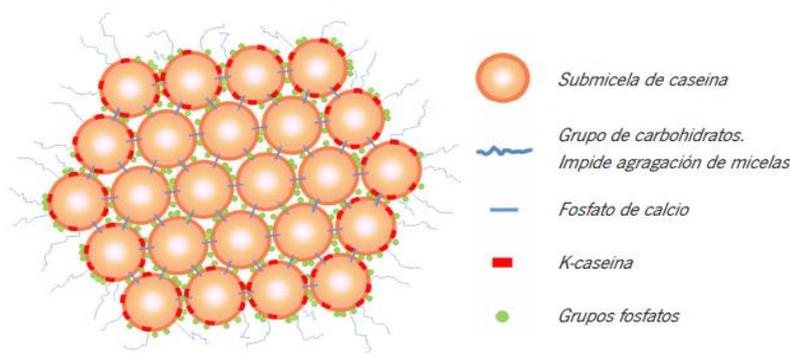
**Tabla 2.** Promedio de la composición básica de nutrientes de la leche comparada entre especies

Componentes (%)	Tipo de leche		
	Vaca	Cabra	Oveja
Agua	87,5	87,9	80,1
Proteínas	3,2	3,4	6,2
Grasas	3,6	3,8	7,9
Hidratos de carbono	4,7	4,1	4,9
Caseína	2,6	2,4	4,2
Albúmina, globulina	0,6	0,6	1,0
Cenizas	0,7	0,8	0,9

Fuentes: López y Barriga, 2016; Jennes, 1988

Desde el punto de vista físico, los componentes de la leche cruda se encuentran dispersos en (i) emulsión de glóbulos grasos, (ii) suspensión de caseína ligada a sales minerales y (iii) solución acuosa (lactosuero) formada por lactosa, sales minerales solubles y proteínas solubles. El agua constituye por tanto el componente mayor de la leche cruda, y mantiene a la lactosa, proteínas solubles e iones minerales en solución, a las grasas en emulsión y proteínas en dispersión. La presencia de las distintas fases de equilibrio, le confieren a la leche la cualidad de ser una matriz inestable. Por su parte, las proteínas tienen una gran repercusión en los distintos procesos tecnológicos para la elaboración de productos lácteos, contribuyendo al rendimiento quesero, la coagulación, la textura, olor y sabor, pudiéndose diferenciar dos tipos de proteínas en la leche, las caseínas y las proteínas séricas o solubles. Las caseínas son fosfoproteínas que precipitan a pH 4,6 y a 20° C, y se encuentran asociadas en una estructura denominada micela, que se trata de un conjunto de subunidades de naturaleza proteica asociadas entre sí por minerales como el calcio, el fósforo y el magnesio tal y como se muestra en la Figura 5. Existen cuatro tipos de caseínas alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), kappa ( $\kappa$ ) y gamma ( $\gamma$ ), siendo la tercera la más relevante por su importancia en la coagulación de la leche (Jennes, 1988; López y Barriga, 2016).

**Figura 5.** Modelo que representa la estructura de la caseína de la leche



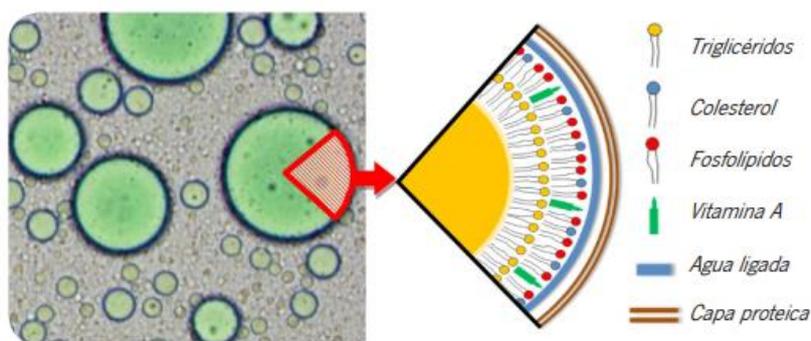
Fuente: López y Barriga, 2016

Por otro lado, las proteínas séricas están formadas por  $\alpha$ -lactoalbúminas,  $\beta$ -lactoglobulinas, seroalbúminas e inmunoglobulinas, y se encuentran en menor

proporción que las caseínas, siendo responsables de su característico valor nutricional por los aminoácidos esenciales que contienen.

Con respecto a la composición lipídica de la leche, cuyo esquema puede verse en la Figura 6, está compuesta por triglicéridos, fosfolípidos y sustancias insaponificables que se encuentran en suspensión acuosa en forma de glóbulos dispersos de 4,55  $\mu\text{m}$  de tamaño, cubiertos por una membrana que puede ser alterada fácilmente y que contiene los triglicéridos. Su alteración está asociada a sabor y olor desagradables.

**Figura 6.** Glóbulos grasos de leche de vaca al microscopio y estructura de la membrana



Fuente: López y Barriga, 2016

Los triglicéridos son ésteres de ácidos grasos y glicerol y es la fracción grasa más importante. Son estables y su degradación enzimática si bien da lugar a la formación de sabor y aromas característicos de la elaboración del queso, puede también provocar enranciamiento si ocurre en la leche líquida. Los fosfolípidos y las sustancias insaponificables como los esteroides, carotenoides y tocoferoles se encuentran en una fracción pequeña de la composición lipídica de la leche. Cabe destacar que, dentro de los esteroides se encuentra el colesterol que, al estar asociado con las proteínas, permite la estabilización del estado de emulsión de la grasa. Con respecto a las vitaminas, la leche cuenta con vitaminas hidrosolubles, siendo fundamentalmente la B1, B2, B6, B12 y C, y liposolubles, entre las que destacan las vitaminas A, D, E y K. Estas últimas se encuentran en esta fracción insaponificable y en niveles variables, dependiendo de la estación del año (Mourad y cols., 2014).

La lactosa es un hidrato de carbono presente exclusivamente en la leche de forma disuelta. Se trata de un disacárido formado por la unión de dos moléculas: la D-galactosa y la D-glucosa (Mourad y cols., 2014) y puede ser fermentado por microorganismos dando lugar a ácido láctico y gas carbónico fundamentalmente, lo que propicia un ambiente ácido muy valorado tecnológicamente para la elaboración de yogur y quesos. La fermentación puede ser de distintos tipos según el agente microbiológico empleado y el tipo de fermentación causada, que puede ser propiónica, butírica, ácido-mixta y alcohólica (Widyastuti y cols., 2014). Existe una pequeña proporción de minerales en distintas cantidades, tal y como se muestra en la Tabla 3, encontrándose en forma disuelta o formando parte de la caseína y tienen influencia en sus características y actitud tecnológica (Mourad y cols., 2014).

**Tabla 3.** Contenido medio de distintos minerales en leche de vaca

Minerales	Na	Mg	P	Cl	K	Ca	Fe	Cu	Zu	I
<b>Contenido (ppm)</b>	445	105	896	958	1500	1180	0,5	0,1	3,8	0,28

Fuente: Amiot y cols., 2002

Las enzimas, de naturaleza proteica, actúan de catalizadores en procesos metabólicos, tienen una alta especificidad para cada reacción y dependen del pH y de la temperatura. Desempeñan un papel importante a nivel tecnológico ya que constituyen los factores de degradación de los componentes de la leche, están implicados en cambios organolépticos de los productos transformados, son indicadores del tratamiento térmico y de la calidad higiénica de la leche, e incluso pueden tener acción antibacteriana. Entre las enzimas más relevantes de la leche cabe destacar la lipasa, la fosfatasa, la proteasa, la lisozima, la catalasa y la lactasa (Mourad y cols., 2014).

Finalmente hay que citar otros componentes de la leche como pueden ser las células somáticas, que son leucocitos que se encuentran normalmente en la

leche en bajas cantidades cuando proceden de animales sanos, y sirven como indicador de infección en control de calidad, y gases como el dióxido de carbono, nitrógeno y oxígeno que se evidencian como espuma en la leche y puede provocar enranciamiento oxidativo y pérdida de eficacia en el proceso de pasteurización (Alhussien y Dang, 2018).

### 2.2.1. Microbiota endógena de la leche

Uno de los principales grupos microbianos asociados a la microbiota de la leche son las Bacterias ácido-lácticas (BAL). Las BAL se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y sus condiciones para sobrevivir requieren la presencia de altas concentraciones de hidratos de carbono, proteínas, vitaminas y poco oxígeno (Stanley, 1998). Son bacterias Gram + capaces de tolerar niveles ácidos de pH. Presentan una morfología diversa como bacilar, cocoide o hasta ovoide, siendo células no pigmentadas, que no forman esporas, no reducen los nitratos, ni producen catalasa (Lahtinen y cols., 2011).

Los principales géneros de BAL son *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragonococcus*, *Alloiococcus* y *Bifidobacterium*. El aislamiento de este tipo de microorganismos puede ser particularmente interesante en tratamientos térmicos menos agresivos de la leche, como la pasteurización, en los que la reintroducción de estos microorganismos puede controlar las poblaciones comensales de la leche que pueden tener efectos adversos en sus características organolépticas. La actividad de las BAL ha permitido desarrollar productos lácteos más saludables favoreciendo al mismo tiempo su conservación. La prolongación de su vida útil se obtiene mediante la competencia que este tipo de microorganismos presenta frente a otros y el metabolismo fermentativo de la lactosa que produce ácido láctico (Tsakalidou, 2009), lo que provoca la variación de las características físico-químicas de la leche (Quigley y cols., 2013). Por su fermentación pueden ser homofermentativas, las cuales producen más del 90% de ácido láctico tras realizar el metabolismo de la lactosa y heterofermentativas cuando además de

ácido láctico producen otros ácidos y gases. Las principales especies homofermentativas conocidas dentro de las BAL son algunos lactobacilos y la mayoría de los enterococos, lactococos, pediococos y estreptococos. Como ejemplo de BAL heterofermentativas destaca *Leuconostoc* spp. y algunos lactobacilos (Lahtinen y cols., 2011).

Su capacidad fermentativa puede otorgar características tecnológicas positivas para su uso en la industria, pues mejoran la textura y reúnen las condiciones idóneas para la elaboración de ciertos productos lácteos. Asimismo, contribuyen a la coagulación de la leche mediante la coalescencia de las caseínas al alcanzarse el pH isoelectrico, aportan sabor y aroma debido a la producción de enzimas y compuestos como acetaldehído, diacetilo, acetoina, acetona, lactonas, ácidos volátiles, alcohol y gas. Tienen un efecto biopreservador debido a que ciertas especies producen por un lado unas proteínas llamadas bacteriocinas (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Enterococcus*) con efecto antibiótico al inhibir el crecimiento de bacterias relacionadas con estas, y, por otro lado, porque reducen el pH en el producto, lo que inhibe el crecimiento de otras especies bacterianas alterantes y patógenas (Quigley y cols., 2013).

Otra de las características más importantes de las BAL es que se consideran microorganismos probióticos ya que producen beneficios para la salud humana, especialmente en la prevención y reducción de los cuadros de diarrea, aunque recientemente su consumo está asociado a baja tasa de desarrollo de ciertos tumores, control del colesterol en sangre y modulación del sistema inmune (Quigley y cols., 2013).

A continuación, se describen las distintas especies dentro del grupo de bacterias beneficiosas desde el punto de vista de su aprovechamiento tecnológico en la leche.

*Lactococcus* es un género que se encuentra naturalmente en leche cruda y quesos artesanales y se añaden con frecuencia a leche pasteurizada para mejorar la fabricación de quesos. Su principal función consiste en la producción de L-lactato que acidifica el queso, contribuyendo a la proteólisis, metabolismo de las grasas y al desarrollo de los aromas característicos del producto (Smit y cols., 2005).

*Lactobacillus* tiene efectos beneficiosos para la salud intestinal y se ha convertido en un género muy popular en la actualidad. *Lactobacillus casei* y *L. rhamnosus* son abundantes de manera natural en la leche cruda, y son comúnmente utilizados como probióticos. Algunos trabajos han mostrado que los lactobacilos pueden reducir la intolerancia a la lactosa, aliviar la diarrea, reducir los niveles de colesterol en sangre, incrementar la respuesta inmune y prevenir ciertos tipos de cáncer. Sus aplicaciones a nivel tecnológico son la actividad proteolítica y habilidad de producir compuestos aromáticos. Los de mayor uso en la industria son *L. helveticus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *L. delbrueckii* ssp. *lactis* (Soomro y cols., 2002).

*Propionibacterium* por su parte se encuentra en la piel humana y en leche y productos lácteos. Dentro del segundo grupo, destacan cuatro especies: *P. freudenreichii*, *P. acidipropionici*, *P. jensenii* and *P. thoenii*, la mayoría de ellas asociadas a la fabricación de quesos en diversas partes del proceso. Mediante algunos trabajos se ha demostrado que algunas especies presentan resistencia a los fagos y codifican proteínas de superficie relacionadas con la actividad inmunorreguladora (Quigley y cols., 2013).

*Leuconostoc* tiene habilidad para sobrevivir en superficies, instalaciones y equipos durante largos periodos, resistiendo altas y bajas temperaturas. A pesar de ello crece poco en la leche por escasez de suficiente actividad proteolítica (D'Angelo y cols., 2017). *Leuconostoc* spp. está relacionado con la formación de compuestos relacionados con las propiedades organolépticas de productos lácteos fermentados (Sánchez y cols., 2005; Meslier y cols., 2012).

Con respecto a los estreptococos, la mayoría son especies patógenas, siendo *S. uberis* y *S. dysgalactiae* los más prevalentes (Calvinho, 2005) causando infección intramamaria cuando se dan condiciones favorables (Barbano y cols., 2006; Bradley y cols., 2007). Sin embargo, este género es fácilmente aislado del ambiente y de la leche (Braem y cols., 2012), y se utiliza con frecuencia para la fabricación de quesos y yogur por la fermentación que producen de la lactosa a lactato. También produce lactasa, que es la enzima capaz de digerir la lactosa, lo que facilita su digestión de manera más eficiente. *S. thermophilus* es un probiótico que mejora la digestión e inmunidad, previene la proliferación de bacterias dañinas entre otros beneficios. *S. thermophilus*

también se asocia a la producción de la viscosidad deseable de algunos productos lácteos fermentados. Otras especies han sido aisladas de quesos artesanales hechos a partir de leche cruda, mostrando una potencial aplicación tecnológica en la leche, como la acidificación o producción de peptidasas entre otras (De Vuyst y Tsakalidou, 2008).

Las bifidobacterias tienen importantes efectos positivos en la salud humana, como la protección frente a la infección de bacterias patógenas, estimulación del sistema inmune, reducción del riesgo de cáncer, reducción de los niveles de colesterol en sangre y mejora la digestión de lactosa (Quigley y cols., 2013).

Los enterococos se encuentran en abundancia en leche cruda de diferentes especies animales. *E. faecalis* está presente en la flora intestinal tanto de humanos como animales, y protege frente a infecciones además de ayudar a aliviar síntomas de diarrea. Tienen capacidad psicrotrofa y de supervivencia a altas temperaturas, así como una gran adaptación a diferentes ambientes, aunque dependiendo de la especie (Bhardwaj y cols., 2009). Además de *E. faecalis*, las especies más frecuentes por su uso tecnológico en la leche son *E. faecium*, *E. italicus*, *E. mundtii* y *E. durans*. Entre sus principales efectos destacan su actividad proteolítica, capacidad de hidrólisis de la grasa y contribución al desarrollo de compuestos aromáticos deseables (Quigley y cols., 2013).

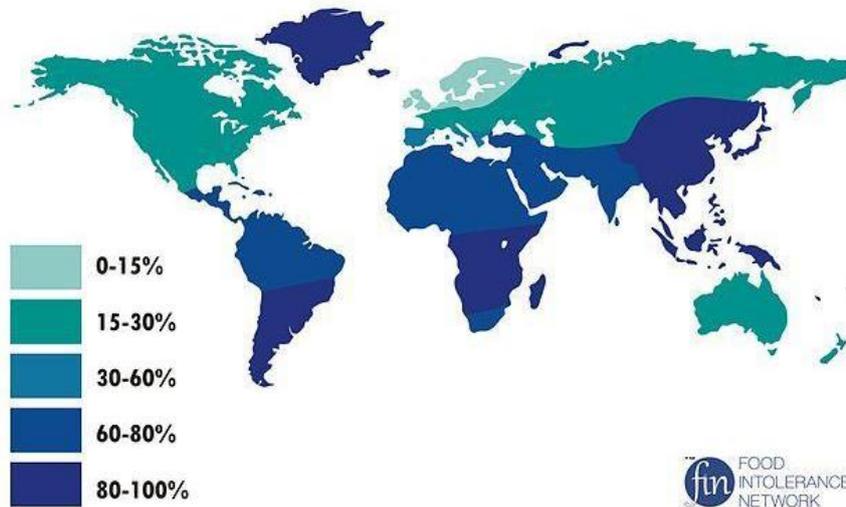
### **2.2.2. Intolerancias, digestibilidad y alergias**

Por último, dadas las implicaciones que su consumo puede acarrear para determinados grupos de personas, hay que tener en cuenta las intolerancias y alergias producidas por la leche *per se*.

A pesar de que todos los mamíferos nacen con la capacidad de digerir la lactosa, esta capacidad disminuye con la edad dando lugar a distintos grados de intolerancia a la lactosa. Esta intolerancia se debe a la ausencia en el organismo de la enzima lactasa con capacidad para romper la lactosa en dos monosacáridos (sacarosa y glucosa), que son absorbidos vía intestinal.

El 65% de la población adulta mundial no produce suficiente lactasa, lo que produce cierta intolerancia a la lactosa, pudiendo provocar, según el grado, gases, hinchazón y diarrea tras su consumo. Cabe destacar que existen diferencias entre grupos poblacionales en cuanto a intolerancias, siendo muy llamativo que el 90% de los asiáticos son intolerantes a la lactosa frente al 15% de los escandinavos (Food Intolerance Network, 2013), tal y como se muestra en la Figura 7.

**Figura 7.** Prevalencia mundial de intolerancia a la lactosa



Fuente: Food Intolerance Network, 2013

No obstante, según el grado de intolerancia de la persona, existen derivados lácteos con bajas cantidades de este disacárido, debido a la gran afinidad de los microorganismos involucrados en la mayoría de los procesos por la lactosa, como es el caso de los yogures, leches ácidas y quesos curados (Storhaug y cols., 2017).

Por otro lado, la grasa de la leche y más concretamente la estructura de sus glóbulos grasos, desempeñan un importante papel en la digestibilidad de la leche. En este sentido, la leche de cabra tiene más del 65 % de glóbulos grasos con un diámetro inferior a 3  $\mu\text{m}$ , en comparación con la de vaca, con un porcentaje menor, lo que permite una actuación más rápida de las enzimas

digestivas sobre los glóbulos grasos presentes en la leche de cabra, acelerando su digestión con respecto a la leche de vaca.

Por último, la caseína es la principal proteína responsable de las alergias, encontrándose en una proporción del 80% en la leche. La alergia se produce tras la ingesta de las proteínas presentes en la leche dando lugar a una respuesta anormal en la que se produce hipersensibilidad inmediata. Tras haber sido expuesto al alérgeno, el individuo produce anticuerpos específicos y, ante una nueva exposición, se desencadena la reacción alérgica (Solinas y cols. 2010).

Teniendo en cuenta lo anterior, ante cualquier trastorno asociado al consumo de este tipo de productos, se debe consultar con un especialista médico para llegar al diagnóstico correspondiente de la causa. En cualquier caso, y de manera genérica, se puede concluir que productos lácteos obtenidos tras la fermentación de la lactosa (yogur o queso) y productos lácteos bajos en grasa (leche semidesnatada o desnatada), deberían presentar una mayor digestibilidad y menores efectos asociados a la intolerancia a la lactosa.

En cualquier caso, la industria láctea, ha debido adaptarse y adoptar nuevas tecnologías, procesos, formatos y envasados, para hacer frente al reto de satisfacer las necesidades de los consumidores, muchas de ellas como consecuencia de la aparición de alergias e intolerancias asociadas, en este caso, a un producto como la leche, o simplemente como fruto de la globalización, generadora de demandas cambiantes, reconfiguración de estructuras familiares diferentes a las tradicionales, y generación de nuevos hábitos en los consumidores.

### **2.3. ALTERACIONES, ADULTERACIONES, Y PELIGROS DE LA LECHE**

En el ámbito de la leche y la mayoría de los alimentos, se pueden dar lugar a distintas situaciones que afectan a la calidad del producto final y en ocasiones a su seguridad alimentaria, en perjuicio de la imagen del sector en general y del consumidor en particular. En este sentido, hay que diferenciar la adulteración de la alteración de la leche. La adulteración de los alimentos consiste en la adición

de determinadas sustancias en los mismos por motivos económicos o de rendimiento, y constituye un *fraude alimentario*, mientras que la alteración consiste en la modificación organoléptica de un producto por agentes físicos, químicos o biológicos, normalmente sin intencionalidad. En cualquier caso, y de manera previa a describir ambos, es preciso mencionar los factores que afectan al crecimiento de microorganismos en la leche, ya que es una de las principales causas que originan la adulteración y porque su conocimiento es básico para conocer las alteraciones por causas biológicas de la leche.

### **2.3.1. Factores que afectan al crecimiento de microorganismos en leche**

Los microorganismos que llegan a la leche del medio externo deben pasar un proceso de adaptación al medio previo a su multiplicación, cuya duración va a depender de factores intrínsecos y extrínsecos.

Los factores intrínsecos se deben a la composición y características físico-químicas de la leche tales como pH, actividad agua, potencial de óxido reducción y nutrientes, entre otros. El pH normal de la leche es ligeramente ácido, con valores entre 6,5 y 6,7; lo cual favorece el crecimiento de diversas especies de microorganismos. Por otro lado, la actividad agua ( $a_w$ ) de la leche es de  $> 0,99$ . Teniendo en cuenta que las bacterias Gram + y Gram – se multiplican a una  $a_w$  de entre 0,90 – 0,97, la leche se convierte en un medio que favorece los procesos metabólicos microbianos. La multiplicación de algunos mohos y levaduras se ve dificultada por una excesiva humedad del alimento, con la excepción de presentaciones lácteas como la leche deshidrata, que puedan favorecer la proliferación de mohos y levaduras por su baja  $a_w$ . El potencial de óxido reducción (potencial Redox) está determinado por la presencia de elementos reductores y oxidantes. El oxígeno disuelto en la leche contribuye a un potencial Redox de entre + 250 y + 350 mV. Cuando los microorganismos se multiplican en la leche, se liberan electrones consumiendo oxígeno al mismo tiempo, lo que hará que el potencial Redox disminuya. Ello va a condicionar el crecimiento de determinados microorganismos según sus necesidades de oxígeno tal y como se muestra en la Tabla 4.

Normalmente, el desarrollo inicial de los microorganismos en los alimentos es aerobio y posteriormente, debido a la reducción del potencial Redox, se inicia el desarrollo de los anaerobios.

**Tabla 4.** Clasificación de microorganismos según sus necesidades de oxígeno

<b>Tipo</b>	<b>Definición</b>	<b>Ejemplos</b>
Aerobios estrictos	Necesitan oxígeno para desarrollarse. No son capaces de multiplicarse en ambientes anaeróbicos	<i>Pseudomonas, Micrococcus, Bacillus, mohos</i>
Anaerobios facultativos	Pueden crecer en presencia o ausencia de oxígeno	<i>Enterobacterias, Staphylococcus.</i>
Anaerobios estrictos	Sólo crecen en ausencia de oxígeno	<i>Clostridium, Propionibacterium</i>
Microaerófilos	Necesitan sólo una pequeña fracción de oxígeno en la atmósfera	<i>Lactobacillus, Streptococcus, Pediococcus</i>

Elaboración propia

Además, existen factores extrínsecos que condicionan la proliferación microbiana, como la temperatura y el tiempo, lo que se verá con más detalle en el apartado 2.3.2.3.

### **2.3.2. Alteraciones de la leche**

La alteración de la leche consiste en el cambio de las características propias de la misma, ya sea por causas naturales (ej. contaminación a nivel de granja provocada por los microorganismos procedentes del suelo o del propio

ganado) o intervención artificial (ej. tratamiento térmico más elevado de lo normal). La alteración, por tanto, se puede producir por agentes físicos, químicos o biológicos, dando lugar a modificaciones organolépticas que pueden tener efectos en la salud pública. Concretamente en el caso de la leche se pueden presentar distintos tipos de contaminación según la fase de la cadena. En este sentido se distinguen tres niveles, como se muestra en la Tabla 5: (i) en granjas fundamentalmente mediante contaminación biológica a través de las propias vacas (vía vertical) o a través del medio ambiente y la manipulación (vía horizontal), (ii) en la industria mediante contaminación de origen físico, biológico y químico a lo largo de las fases de recepción de leche, transformación y envasado y (iii) a nivel doméstico, a través de la manipulación inadecuada de la leche o la venta de leche cruda.

**Tabla 5.** Clasificación de peligros/alteraciones por fase de la cadena

<b>Etapa</b>	<b>Tipo contaminación</b>	<b>Ejemplos</b>
Nivel primario	Biológico	Recuento de células somáticas (RCS) por mamitis, aflatoxinas
	Químico	Residuos antibióticos
Nivel industrial	Biológico	Contaminación microbiana
	Químico	Desinfectantes
	Físico	Presencia de cuerpos extraños
Nivel doméstico	Biológico	Alteraciones organolépticas

Elaboración propia

### 2.3.2.1. Contaminación de la leche en producción primaria

El equilibrio de los microorganismos en la leche cruda se puede ver modificado a causa de la contaminación por *residuos de antibióticos* suministrados a los animales para el tratamiento de ciertas patologías. La consecuencia directa de este desequilibrio consiste en las dificultades que la matriz presenta en la industria transformadora, concretamente debido a que los antibióticos provocan fallos en la fermentación. Constituyendo los residuos de antibióticos en los alimentos un riesgo para la salud pública por su asociación con reacciones alérgicas y, muy especialmente, por el desarrollo de resistencias microbianas (Nisha, 2012), existen sin embargo estudios, que sugieren que las sustancias antibióticas tienden a ser destruidas a través de los tratamientos térmicos (Martindale, 1999).

La presencia de antibióticos en la leche, así como en otros alimentos, está regulada por la legislación europea, cuyos límites están establecidos por la FAO y la OMS, el Comité del Codex Alimentarius, el Comité de Evaluación de medicamentos de uso veterinario de la Agencia Española del Medicamento y Productos sanitarios (AEMPS) y el Comité Científico sobre Alimentación de la Unión Europea. Actualmente la norma básica que recoge y regula estos los límites máximos de residuos antibióticos es el Reglamento (CE) 470/2009 (Aalipour y cols., 2013).

Por otro lado, hay que tener en cuenta la contaminación por *residuos de pesticidas*, los cuales penetran en el cuerpo humano a través del alimento especialmente aquellos ricos en lípidos, como ocurre con la leche o la mantequilla. La fuente de los pesticidas (herbicidas, rodenticidas, insecticidas y fungicidas), puede ser muy variable, llegando a la leche a través del consumo de agua contaminada o alimento tratado o con residuos (Akhtar y Ahad, 2017). Cabe citar como ejemplo la contaminación por compuestos organoclorados, con una larga persistencia.

Como se ha visto anteriormente, la leche no sólo constituye un medio idóneo para el crecimiento de una gran variedad microorganismos, sino que unas inadecuadas prácticas de higiene durante la cadena y un incorrecto manejo de los animales y manipulación de la leche, puede favorecer la presencia de mohos, virus y bacterias.

En cuanto a *virus* se pueden citar los norovirus y virus de la hepatitis (Dhanashekar y cols., 2012), todos ellos ya presentes en la leche o bien presentes por contaminación de la misma (Spreer, 1991).

Los *mohos* patógenos pueden estar presentes en la leche a través de infecciones en la ubre. *Nocardia asteroides* puede ser excretada en la leche durante meses. Otras especies como *Nocardia brasiliensis*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans* y *Candida krusei* pueden estar también vinculadas con procesos mamíticos. En cualquier caso, el tratamiento térmico a 74° C durante 15 minutos es suficiente para su destrucción (Dhanashekar y cols., 2012). Producto de la intervención de otras especies de mohos, cabe destacar la presencia de micotoxinas en la leche, que son toxinas metabólicas producidas principalmente por 5 géneros de hongos: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium* y *Claviceps*. Se encuentran en numerosos alimentos y constituyen un riesgo importante para la salud pública y animal ya que existen evidencias de su neurotoxicidad, carcinogénesis, teratogénesis y mutagénesis, entre otros efectos negativos. De las micotoxinas, las aflatoxinas representan en grupo más estudiado, de las que la Aflatoxina B1 (AFB1) es la más tóxica. La AFB1, puede estar presente en el alimento de los animales, y posteriormente ésta es hidrolizada a Aflatoxina M1 (AFM1), que es el tipo que podría encontrarse en la leche. Los límites de AFM1 han sido fijados por la Comisión Europea a través del Reglamento (CE) 1881/2006 en un máximo de 0,05 µg/kg AFM1 en leche cruda y productos lácteos y 0,025 µg/kg para leches infantiles (Istamboulié y cols., 2016).

En cuanto a los *parásitos*, *Taenia spp.*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* o *Toxoplasma gondii* pueden completar sus ciclos al contaminarse la leche cruda a partir de individuos infectados, ya sea durante su producción o manipulación (Dhanashekar y cols., 2012).

Finalmente, teniendo en cuenta que la leche no es estéril, contando con un recuento microbiano inicial de entre 100 a 10.000 UFC/mL, existen *bacterias* que no son propias de la leche y pueden contaminarla por vía mamaria y a través del ambiente (Rysanek y cols., 2007). La mamitis es la principal fuente de microorganismos relacionada con la leche cruda. En vacas con mamitis clínicas, estos incrementos son frecuentemente provocados por bacterias como

*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* y *S. uberis*, y, de manera poco frecuente, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Pasteurella*, *Proteus* y *Serratia*. Su efecto se puede minimizar con unas Buenas Prácticas de Higiene, siempre que incluyan una correcta limpieza y desinfección de pezones, un tiempo adecuado de ordeño por animal, identificación, aislamiento y separación de vacas infectadas y aplicación de tratamientos profilácticos y terapéuticos en vacas durante el periodo seco (Hamann, 2010). La detección precoz de la mastitis atendiendo a los RCS es fundamental, atendiendo a niveles inferiores a 200.000/mL como límites por debajo de los cuales es posible garantizar una correcta extracción de proteína de la leche. Los niveles alrededor de 400.000 células somáticas/mL pueden ser detectados de manera rápida por el CMT mediante una reacción producida entre los leucocitos presentes por la infección y el reactivo utilizado para el test, que da como resultado una solución mucosa o de coágulos inmediata (Burke y cols., 2018). La leche sale normalmente de las vacas a 38° C de temperatura, es decir, su temperatura corporal. En este sentido, se ha demostrado que, a dicha temperatura, los recuentos microbianos pueden duplicarse en los 20 o 40 minutos posteriores (Amiot, 1991; Spreer, 1991). Por ello es muy importante que la refrigeración de la leche recién ordeñada se lleve a cabo inmediatamente. A pesar de que las especies de microorganismos que producen mastitis sobreviven a temperaturas inferiores a 10° C, su capacidad de multiplicarse está restringida a excepción de algunas cepas de *S. uberis* (Ward y cols., 2009). Las principales fuentes de contaminación son la salida del pezón, el equipo de ordeño y el tanque de refrigeración, en las concentraciones que se exponen en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Recuentos de bacterias totales según fuente de contaminación

Fuente de contaminación	Recuentos
Salida del pezón	50 – 1.000 UFC/mL
Equipo de ordeño	1.000 – 10.000 UFC/mL
Tanque de refrigeración	5.000 – 20.000 UFC/mL

Fuente: Chandan y cols, 2015; Ward y cols. 2009

Los microorganismos pueden alcanzar la ubre vía ascendente o descendente. Las bacterias que se encuentran en el medio ambiente (cama, pezoneras, manos etc.) realizan la contaminación ascendente mediante su adhesión a la piel de la ubre y después del ordeño entran a través del esfínter del pezón. Las principales especies implicadas son *S. aureus*, *Streptococcus spp.* y coliformes totales. *S. uberis* es el principal patógeno relacionado con las mamitis en todo el mundo (Bradley y cols., 2007) debido a su capacidad de adaptación para ocupar diferentes nichos ecológicos (Ward y cols., 2009). Su presencia en leche de tanque se considera un indicador de animales infectados en la ganadería (Bramley y McKinnon, 1990). Cuando las mamitis son producidas por *S. aureus*, las bacterias que colonizan el canal del pezón sintetizan y liberan enterotoxinas termoestables en la leche (Masud y cols., 1993), que pueden provocar alteraciones en producto tratado térmicamente y envasado (De Jonghe y cols., 2010; Scheldeman y cols., 2005). Otros microorganismos utilizan una vía descendente o hematógena, circulando vía sistémica hasta la ubre, como ocurre con *Salmonella spp.*, *Brucella* y *Mycobacterium spp.* (Jiménez, 2005).

El aire, el suelo, los operarios, el agua, los utensilios y equipos intervienen en la contaminación de la leche descrita anteriormente ya sea en los animales, en el equipo de ordeño o en el tanque. El aire es un medio que limita la supervivencia de los microorganismos debido a la constante exposición al oxígeno, cambios de temperatura, humedad y exposición solar. Microorganismos Gram + y esporulados como *Micrococcus spp.*, *Streptomyces spp.* y esporas de mohos como *Penicillium spp.* y *Aspergillus spp.* pueden resistir por largo tiempo. El agua utilizada para la limpieza de los equipos, la higiene de animales y personal debe ser potable, ya que esta puede ser fuente de microorganismos psicrófilos y bacterias coliformes (Colorado y cols., 2018). El suelo por su parte es la principal fuente de microorganismos termodúricos y termófilos, como *Clostridium spp.*, debido al contacto directo de las ubres, utensilios y personal. El estiércol presente en el suelo o que por contaminación entra en contacto con equipos, manos de los operarios o ubres de los animales, es la fuente principal de microorganismos coliformes. El personal desempeña un

papel muy importante en la contaminación de la leche, especialmente durante el ordeño o manipulación de los equipos limpios (Jiménez, 2005; Veisseyre, 1988). Si el equipo está en malas condiciones higiénicas, puede ser origen de diversas especies de bacterias termorresistentes que contaminan la leche. Estos microorganismos se encuentran en las piedras de leche que quedan en las superficies del equipo, compuestas por residuos minerales o sales inorgánicas de calcio, magnesio o hierro en la leche o agua que precipitan en condiciones alcalinas o de calor formando estas estructuras, especialmente en superficies donde la fuerza del agua ejerce menos presión de arrastre, y en biofilms, que consiste en una estructura compleja de comunidades microbianas creciendo adheridas a superficies y embebidas en matrices extracelulares que ellas mismas sintetizan (AESAN, 2010). Es por ello por lo que tiene gran importancia la aplicación de un protocolo de limpieza y desinfección que incorpore el uso de ácidos capaces de disolver este tipo de formaciones y prevenir su formación (Keyport, 1995).

Por otro lado, la mamitis suele estar asociada a un descenso de la producción y un aumento de células somáticas (especialmente neutrófilos polimorfonucleares), como consecuencia de la respuesta inmune de la vaca y el aumento de proteasas y bacterias en leche (Halasa y cols., 2007; Bedolla y cols., 2007). Existen distintos factores, como un mal funcionamiento o desajuste de la máquina de ordeño, que pueden tener un gran efecto en la incidencia de mamitis de las vacas, por ejemplo, una pulsación deficiente está asociada al 70% de problemas, dando lugar a un masaje deficiente y una consiguiente congestión, edema e inflamación. También el mal funcionamiento del regulador, la bomba de vacío o bien la desconexión brusca de las pezoneras puede ocasionar mamitis por inestabilidad del vacío. Estos problemas físicos favorecen un estado de la ubre que promueve su colonización por gérmenes oportunistas y ubicuos (mamitis ambiental) o procedentes de vacas infectadas que se transmiten a otras sanas a través de los equipos tras su ordeño (mamitis contagiosa).

El *sobreordeño* se considera una de las causas principales de mamitis debida a la hiperqueratosis producida por el vacío de las pezoneras en los pezones. Para evitarlo, una vez vaciada la ubre, hay que retirar la unidad de ordeño. (Blowey y Edmonson, 1995; Radostits y cols., 2002).

La prevención de la mamitis puede llevarse a cabo mediante la aplicación de recomendaciones básicas de ordeño como el *predipping* y *postdipping*. El *predipping* consiste en la desinfección por pulverización o inmersión de los pezones previa al ordeño. Dicha práctica es adicional a la rutina de limpieza y desinfección de los pezones, y es una medida que contribuye a (i) la reducción de la carga microbiana presente en los pezones, (ii) la prevención de infecciones intramamarias ocasionadas por gérmenes ubicuos como *E. coli*, *Klebsiella* spp., *S. uberis*, entre otros, y (iii) los programas de lucha frente a mamitis ocasionadas por *S. aureus*, *S. agalactiae* y *Mycoplasma bovis*. Algunas de estas especies, pueden transmitirse a la piel del pezón de las siguiente 5-6 vacas ordeñadas con la misma unidad de ordeño. Una vez en la superficie del pezón, las bacterias pueden multiplicarse colonizando el cuarterón a través del canal. Hay que tener en cuenta que los desinfectantes pierden su eficacia ante la presencia de materia orgánica de modo que previo a la aplicación del *predipping* es preciso que la ubre esté limpia, lo que puede realizarse con una toallita húmeda. El tiempo de actuación de este tipo de productos es de 30-60 segundos (Guijarro y cols., 2002). El *postdipping* consiste en la desinfección de la ubre posterior al ordeño. Esta medida reduce entre un 50 y un 90% la incidencia de nuevas infecciones intramamarias. Los productos utilizados para la prevención de la mamitis están controlados por la Agencia Española del Medicamento y la Agencia Europea del Medicamento, que conceden la autorización del uso de determinados desinfectantes sobre animales destinados a producir alimentos de consumo humano, tras su evaluación. Dichos desinfectantes son denominados “productos zoonosanitarios”, teniendo la condición de medicamento de uso veterinario y no de “biocidas”, cuyo ámbito de aplicación nunca es sobre los animales, sino en su entorno. Los emolientes se añaden al desinfectante para suavizar la piel del pezón, reduciendo la probabilidad de lesiones o grietas. El emoliente más efectivo es el glicerol al 10%. Existen además los selladores de pezones que tienen como objetivo reducir nuevas infecciones en el parto, al final del periodo de secado (Guijarro y cols., 2002; Callejo, 2010).

Atendiendo a bacterias que transmiten zoonosis alimentarias, existen especies de gran relevancia que pueden contaminar la leche, como es el caso de *Listeria monocytogenes*, con capacidad de multiplicarse en un amplio rango

de temperaturas y de formar biofilms en superficies, provocando una mayor resistencia a su eliminación. A pesar de no tener una elevada incidencia (284 casos en España y 2.480 casos notificados en la UE en 2019), su elevada letalidad (un 13,8 %) en comparación con otras toxiinfecciones, y la gravedad de sus síntomas en grupos de riesgo como personas inmunodeprimidas, de edad avanzada, niños o embarazadas, hacen que su control sea especialmente relevante. Para ello, los operadores deben incluir planes de control y muestreo, y tener en cuenta las características de *L. monocytogenes* en los APPCC, así como realizar estudios de vida útil para verificar el cumplimiento de los límites microbiológicos hasta su fecha de caducidad, en las industrias que producen alimentos con mayor riesgo, como es el caso de las industrias lácteas. Por parte de las autoridades competentes, éstas realizan controles oficiales para comprobar el cumplimiento de los requisitos legales, y además se establecen mecanismos de vigilancia epidemiológica a través del Real Decreto 1940/2004 sobre vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos (AECOSAN, Seguridad alimentaria).

Por último, algunas bacterias son productoras de *enzimas* capaces de producir alteraciones por proteólisis y lipólisis, esta última relacionada con el sabor rancio de la leche. El enranciamiento de la leche está provocado por la activación de la lipasa presente en la leche tras la agitación y homogeneización o por la presencia de microorganismos psicrotrofos que podrían proliferar durante el almacenamiento, aumentando la capacidad lipolítica en la leche. A pesar de su probable eliminación, sus efectos en la leche podrían observarse en etapas posteriores.

### *2.3.2.3. Contaminación de la leche durante su almacenamiento, transporte y transformación industrial*

Entre las alteraciones de la leche, hay que tener especialmente en cuenta las producidas por microorganismos, que desempeñan los siguientes papeles: (i) acidificación espontánea y coagulación láctica (producidas por *Streptococcus lactis*), (ii) coagulación con acidez baja (a causa de gérmenes esporulados que

actúan como el cuajo), (iii) proteólisis o putrefacción (efecto muy característico de gérmenes como *E. coli* y *Proteus* o tras una pasteurización alta), (iv) lipólisis o enranciamiento (por microorganismos psicrotrofos que actúan sobre los lípidos liberando ácido butírico), (v) modificaciones del color (azul por *P. cyanogenes*, amarilla por *P. synxantha* y roja por *B. lactis erythrogenes*) y (vi) aumento de la viscosidad que tiene lugar pasadas 20 horas después del ordeño en condiciones de refrigeración (en presencia de *Micrococcus lactis viscosus*) (Callejo y Díaz-Barcos, 2008; Pascual y Calderón, 2015).

Como se ha comentado anteriormente, la leche recién ordeñada de una vaca sana contiene entre 100 y 10.000 UFC/mL, con una población media de 1.000 UFC/mL (Amiot, 1991).

Para evitar la multiplicación microbiana, existen tratamientos que resultan adecuados ante condiciones de transporte largo y para garantizar su conservación y su calidad. Uno de ellos consiste en la reducción del contenido de agua, es decir, la leche en polvo, que se realiza mediante un tratamiento de liofilización. Dicho tratamiento, sin embargo, da lugar a variaciones en la composición, lo que, a modo expositivo se muestra en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Composición media de leche y leche en polvo

<b>Parámetro</b>	<b>Leche de vaca %</b>	<b>Leche desnatada en polvo %</b>	<b>Leche entera en polvo %</b>	<b>Suero de leche ácida en polvo %</b>
Humedad	85,5–89,5	3,0–4,0	2,0–4,5	3,5–5,0
Grasa	2,5–6,0	0,6–1,5	26,0–42,0	1,0–1,5
Proteína	2,9–5,0	34,0–37,0	24,5–27,0	11,0–14,5
Lactosa	3,6–5,5	49,5–52,0	36,0–38,5	63,0–75,0
Minerales (cenizas)	0,8–0,9	8,2–8,6	5,5–6,5	8,2–8,8

Fuente: Burke y cols., 2018

El contenido microbiano de la leche cruda depende por una parte de la higiene que se aplica en cada una de las fases de producción de leche (limpieza de las instalaciones de ordeño, condiciones de almacenamiento y del transporte, etc.) y por otra, del estado sanitario de la vaca, especialmente de la ubre (Spreer, 1991).

En general, la relevancia de la microbiología en la leche radica en:

- Los cambios deseables que son capaces de provocar en las características físico-químicas de la leche.
- Las alteraciones que provocan algunas especies en la leche y productos lácteos, haciéndolos inadecuados para su consumo.
- Las patologías que la presencia en la leche de ciertos microorganismos o sus toxinas, pueden provocar al consumidor.

Desde el punto de vista microbiológico, el contenido de nutrientes es un factor intrínseco muy relevante para la multiplicación microbiana, debido a la presencia de gran cantidad de vitaminas, azúcares fermentables, citratos, grasas y proteínas. A pesar de disponer de pocos aminoácidos libres y péptidos de bajo peso molecular, aquellas bacterias sin capacidad proteolítica pueden asociarse mediante simbiosis con otros microorganismos para desarrollarse en el medio con éxito. Sin embargo, la leche cuenta con sistemas antimicrobianos capaces de proteger a la glándula de infecciones, lo que hay que tener en cuenta a pesar de su limitada protección y corta duración tras el ordeño. Entre estos sistemas cabe destacar la lactoferrina, inmunoglobulinas, sistema lactoperoxidasa – tiocianato – peróxido de hidrógeno (LP), aglutininas, fagocitosis y otros sistemas antimicrobianos, de las que se describen sus principales características en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Descripción de los principales sistemas antimicrobianos de la leche

Tipo de sistema	Descripción
Lactoferrina	Glicoproteína capaz de unirse al hierro. Inhibe multiplicación de bacterias y protege de infección por <i>E. coli</i> a la ubre. En vaca se encuentra en niveles de 0,200 mg/mL
Inmunoglobulinas	Anticuerpos sistémicos (Ig G) o producidos por glándula mamaria (Ig A) cuya función es la transferencia pasiva de inmunidad al ternero. Su función consiste en reducir a nivel local la mamitis y neutralizan toxinas
Sistema LP	La lactoperoxidasa es una enzima sintetizada en la ubre y puede llegar a representar el 1% de las proteínas totales de la leche. El tiocianato se encuentra entre 1,2 – 14,5 mg/mL en la leche, cantidad dependiente de la alimentación. El peróxido de hidrógeno es producido por estreptococos y polimorfonucleados. El sistema LP destruye microorganismos por oxidación sus sistemas enzimáticos
Aglutininas	Anticuerpos capaces de aglutinar bacterias sensibles, como estreptococos, enterobacterias y lactobacilos
Fagocitosis	Los fagocitos polimorfonucleares (PMN) son el principal mecanismo de defensa de la ubre. De 100.000 células por mL que puede producir la ubre sana, el 10% son PMN. A pesar de ello su función en leche no es tan eficaz como en sangre
Otros sistemas antimicrobianos	Vitamina B12, Lisozimas

Elaboración propia

Por otro lado, existen factores extrínsecos asociados al almacenamiento y manipulación de la leche, que condicionan la proliferación microbiana, a través

de lo cual, los microorganismos se pueden dividir en mesófilos, psicrófilos, termófilos, termodúricos, psicrotrofos y termotrofos.

Los microorganismos mesófilos crecen a la temperatura natural de la leche. Como ejemplo más característico destacan las bacterias ácido-lácticas, algunas de las cuales son utilizadas para distintos procesos tecnológicos aplicados no sólo a la leche sino también a otros productos.

Las especies psicrófilas crecen a temperaturas de refrigeración de la leche, mientras que las psicrotrofas son especies mesófilas que tienen la misma capacidad que las psicrófilas. Como especies microbianas psicrófilas, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus* son las más representativas, mientras que *Pseudomonas spp.*, *Alcaligenes spp.*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus*, *Microoccus*, *Streptococcus* y especies de la familia *Enterobacteriaceae*, son ejemplos de especies psicrotrofas.

Los microorganismos termófilos pueden crecer a temperaturas de 45 – 55° C, como *Lactobacillus bulgaricus*, *L. fermenti*, *L. lactis*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *S. termophilus*, al igual que en el caso de las psicrotrofas, existen mesófilos con capacidad para soportar dichas temperaturas, hasta condiciones de pasteurización como *Micrococcus*, *Microbacterium*, esporas de *Bacillus* y *Clostridium spp.* y algunas especies incluso soportan temperaturas mayores. Pertenecen al grupo de los termotrofos, por lo que son capaces no sólo de sobrevivir a altas temperaturas sino también de crecer en dichas condiciones.

Por otro lado, el tiempo de almacenamiento influye en gran medida en la calidad microbiológica de la leche, ya que un almacenamiento en refrigeración prolongado desencadenaría el aumento de los microorganismos psicrotrofos, pudiéndose producir alteraciones del producto. Ante estas circunstancias, especies con capacidad psicrotrofa como *L. monocytogenes*, son capaces de estar presentes en la leche cruda y productos lácteos elaborados a partir de leche sin pasteurizar. Además, hay que tener en cuenta que la comercialización de la leche cruda destinada a la venta directa al consumidor no está prohibida en España, siempre que se cumplan los requisitos de higiene de la normativa comunitaria, y se apliquen los tratamientos caseros pertinentes para evitar riesgos (AECOSAN, Seguridad alimentaria).

En la Tabla 9 se recogen los rangos de temperatura para el crecimiento de distintos tipos de microorganismos, lo que permite su clasificación en grupos.

**Tabla 9.** Rangos de temperatura (° C) para el crecimiento de los distintos tipos de microorganismos

<b>Grupos</b>	<b>Mínima</b>	<b>Óptima</b>	<b>Máxima</b>
Termófilos	40-45	55-75	60-90
Termotrofos	15-20	30-40	45-50
Mesófilos	5-15	30-40	40-47
Psicrófilos	-5 - +5	12-15	15-20
Psicrotrofos	-5 - +5	25-30	30-35

Fuente: Robinson, 1987

Por su capacidad adaptativa a las condiciones de almacenamiento que se producen en la cadena de producción de leche cruda, así como por los potenciales efectos que su proliferación puede tener en el producto final, las especies de bacterias psicrotrofa, han sido objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral cuyos datos se recogen en los Capítulos II y III de los resultados expuestos.

Por último, existen bacterias esporuladas que son termodúricas y mesófilas ubicuas (Gould, 2006). Si bien el origen de la contaminación por HRS de alimentos como la leche no es bien conocido, se ha discutido el rol que desempeña, en este sentido, el alimento de las vacas (forraje, paja y heno) (Te Giffel y cols., 2002; McKinnon y Pettipher, 1983), así como las heces, la cama y el suelo (Khanal y cols., 2014). Estas especies producen esporas con gran capacidad de termorresistencia (Pereira y Sant'Ana, 2018), capaces de germinar y multiplicarse en la leche envasada, aunque no produzcan efectos negativos apreciables a nivel sensorial, de estabilidad o efectos patógenos. Su concentración está regulada, limitando la presencia de esporas en leche para su comercialización en 10 UFC/mL (Council Directive 85/397/EEC; Montanari y cols., 2004).

La tasa de formación de esporas es baja y su metabolismo escaso, lo que contribuye a que la leche contaminada por esporas no se vea alterada macroscópicamente ni a nivel sensorial durante su almacenamiento. Existen bacterias productoras de esporas que son estrictamente aerobias, pero su reducida actividad metabólica les permite crecer en condiciones de escasa presencia de oxígeno. La temperatura, la carencia de nutrientes, alteraciones del pH pueden promover la activación de las esporas (Berg y Sandine, 1970; Desrosier y Heiligman, 2006). La temperatura de esporulación es uno de los factores más importantes que determinan la termorresistencia de las esporas (Palop y cols., 1999).

Existen fundamentalmente dos grupos en los que se clasifican las esporas resistentes a altas temperaturas:

- Esporas altamente resistentes a tratamiento térmico UHT. Pueden estar producidas por especies termofílicas como *Geobacillus stearothermophilus*, *G. toebii*, *G. vulcani*, o bien por especies mesofílicas como *Bacillus sporothermodurans*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *Anoxybacillus flavus*.
- Esporas que resisten un tratamiento de pasteurización y que crecen a bajas temperaturas, producidas *B. cereus*, *B. weihenstephanensis* en leche pasteurizada refrigerada y *C. tyrobutyricum*, durante la maduración de queso (Gould, 2006).

Las esporas resistentes al calor producidas por determinadas especies de bacterias son inducidas con tratamientos térmicos severos (Oomes y cols., 2007). Los tratamientos térmicos elevados requieren un importante gasto energético y de agua durante el proceso, pero son necesarios para garantizar la no supervivencia de las esporas, que de lo contrario podrían germinar provocando toxicidad o pérdida de calidad (Scheldeman y cols., 2005; De Jonghe y cols., 2010; Scheldeman y cols., 2006). El gasto energético asociados a estos procesos debe monitorizarse con el fin de desarrollar planes adecuados para su optimización y garantizar la eficiencia energética en línea con el Plan Nacional Integrado de Energía y Clima 2021 – 2030, que persigue reducir la emisión de gases de efecto invernadero un 23 % con respecto al año 1990.

Las distintas esporas presentan diferente resistencia a los tratamientos térmicos en función de sus propiedades de germinación y fenotipo (Eijlander y cols., 2011; Hornstra y cols., 2009), por lo que es recomendable ajustar la temperatura al tiempo necesario para la inactivación de las esporas en relación con el producto.

Existen especies de *Bacillus* capaces de producir esporas que resisten los tratamientos térmicos que se aplican normalmente en la industria (Scheldeman y cols., 2006). Esporas del género *B. aneurinibacillus* y *paenibacillus* pueden llegar a resistir temperaturas superiores a 120° C (Te Giffel y cols., 2002).

### 2.3.3. Adulteración de la leche

La consecuencia directa de la adulteración es la reducción de la calidad del producto, aunque en ocasiones puede implicar riesgos para la salud pública y en cualquier caso se considera un fraude alimentario, definido como “cualquier acción deliberada que implica intereses económicos y comerciales afectando a la integridad del alimento”. Algunos tipos de fraude alimentario son la adulteración, que se trata en el siguiente apartado de manera específica para la leche, aunque también la sustitución, la simulación o la falsificación, (Comisión Europea, 2020). A continuación, se citan las principales adulteraciones llevadas a cabo en la leche.

El *aguado* de la leche consiste en la adición de agua en la leche para incrementar el volumen de venta. Para detectar dicho fraude se utiliza la determinación del punto crioscópico y la densimetría. El *desnatado* de la leche se considera otra práctica de adulteración, cuya detección puede realizarse mediante butirometría y densimetría. La *mezcla de leche* de cabra o de oveja con leche de vaca, considerablemente más barata, otras de las adulteraciones más frecuentes, para la elaboración de productos de alta calidad, detectable mediante pruebas inmunoquímicas, leche reconstituida a partir de subproductos como el lactosuero o la caseína, para lo que se puede emplear la cromatografía de gases para su detección.

Finalmente, se ha detectado *la adición de conservadores químicos* usados para alargar la vida útil de la leche. Estos conservadores pueden ser carbonatos y bicarbonatos alcalinos que neutralizan el ácido láctico que se produce por la acidificación de la leche. También se han utilizado antisépticos cuya acción detiene la proliferación microbiana, por ejemplo, el agua oxigenada, hipocloritos alcalinos, formol, ácido bórico y boratos, ácido salicílico y salicilatos o fluoruro.

Para evitar dichas adulteraciones, por medio del Reglamento (CE) 853/2004, se recoge la figura del operador como responsable de la higiene y la seguridad de los alimentos que produce, obligándole a la realización de planes de muestreo, a adoptar mecanismos que garanticen la trazabilidad de sus productos, a la aplicación de APPCC y sometimiento a los controles oficiales por parte de las autoridades competentes. Además, los operadores están obligados a ser registrados y autorizados por su estado miembro para el inicio de su actividad. De este modo, se puede detectar la adulteración de la leche y tomar las acciones oportunas en caso de infracción. Además, el Reglamento (UE) 2017/625 recoge en su artículo 9 las normas que rigen los controles oficiales, y establece que el indicio de que el consumidor pueda ser engañado en materia alimentaria debe ser incluido como objeto de control por parte de las autoridades competentes, identificando la violación intencionada de las normas efectuada con objetivos engañosos o fraudulentos.

## **2.4. DESCRIPCIÓN DE LA CADENA DE PRODUCCIÓN LÁCTEA**

La producción de leche consta de diferentes etapas que puntualmente pueden dividirse en dos grupos: las que se realizan con leche cruda y las que implican leche tratada térmicamente. Dentro del presente trabajo, nos centramos en las fases que se corresponden con el primer grupo.

Las fases que implican la recolección, refrigeración, transporte y recepción de leche cruda son críticas a la hora de garantizar la calidad del producto.

En el año 2004, la Unión Europea publicó el Paquete de Higiene, estableciéndose así un marco común legal para la seguridad alimentaria en el sector primario y la industria. Dentro del mismo, los Reglamentos (CE) 852/2004 y 853/2004 establecen los requisitos y pautas para fomentar las buenas prácticas de higiene, que contribuyen a la profesionalización del sector lechero en cada una de las fases de la cadena de producción.

Con respecto a los controles oficiales, el Reglamento de Ejecución 2019/627, incluye en su anexo III los métodos de ensayo para la leche cruda y la leche de vaca tratada térmicamente reconocidos para verificar el cumplimiento de las normas de higiene de la leche y otros alimentos de origen animal.

A continuación, se exponen las distintas fases de la cadena de producción de leche.

#### **2.4.1. Ordeño y almacenamiento en granjas**

La primera fase de obtención de la leche tiene lugar en las ganaderías a partir de vacas lecheras que se encuentran en el periodo de lactación, lo que ocurre desde que pare hasta 60 días antes de parir su siguiente ternero. De manera genérica, los datos medios productivos de las vacas frisonas son 30 litros diarios de media, 305 días días en lactación, 60 días días de secado, 365 días de intervalo entre partos y 27 meses de edad de primer parto.

El ordeño de las vacas debe realizarse de manera higiénica, ajustando los parámetros de las pezoneras a las características de las ubres de los animales y la maniobra debe hacerse de forma completa, evitando el sobreordeño o el ordeño incompleto. Con respecto a las rutinas de ordeño, deben realizarse a la misma hora, lo que favorece el descenso de leche por parte de la vaca para que el ordeño sea mucho más apurado en todos los animales.

La leche se obtiene de los animales en la sala de ordeño, la cual debe haber sido sometida a acciones de limpieza y desinfección tras cada ordeño. Mediante el sistema de conducción, es dirigida a una sala contigua, conocida como lechería y separada físicamente de la sala de ordeño. En la lechería se

encuentra el tanque (Figura 8), que consiste en un compartimento de acero inoxidable provisto de un sistema de refrigeración, termostato y agitadores de la leche.

**Figura 8.** Tanque en granja con leche refrigerada a punto de ser recogida por el camión cisterna



Elaboración propia

Las condiciones de tiempo y temperatura para el almacenamiento de la leche en la explotación son las marcadas por el Real Decreto 1728/2007 para la temperatura, estableciéndose un máximo de 8° C para la recogida diaria (recogida 24h) y una temperatura máxima de almacenamiento de 6° C para la recogida alterna (recogida 48h). El termostato del tanque deberá ajustarse para que la temperatura a la que la leche recogida en la granja sea la citada, teniendo en cuenta el margen de tiempo desde el ordeño hasta la recogida y estación del año.

### 2.4.2. Transporte

Constituye la fase previa a la recepción de la leche en la industria, y comprende la recogida de la leche en la granja y su transporte hasta la industria a través del camión cisterna. Las ganaderías deben disponer de una zona de recolección adecuada para la manipulación higiénica de la leche, que permita el acceso al personal y vehículo de recogida.

En el código de Prácticas Higiénicas para el transporte de alimentos a granel y alimentos semi-ensados (CAC/RCP 47-2001), se dan recomendaciones para el diseño y construcción de los recipientes para el transporte de leche, los cuales deben permitir la limpieza y desinfección eficaz, así como el drenaje completo, evitar la corrosión y ser incapaces de transferir sustancias extrañas a la leche. La limpieza y desinfección de los camiones cisterna se llevará a cabo después de cada uso, teniendo una validez máxima de 48 horas. Tras su desinfección, todos los recipientes de transporte deben ser drenados.

Las cisternas de los camiones deben mantener los productos alimenticios a una temperatura adecuada, tal y como se indica en el Capítulo IV del Reglamento (CE) 852/2004. Además, el transportista debe disponer del acuerdo sobre transportes internacionales de mercancías perecederas y sobre vehículos especiales utilizados en este transporte, cuyo contenido establece cómo deben ser transportados los alimentos perecederos. La temperatura de la leche debe ser mantenida a menos de 10° C, debiéndose mantener registros referentes a las posibles incidencias, resultados analíticos, certificados, albaranes, hoja de ruta y registros de limpieza y desinfección de la cisterna. De la incapacidad de refrigerar por parte de los camiones cisterna, que mantienen la leche en su interior en condiciones isotermas, radica la importancia de que, en las granjas, la leche cumpla con los valores establecidos en el Real Decreto 1728/2007 indicados anteriormente.

En cuanto a su estructura, las cisternas (Figura 9) pueden estar divididas en compartimentos. Aquellas que se encuentran compartimentadas permiten cargas de menor volumen en cada compartimento, lo que reduce los riesgos

asociados a la contaminación cruzada. El transporte de la leche a la industria láctea o centro de recolección/refrigeración, debe garantizar la inocuidad del producto en lo posible, atendiendo a dos factores: el tiempo y la temperatura (Real Decreto 237/2000).

**Figura 9.** Camión cisterna efectuando la recogida de leche en el tanque a través de una manguera conectada al mismo (ver Figura 8)



Elaboración propia

### 2.4.3. Transformación industrial

La industria dispone de silos de almacenamiento de leche cruda, cuyo número puede variar de una industria a otra, así como su capacidad. Estos silos almacenan la leche recogida por los camiones cisterna. En ellos, la leche cruda se debe almacenar a menos de 6° C hasta su transformación (Reglamento (CE) 853/2004).

Tras su entrada en la industria, el primer proceso que experimenta la leche es la estandarización, es decir, una higienización seguida de una termización y posterior desnatado de la leche cruda con enfriamiento final por debajo de 6° C. La higienización se realiza en centrífugas/desnatadoras, que permiten eliminar impurezas. La termización se realiza a 70 - 75° C para volver a almacenar la leche a una temperatura inferior a 6° C.

Tras la estandarización se realiza el tratamiento térmico correspondiente, la pasteurización o UHT, más frecuente en nuestro país. El tratamiento UHT

consiste, en el aporte de un flujo de calor continuo entre 135° C y 150° C durante 1 o 4 segundos con el objetivo de destruir microorganismos o esporas viables que puedan proliferar en el producto tratado cuando sea mantenido en un envase aséptico y cerrado, conservado a temperatura ambiente en un tiempo que puede variar de 3 a 6 meses.

Posteriormente, la temperatura se reduce para que la leche pueda ser envasada en condiciones asépticas. El envasado se lleva a cabo en tanques que permiten adecuar el caudal del equipo esterilizador a las líneas de envasado. Dicho tanque se esteriliza mediante vapor aproximadamente a 125° C durante 30-40 minutos. Los productos UHT son vertidos en condiciones asépticas en envases flexibles esterilizados previamente con peróxido y aire caliente. Estos envases son formados en los llamados equipos de llenado y cerrados mediante calor y presión.

La leche envasada y estéril se almacena en pallets a temperatura ambiente a la espera de su liberación tras los controles de calidad pertinentes.

## **2.5. SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD EN LA PRODUCCIÓN DE LECHE**

### **2.5.1. Normas para el control oficial**

El Control Oficial, consiste en la actuación realizada por las Autoridades Competentes para verificar el cumplimiento de la normativa vigente en materia higiénico-sanitaria tanto del operador como del alimento producido por el mismo. Los controles oficiales se materializan mediante la verificación del cumplimiento de las PCH (Prácticas Correctas de Higiene) y APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico) por parte del operador. Para PCH se realizan comprobaciones de información sobre instalaciones, higiene, formación, control de plagas, calidad del agua y documentación entre otras, y con respecto al APPCC, se comprueba que el operador lo aplica correctamente, tomando muestras en caso necesario y archivando documentación y boletines analíticos.

El Sistema de Autocontrol (APPCC y PCH) es de obligado cumplimiento por parte de las empresas, mientras que la certificación es de carácter voluntario,

### 2.5.2. Sistemas de autocontrol

El Reglamento (CE) 852/04 establece la obligatoriedad de implantar circuitos de control protocolizados para minimizar la contaminación de los alimentos y la multiplicación de microorganismos patógenos. Dentro de los Sistemas de Autocontrol se distinguen, por un lado, las PCH, que son prácticas preventivas básicas, ambientales y operativas para la producción de cualquier alimento de forma que resulte seguro, inocuo y con calidad higiénica. Aunque la Comisión Europea no detalla cómo deben ser las PCH de las empresas alimentarias, los puntos que deben ser protocolizados vienen recogidos en la normativa: (i) diseño higiénico de locales, instalaciones y equipos, (ii) plan de control de aguas, (iii) plan de limpieza y desinfección, (iv) plan de formación y control de manipuladores, (v) plan de mantenimiento, (vi) plan de control de desinsectación y desratización, (vii) plan de control de proveedores, (viii) plan de control de trazabilidad, (ix) plan de control de desperdicios y (x) plan de control de la cadena del frío. En el caso de la producción de leche, los PCH se efectúan a nivel de granjas, y existen unas guías de cumplimiento publicadas en la web del MAPA ([https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/publicaciones/INLAC\\_tcm30-103710.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/publicaciones/INLAC_tcm30-103710.pdf)).

El APPCC, por su parte, es aplicable a cada proceso y producto. Se exige para todas las industrias agroalimentarias y su aplicación requiere de un análisis del riesgo, para lo que es imprescindible establecer un diagrama de flujo que permita conocer cómo funciona el proceso y detectar los puntos de control crítico para la aplicación de medidas correctoras.

Tanto las PCH como el APPCC forman parte del Sistema de Autocontrol de la Industria láctea en tanto que la naturaleza de la leche y las distintas fases implicadas en la cadena, entrañan un potencial riesgo para la inocuidad del

producto final. En la Tabla 10 se exponen las principales diferencias entre ambos sistemas de autocontrol.

**Tabla 10.** Comparativa entre los elementos del PCH y APPCC

	<b>PCH</b>	<b>APPCC</b>
Peligros	Entorno del proceso	Proceso
Medidas de control	Generales de higiene alimentaria	Específicas
Parámetros de control	Visuales: se cumple o no se cumple	Medibles: cuantificables
Nivel de vigilancia	Seguimiento	Continua y frecuente
Medidas correctoras	Evaluar y redirigir	Sobre el producto/proceso
Documentación y registros	Abundante	Muy abundante
Gestión/coste	Moderado	Muy abundante
Formación/implantación	Moderada	Muy abundante

Elaboración propia

### **2.5.3. Aplicación del sistema de control de calidad en la cadena de producción láctea**

El APPCC es un procedimiento sistemático orientado a identificar y eliminar riesgos físicos, químicos o microbiológicos a lo largo de la cadena de producción del alimento mediante medidas descritas en un Manual que es

revisado periódicamente (Shah, 1994; HACCP/General Principles of Food Hygiene, 2003). La creación de dicho Manual debe realizarse según los requisitos descritos en el Codex Alimentarius, el Reglamento (CE) 178/2002 y los Reglamentos (CE) 852/2004 y 853/2004.

En la Tabla 11 se recogen las definiciones para los principales conceptos que deben ser tenidos en cuenta en el APPCC.

**Tabla 11.** Definición de términos incluidos en el APPCC según el Codex Alimentarius

<b>Concepto</b>	<b>Descripción</b>
Peligro	Presencia inaceptable/contaminación por agentes físicos, químicos o biológicos
Análisis de Peligros	Recopilación y evaluación de información sobre los peligros y las condiciones que los originan, para decidir cuáles son importantes en relación con la inocuidad de los alimentos y, por tanto, recogerlos en el plan de APPCC
Riesgo	Estimación de la probabilidad de presentación de un proceso que ocasione un daño o de la presentación secuencial de varios peligros, pudiéndose clasificar los grados de riesgo en: alto, moderado, bajo o despreciable
Punto de Control Crítico	Procedimiento de la cadena alimentaria en el que, si no se controla un determinado factor o factores de tipo físico, químico o biológico, se produce un riesgo inaceptable para la salud
Medida de Control	Medida y/o actividad para prevenir o eliminar un peligro para la inocuidad de los alimentos o para reducirlo a un nivel aceptable

Elaboración propia

Dentro del APPCC, los riesgos deben identificarse para su eliminación o reducción hasta niveles de seguridad aceptable, y estos se clasifican según el

riesgo de que ocurran y su importancia, lo que otorga a cada riesgo diferentes niveles de tolerancia, lo que se muestra en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Clasificación del nivel de riesgo en función de la probabilidad y gravedad

Frecuencia de aparición	Severidad		
	Baja	Media	Alta
Improbable	Tolerable	Tolerable	Medio
Ocasional	Tolerable	Medio	Intolerable
Probable	Medio	Intolerable	Intolerable

Elaboración propia

El riesgo puede tener diferentes orígenes: agentes biológicos, químicos y físicos, y las incidencias que se producen en la cadena pueden deberse a la presencia de alguno de esos agentes o de las condiciones favorables para que tengan efecto en la salud pública. Las incidencias por agentes biológicos pueden deberse al ordeño de vacas con mamitis o al manejo inadecuado durante el ordeño, refrigeración o almacenamiento o bien equipos dañados. Las incidencias por agentes químicos se producen por presencia de desinfectantes residuales debidos al proceso de limpieza del tanque. Las incidencias por agentes físicos están causadas por la presencia de materiales extraños durante el almacenamiento en tanque, camión o silo.

El establecimiento de los puntos de control crítico constituye el punto de mayor relevancia, en el que las fases del proceso deben someterse a estudio, que puede consistir en el uso de un árbol de decisiones. Para ello se suelen usar árboles de decisiones como el que se expone en la Tabla 13 y en la Figura 10, que resultan muy útiles para detectar los puntos más críticos a controlar y descartar aquellos puntos que no son realmente críticos.

**Tabla 13.** Preguntas y respuestas de un árbol de decisiones (P0, P1, P2 y P3) donde las respuestas previas determinan las preguntas posteriores en la serie

P0	P1	P2	P3	P4
Sí (P2)	Sí (modificación de fase)	Sí (PCC n <sup>o</sup> -)	Sí (P4)	Sí (No PCC)
No (P1)	No (No PCC)	No (P3)	No (No PCC)	No (PCC n <sup>o</sup> -)

Siendo:

P0: ¿Se dispone de medidas preventivas adecuadas para controlar el peligro en consideración?

P1: ¿Es necesario el control en esta fase para asegurar la inocuidad?

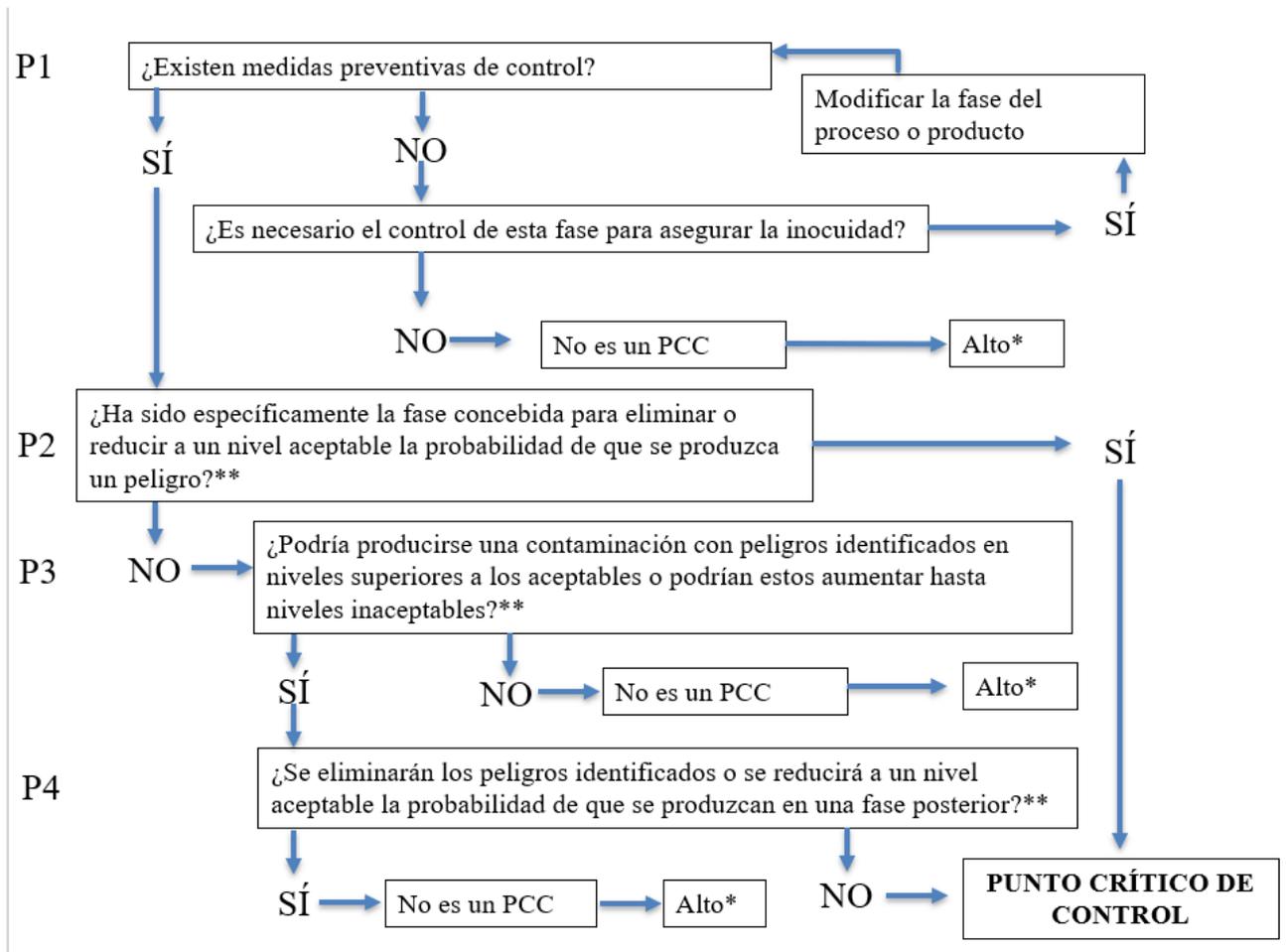
P2: ¿Se ha diseñado esta etapa específicamente para eliminar o reducir la probabilidad de aparición del peligro hasta un nivel aceptable?

P3: ¿Podría la contaminación de este peligro exceder los niveles aceptables o incrementar a niveles no aceptables?

P4: ¿Una acción posterior eliminaría o reduciría el peligro a un nivel aceptable?

Elaboración propia

**Figura 10.** Esquema del árbol de decisiones sobre puntos críticos de control (PCCs)



\*seguir con el siguiente peligro

\*\*definir niveles aceptables

Elaboración propia

Una vez diseñado el Sistema de Autocontrol, se desarrolla el documento del APPCC, específico para la industria que lo haya llevado a cabo, y que deberá ser revisado y actualizado periódicamente.

El sistema de gestión de calidad de la cadena de producción de leche se basa en (i) requisitos de locales y equipos: con un diseño que facilite su limpieza y desinfección y limite el riesgo de contaminación, (ii) higiene durante el ordeño, la recogida y el transporte mediante la limpieza de ubres y pezones, el control de la leche y el calostro para detectar alteraciones organolépticas o físico-químicas, el enfriamiento de la leche a < 8° C (recogida 24h) o 6° C (recogida 48h) y la higiene del personal manipulador durante ordeño, recogida y transporte; y por último (iii) criterios de higiene en leche, calostro y productos lácteos, garantizando que los animales están sanos, que tanto la leche como el

establecimiento y el proceso, cumplen con los requisitos de registros, calidad y seguridad alimentaria establecidos por la normativa vigente.

La obtención de la leche cruda en granjas y el transporte a la industria no implica la adopción de un sistema APPCC por parte de los actores implicados, pero sí obliga a la industria láctea a garantizar la seguridad y calidad de la leche que produce y comercializa, por lo que se exige que sus proveedores apliquen correctamente las PCH. En el caso concreto de la leche, se aplica el Código de Prácticas de Higiene para la Leche y los Productos Lácteos (CAC/RCP 57-2004), así como el cumplimiento de la normativa vigente en materia de requisitos de higiene de productos de origen animal. En este sentido, la producción de leche requiere de una adecuada alimentación de los animales, así como mantener unas adecuadas condiciones sanitarias, de estabulación, proporcionando agua de calidad y garantizando en definitiva el confort y bienestar que los animales precisan. Cabe destacar la importancia de respetar los periodos de supresión tras la aplicación de determinados medicamentos a los animales sometidos a ordeño, por sus repercusiones para la salud pública y las actuales estrategias encaminadas a combatir las resistencias a los antibióticos.

Durante la fase de transporte, se deben aplicar condiciones higiénicas que permitan prevenir la contaminación microbiológica. En este sentido, factores tales como las características del tanque, las rutinas de ordeño, o la limpieza y los equipos de refrigeración, pueden afectar a la conservación de la leche hasta su retirada por parte del camión cisterna (Elmoslemany y cols., 2010). El transportista debe estar cualificado y formado para llevar a cabo el correcto manejo de la leche cruda y realizar el primer análisis de calidad de la leche mediante la recogida de muestras y la anotación previa de la temperatura de almacenamiento. En este sentido, tal y como se expuso anteriormente, al ser los camiones isotermos, no tienen capacidad de refrigerar la leche sino de mantener constante su temperatura, por tanto, la medición de la temperatura de la leche en los tanques debe ser verificada por el transportista, actuando en este punto como responsable de calidad. Su importancia radica además en que la industria sólo aceptará leche que se encuentre en los camiones cisterna a menos 10° C, por lo que existe un margen de apenas 2 – 4° C de aumento de temperatura desde la recogida de la leche en granjas hasta la industria.

Las cisternas de los camiones están normalmente divididas en subunidades, y deben seguir las especificaciones que recoge el Codex Alimentarius acerca de su diseño y características sobre la frecuencia de limpieza (según el Acuerdo sobre Transporte Internacional de Mercancías Perecederas), sistema de drenaje o composición.

Por su parte, las industrias lácteas, están obligadas a disponer de un APPCC dirigido a: (i) análisis de riesgos, (ii) detección de puntos críticos durante el proceso, (iii) establecimiento de límites críticos, (iv) requisitos para el seguimiento de los puntos críticos de control y (v) verificación de las acciones correctivas (Peristeropoulou y cols., 2015). El APPCC de la industria láctea tiene como objetivo la mejora de la calidad y seguridad de la leche y productos lácteos y la reducción de los riesgos para la protección del consumidor (Lizcano y cols., 2009). En la industria láctea, para las fases en la que la leche está cruda, los factores asociados a los posibles riesgos son el tiempo y la temperatura, ya que los recuentos microbiológicos pueden verse influenciados por el tiempo transcurrido desde el ordeño hasta el tratamiento térmico en la industria (De Oliveira, 2015; Godič Torkar y Golc Teger, 2008). No obstante, aunque la mayoría de los microorganismos se inactivan tras la aplicación del tratamiento térmico, el manejo de la leche cruda durante las fases previas, es decisivo para garantizar la calidad y minimizar los efectos indeseables que los microorganismos pueden ocasionar de manera indirecta en el producto envasado (Shah, 1994), y de ahí la regulación de determinados niveles de gérmenes en la leche cruda.

El control de calidad de la leche cruda se realiza a través de analíticas en laboratorios autorizados y comunicados a LETRA Q. Se trata de un sistema de información web a través del que se permite el registro e identificación de los agentes, establecimientos y contenedores que forman parte del sector lácteo, de los movimientos de leche cruda, y de los resultados obtenidos del análisis de las muestras de leche cruda destinada al consumo humano. LETRA Q se enmarca en el objetivo del MAPA para la mejora de la trazabilidad y de la calidad de la leche cruda de vaca.

Por otro lado, para garantizar la seguridad alimentaria y calidad de la leche cruda, la industria láctea realiza a diario controles mediante la toma de muestras,

para detectar células somáticas, gérmenes, inhibidores (sustancias antibióticas, compuestos de sulfamidas y otros componentes tales como desinfectantes, detergentes), residuos antibióticos y micotoxinas. El incumplimiento de los requisitos de calidad e higiene por parte del productor implica la suspensión de la entrega de la leche producida por el mismo, o que esta sea destinada a la elaboración de productos lácteos tras el conveniente tratamiento térmico, de acuerdo con una autorización de la autoridad competente (Real Decreto 1338/2011).

Desde el punto de vista físico-químico, se mide color, olor, apariencia, acidez, estabilidad al alcohol, punto crioscópico y temperatura de la leche en las cisternas. También se mide grasa, proteína y extracto seco. Los parámetros evaluados, valores aceptables y métodos de medición se recogen en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Valores aceptables del control de calidad y de composición de la leche cruda

<b>Parámetro</b>	<b>Resultado</b>	<b>Método analítico</b>
Color, olor y apariencia	Normal <sup>1</sup>	Visual
Acidez	< 18° D	Valoración ácido base
Estabilidad al alcohol	Estable a 76° C	Volumetría
Punto crioscópico	< (- 0,510)	Crioscopio
Temperatura	> 0° C y < 10° C	Termómetro
Composición	Materia grasa 3,5% Proteína 3% Extracto seco 8,4%	Milkoscan

<sup>1</sup> Según la descripción que el Reglamento 853/2004 recoge para la leche

Elaboración propia

#### **2.5.4. Autocontrol voluntario: certificaciones de calidad**

El autocontrol voluntario es uno de los mecanismos que las empresas alimentarias emplean cumpliendo requisitos más allá de los obligatorios por la normativa. Al ser voluntario, las empresas escogen no certificarse, escoger una determinada certificación o varias que recojan ciertos requisitos cuyo cumplimiento les proporcione ventajas competitivas con respecto a otras empresas. Las certificaciones pueden ser conocidas por los consumidores quienes sean los mayores demandantes del cumplimiento de sus requisitos, o bien, determinadas superficies de supermercados sólo admiten productos de empresas que trabajen bajo las exigencias de esas certificaciones, como por ejemplo la certificación por indicación geográfica protegida, por ser producidos de manera respetuosa con el medio ambiente o bajo requisitos de bienestar animal entre otras.

Las autoridades competentes no realizan inspecciones ni pueden realizar sanciones por las no conformidades acontecidas durante una auditoría de este tipo, y las auditorías son realizadas por personal formado por las propias certificadoras.

A continuación, se exponen algunas certificaciones de interés para las industrias lácteas.

##### *2.5.4.1. Normas ISO*

Según la Organización Internacional de Normalización (ISO), la Calidad de un producto o servicio se define como la capacidad de satisfacer las necesidades declaradas o implícitas del consumidor a través de sus propiedades o características. ISO es la Organización encargada de determinar los estándares para la producción de productos o servicios según determinadas especificaciones de calidad, seguridad y eficiencia. Las Normas ISO fueron un conjunto de normas desarrolladas para crear un marco normativo internacional orientado a garantizar la calidad durante el proceso de producción (Russel, 2000; Barendsz, 1998). De este modo, las empresas pueden diferenciarse de su

competencia mediante la aplicación de los requisitos y estándares de las Normas ISO, que, en productos alimentarios, están focalizados en el control de los riesgos de los alimentos, siguiendo sus protocolos de calidad y seguridad, mejora y actualización continua, lo que redundará en una mayor transparencia de la industria (ISO 22000:2005).

#### 2.5.4.2. IFS FOOD

IFS Food consiste en una norma de seguridad alimentaria reconocida por la Global Food Safety Initiative (GFSI) dedicada a auditar industrias alimentarias que empaquetan productos alimentarios a granel, centrándose en la seguridad y calidad alimentaria de los productos procesados. La certificación IFS garantiza la ventaja competitiva en el mercado por la excelencia en la calidad, seguridad y satisfacción del cliente.

Los requisitos exigidos, van encaminados al cumplimiento de especificaciones relacionadas con la reducción de peligros de contaminación del producto durante el envasado. Su alcance está compensado con el envasado y etiquetado, que reconoce la seguridad y calidad de la marca.

Además de los beneficios de la marca y consumidor, esta certificación garantiza mejoras de comunicación de los equipos y del uso de los recursos.

#### 2.5.4.3. ADILAC

Se trata de un sello dirigido a productos creado por la asociación de intolerantes a la lactosa España, y su certificación se lleva a cabo con la participación de laboratorios de análisis de alimentos independientes.

La incorporación del sello NO LACTOSA, identifica los productos que no contienen lactosa garantizando que los productos que lleven este sello cumplen

con los requisitos exigidos por Adilac. Para el análisis de detección de lactosa en los alimentos se utilizan como métodos de diagnóstico el HPLC/PAD y la Espectrofotometría. El producto consigue el sello NO LACTOSA cuando tras la aplicación de dichos métodos, contiene < 0.01 %, lo cual equivale a < 0.01 gr / 100 gr; < 10 mg / 100 gr; < 100 mg/1 kg o < 100 ppm. Este es límite aceptado por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en España para considerar un producto libre de lactosa.

## **2.6. ETIQUETADO**

El etiquetado de los alimentos constituye un instrumento para mejorar la información respetando el derecho a la misma de los consumidores y evitando posibles fraudes y está regulado por el Reglamento (UE) 1169/2011. En primer lugar, se exige un etiquetado obligatorio sobre la información nutricional que recoja el valor energético, las grasas, las grasas saturadas, los hidratos de carbono, los azúcares, las proteínas y la sal, y su declaración debe realizarse obligatoriamente por 100 g o por 100 mL. Esta información puede complementarse de manera voluntaria con los valores de otros nutrientes como: ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, polialcoholes, almidón, fibra alimentaria, vitaminas o minerales. En el etiquetado se acepta además el uso de pictogramas y semáforos que facilite su comprensión por parte del consumidor.

Por otro lado, el Reglamento incide en que el etiquetado sea claro y legible, estableciendo un mínimo de fuente para la información obligatoria. Además, debe informar siempre de la presencia de posibles alérgenos, la cantidad neta y la fecha de duración mínima e indicar el país de origen o de procedencia del alimento. Adicionalmente a este punto, en España se ha recogido en el Real Decreto 1181/2018, la obligatoriedad de indicar el origen de la leche utilizada como ingrediente en el etiquetado de la leche y los productos lácteos que se comercializan en el territorio español.

## **2.7. HERRAMIENTAS PARA EL CONTROL Y LA MEJORA DE LOS SISTEMAS DE GESTIÓN DE CALIDAD DE LA LECHE**

### **2.7.1. Microbiología predictiva**

La microbiología predictiva tiene una gran utilidad práctica para prevenir la alteración de los alimentos a causa de la proliferación microbiana. El tiempo transcurrido para que un alimento se considere alterado desde el punto de vista microbiológico, está determinado por el tiempo que los microorganismos responsables de la alteración tardan en duplicarse.

El origen de la microbiología predictiva tal y como se conoce actualmente surgió en los años 60 a partir de modelos cinéticos de crecimiento microbiano para evitar problemas de alteración en los alimentos, lo que evolucionó a modelos predictivos para evaluar la probabilidad de producción de toxinas microbianas (Roberts y cols., 1981).

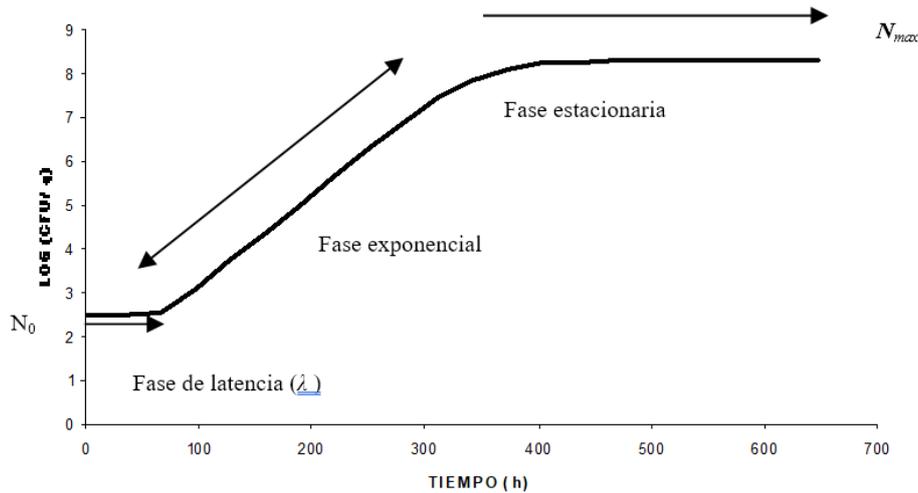
Los modelos predictivos proporcionan de manera rápida información sobre el comportamiento de microorganismos bajo determinadas condiciones ambientales y pueden ser herramientas empleadas para la toma de decisiones en una industria alimentaria en las siguientes áreas: análisis de riesgos y puntos críticos de control, evaluación de riesgo, estudios de vida comercial, I+D de un producto, medidas de higiene e integración de temperatura, educación y diseño de experimentos (Pérez Rodríguez y Valero, 2013).

#### *2.7.1.1. Tipos de modelos predictivos*

Los modelos se clasifican según su grado de complejidad en modelos primarios, secundarios y terciarios. Los modelos primarios, que se subdividen en modelos cinéticos de crecimiento y de inactivación, describen el comportamiento microbiano, siendo capaces de predecir la evolución de los microorganismos en un determinado medio frente a un conjunto de factores ambientales (McDonald y Sun, 1999). En el caso de los modelos cinéticos de crecimiento, los parámetros que se obtienen a través de los modelos y que ayudan a predecir este

comportamiento son la densidad máxima de población ( $N_{max}$ ), la tasa máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ), la fase de adaptación o de latencia ( $\lambda$ ) y el inóculo inicial ( $N_0$ ), y se representan en la Figura 11.

**Figura 11.** Representación de la curva de crecimiento microbiano



Fuente: Valero, 2006

En un nivel mayor de desarrollo, los modelos secundarios describen la relación existente entre los factores ambientales (temperatura, pH, actividad de agua etc.) y los parámetros cinéticos del microorganismo a través de distintas ecuaciones matemáticas.

Por último, los modelos terciarios son aquellos, que, basados en primarios y secundarios, están integrados en plataformas informáticas de fácil uso para poder realizar su implementación. A lo largo de los últimos años se ha visto incrementado el número de programas informáticos destinados a tales fines que proporcionan unas estimaciones del riesgo microbiológico cada vez más precisas y útiles para el sector (Tenenhaus-Aziza & Ellouze, 2015). En relación con los patógenos potencialmente presentes en los alimentos, a través de un mayor conocimiento de la variabilidad en las condiciones de procesado, alimentos y peligros asociados la cuantificación del riesgo se hará de forma más

precisa, lo que permitirá una toma de decisiones más rápida y eficaz sobre la seguridad alimentaria.

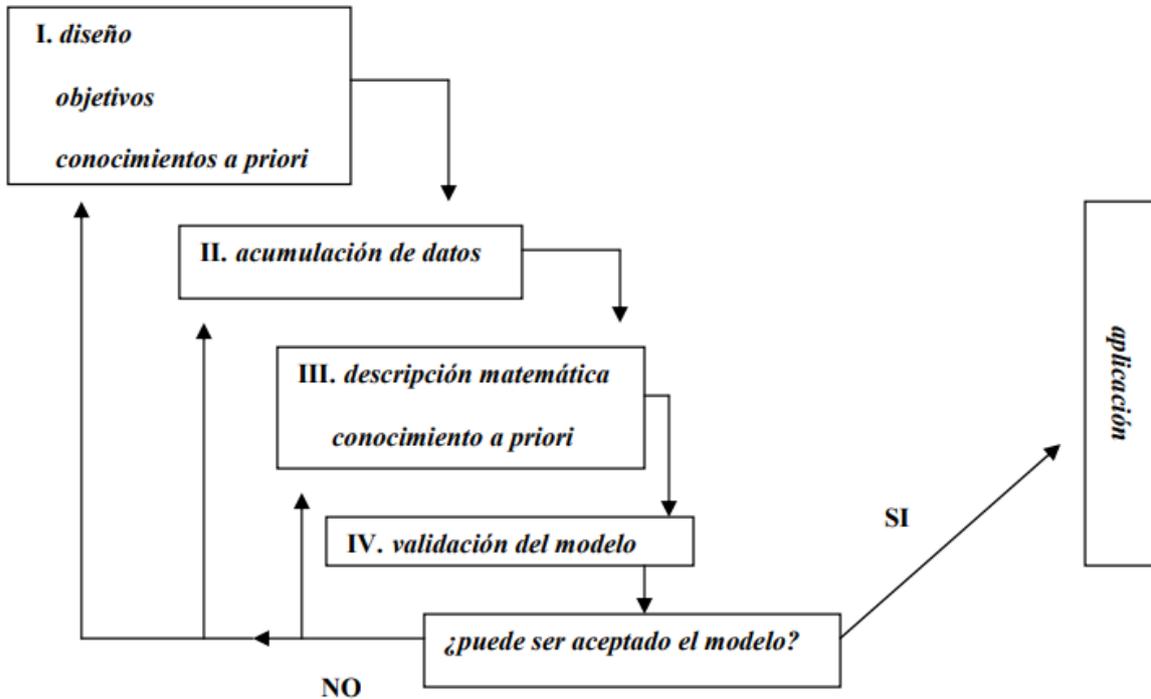
El software MicroHibro 2.0.6 ® fue creado por el Grupo HIBRO PAIDI AGR – 170 de la Universidad de Córdoba, y es la única herramienta desarrollada en España que integra la aplicación de modelos de microbiología predictiva y evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico en alimentos. Actualmente, la herramienta está siendo utilizada por organismos consultivos, académicos, institucionales e industrias agroalimentarias, y se puede acceder a través del siguiente enlace: <http://www.microhibro.com/>.

Entre sus diferentes aplicaciones, cabe destacar: el conocimiento de la influencia de los factores ambientales sobre las respuestas microbianas en los alimentos, la estimación de la vida comercial de los productos, el desarrollo de evaluaciones del riesgo microbiológico y la implementación de planes de muestreo y criterios microbiológicos en los alimentos.

#### *2.7.1.2. Etapas para el desarrollo de los modelos predictivos*

Hay que distinguir cuatro etapas: el diseño, la acumulación de datos y análisis, el ajuste de los datos experimentales y la validación y predicción, las cuales se representan a modo esquemático en la Figura 12.

**Figura 12.** Etapas para el desarrollo de un modelo



Fuente: Valero, 2006

El diseño depende del objetivo perseguido, por lo que el diseño utilizado para estimar cuantitativamente el crecimiento o inactivación microbiana, donde se representa la cinética de aumento o descenso del microorganismo, no será el mismo que para el desarrollo de un modelo de probabilidad, donde se estima la probabilidad de crecimiento de un microorganismo. Por su parte, la acumulación de datos debe realizarse mediante la recopilación de éstos durante el periodo de crecimiento/inactivación del microorganismo. Aunque actualmente existen diferentes metodologías para acumular datos, el clásico consiste en medidas de recuento en placa. La descripción matemática del modelo consiste en el ajuste de una función matemática al conjunto de datos obtenidos que da lugar a unos parámetros del modelo primario que se relacionan con los factores considerados mediante un modelo secundario. La última etapa consiste en la validación del modelo, en cuyo proceso se establece una comparación entre las variables dependientes estimadas por el modelo y los observados en los alimentos para un mismo microorganismo.

### 2.7.2. Análisis del riesgo microbiológico

El riesgo microbiológico se define como la probabilidad de que un peligro microbiológico se presente en el alimento. En este sentido, la Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiológico (ECRM) es una metodología internacionalmente reconocida (FAO, 2020) que tiene como objetivo estimar el riesgo de toxiinfecciones asociado al consumo de alimentos mediante el análisis de datos e información científica. De esta manera se obtiene un marco para evaluar de manera objetiva determinados peligros, establecer criterios microbiológicos, definir pautas de actuación por parte de determinados países, completar información existente, caracterizar los factores de riesgo más relevantes en la cadena, identificar estrategias para minimizar el riesgo e identificar las prioridades para la creación de programas de Salud Pública y Seguridad Alimentaria. Por todo ello, la ECRM es clave para el desarrollo de las políticas alimentarias, integrándose, para ello, en un esquema de Análisis del Riesgo Microbiológico en el que se distinguen tres componentes: (i) evaluación del riesgo, (ii) gestión del riesgo y (iii) comunicación del riesgo, tal y como se recoge en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Descripción de las tres etapas del Análisis del riesgo microbiológico

Análisis del riesgo	Etapas y descripción
Evaluación del riesgo	Identificación del peligro Caracterización del peligro Evaluación de la exposición Caracterización del riesgo
Gestión del riesgo	Selección e implementación de medidas correctoras
Comunicación del riesgo	Intercambio de información y opiniones entre los diferentes actores de la cadena

Elaboración propia

### 2.7.2.1. Etapas de la Evaluación del riesgo

La evaluación del riesgo se define como la determinación de los efectos adversos para la salud de los consumidores, que pueden producirse como consecuencia de su exposición a peligros de origen alimentario. Forma parte de los tres componentes del análisis de riesgo en las que las autoridades sanitarias se basan para desarrollar sus políticas (FAO, 2020).

La evaluación del riesgo constituye la primera etapa del análisis del riesgo microbiológico y de ella se distinguen cuatro fases. La primera de ellas consiste en la identificación del peligro, es decir, en detectar el microorganismo responsable de la toxiinfección alimentaria mediante una asociación significativa entre éste y un alimento determinado. Para ello, es necesario conocer la especie de microorganismo, su ecología, posibles reservorios, fuentes de contaminación, prevalencia conocida en el alimento, brotes registrados, factores que afectan a su crecimiento y supervivencia. La segunda fase consiste en la caracterización del peligro y se define como la evaluación de los efectos adversos sobre la salud, asociados a un determinado peligro. Comprende la relación causa – efecto y dosis – respuesta descrita por la población que contrae la enfermedad tras haber sido expuesta a determinado nivel de contaminación, y acontece en las etapas representadas en la Figura 13:

**Figura 13.** Esquema de las etapas de un proceso dosis – respuesta



Elaboración propia

El nivel de contaminación del alimento, virulencia, efectos del patógeno sobre el alimento o susceptibilidad del individuo, son factores que permiten cuantificar el fenómeno dosis – respuesta mediante el desarrollo de modelos específicos.

La tercera fase es la *evaluación de la exposición* y permite conocer desde el punto de vista cuantitativo y cualitativo, la probabilidad de ingestión de un agente físico, químico o biológico a través de los alimentos, así como la exposición procedente de otras fuentes. En el caso concreto de microorganismos que pueden causar toxiinfecciones en alimentos, existen cinco factores que influyen en el riesgo de exposición: (i) cantidad y frecuencia de consumo del alimento, (ii) frecuencia y niveles de contaminación (prevalencia/concentración), (iii) capacidad de crecimiento y supervivencia del microorganismo en el alimento, (iv) temperatura y tiempo de almacenamiento (CAC/GL 30-1999). La última fase consiste en la *caracterización del riesgo*, mediante la cual se estima cualitativa y cuantitativamente la probabilidad y severidad de determinado efecto adverso sobre la población, basado en la Identificación del Peligro, Caracterización del Peligro y Evaluación de la Exposición. Esta etapa requiere de mucha información procedente del conocimiento microbiológico, tecnológico o matemático (Valero, 2006).

#### 2.7.2.2. *Gestión del riesgo*

La gestión del riesgo forma parte del análisis del riesgo y consiste en el proceso de ponderación de las distintas opciones normativas y de control, teniendo en cuenta los resultados de una evaluación del riesgo y la selección de las medidas necesarias para prevenir, reducir o eliminar el riesgo de manera que pueda garantizarse una elevada protección de salud.

La gestión del riesgo requiere de la figura de un responsable, con la formación necesaria para interpretar la información relativa a los resultados de la evaluación científica del riesgo y es el encargado de la toma de decisiones acerca de la ECRM y de su comunicación a otras personas.

Para una eficaz gestión de riesgos es importante que exista un mayor acuerdo a nivel internacional sobre los niveles aceptables de seguridad alimentaria. Por otro lado, se requiere de una base de datos más fiable y disponible para el establecimiento de esos niveles aceptables en la higiene alimentaria.

### 2.7.2.3. *Comunicación del riesgo*

La comunicación del riesgo es la última etapa que integra el análisis del riesgo, y se define como el intercambio de información entre los evaluadores, consumidores y otras partes interesadas sobre los factores relacionados con el alimento y el riesgo en sí mismo. Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la comunicación del riesgo tiene el objetivo de aumentar la concienciación y comprensión por parte de las partes interesadas respecto a la toma de decisiones en base a la evaluación y gestión de la seguridad alimentaria, así como alcanzar juicios más objetivos relativos a los peligros y riesgos en la alimentación. En base a la comunicación del riesgo y ante factores como la globalización y el cambio de preferencias del consumidor, las autoridades se enfrentan a desafíos como el de comunicar información a todas las partes interesadas a un nivel de comprensión adecuado para cada audiencia. Se trata, por tanto, de una etapa muy importante ya que la responsabilidad de la gestión de riesgos no se completa hasta que no se lleva a cabo una comunicación correcta de las actuaciones llevadas a cabo (FAO/OMS, 2016).



# CAPÍTULO 3

---

## Hipótesis y objetivos



## CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta la importancia de la leche desde el punto de vista productivo y su elevado consumo mundial, las incidencias detectadas en este alimento implican relevantes repercusiones en el sector lácteo. Por ello la industria láctea requiere un sistema de gestión de calidad específico, vivo y actualizado.

Los proveedores de leche son múltiples en la mayoría de las industrias, lo que conlleva que exista variabilidad tanto en la aplicación de las PCH, como en los sistemas de refrigeración empleados en la lechería. Ambos factores pueden ser determinantes en la calidad microbiológica de la leche y a su vez, traer consigo repercusiones energéticas y económicas en la industria según sea necesario establecer tratamientos térmicos (UHT) más severos acorde a la carga microbiológica de la materia prima. En este sentido, los microorganismos psicrotrofos son capaces de proliferar en condiciones de frío, incrementándose de manera exponencial en función del tiempo de almacenamiento y produciendo enzimas alterantes, que afectarían negativamente la calidad y seguridad del producto lácteo. La presente Tesis Doctoral parte de la hipótesis de que determinadas pautas de ordeño y recogida, sistemas de refrigeración de los tanques y fases de la cadena, influyen en los recuentos microbiológicos de la leche pudiendo incrementarlos o reducirlos en función de factores como el tiempo de almacenamiento o la temperatura de refrigeración, así como un mayor conocimiento de la cadena y del comportamiento microbiano, contribuye a la toma de decisiones para garantizar la calidad y seguridad alimentaria del producto. Para su estudio se emplearán herramientas de análisis del riesgo basadas en modelos de microbiología predictiva, que permitirán, entre otros, la detección de los puntos y límites críticos por encima de los cuales, la calidad organoléptica del producto se ve comprometida.

Con la hipótesis anteriormente planteada, se exponen a continuación los siguientes Objetivos:

Objetivo general:

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo general estudiar la eficacia de los Sistemas de Calidad en las industrias agroalimentarias, y, en concreto, en las industrias lácteas, para garantizar la calidad y seguridad alimentaria de la leche suministrada a los consumidores mediante el uso de herramientas de Microbiología Predictiva para la toma de decisiones a lo largo de la cadena alimentaria.

Objetivos específicos:

1. Hacer una revisión completa de la cadena de producción de leche, comercialización y microbiología de la leche (*Capítulo 2*).
2. Estudiar el funcionamiento de los tanques de almacenamiento de leche cruda en granjas y evaluar su influencia sobre la calidad de la leche (*Capítulo 4*).
3. Evaluar el impacto de las pautas de ordeño y recogida de la leche en granjas sobre su calidad microbiológica (*Capítulos 4 y 5*).
4. Determinar el efecto de las fases posteriores al ordeño sobre la carga microbiana de la leche (*Capítulo 4*).
5. Definir una Calidad que abarque toda la cadena de producción de leche cruda (*Capítulos 2, 4, 5 y 6*).
6. Estimar, mediante el uso de modelos de microbiología predictivos, el efecto de las distintas condiciones de almacenamiento sobre la dinámica de poblaciones bacterianas alterantes en leche (*Capítulo 6*).



# CAPÍTULO 4

---

## Propuesta de medidas de control de calidad en la cadena de producción de leche

Este capítulo ha sido el resultado de la integración por un lado de un estudio de eficiencia realizado en los tanques de las granjas y otro presentado como comunicación oral y póster en el **XX Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos (SEM)**, 14-16 de septiembre de 2016, León, España, cuyos autores han sido: Lucía Reguillo, Manuela Hernández, Fernando Pérez Rodríguez y Antonio Valero.



# CAPÍTULO 4. PROPUESTA DE MEDIDAS DE CONTROL DE CALIDAD EN LA CADENA DE PRODUCCIÓN DE LECHE

## 4.1. RESUMEN

Debido a que la leche cruda constituye un medio favorable para la proliferación microbiana, es preciso que las industrias lácteas implementen medidas de control de calidad para garantizar la inocuidad de la leche. En el presente estudio, se establecieron distintas estrategias de control de calidad en la cadena de producción de leche. En primer lugar, para conocer la influencia de los sistemas de refrigeración de los tanques en la cadena de frío, se monitorizaron un total de catorce equipos, de los cuales, ocho pertenecieron a granjas con recogida 48h, y que, por tanto, almacenaban la leche correspondiente a cuatro ordeños y seis pertenecieron a granjas con recogida 24h, para las cuales, los camiones cisterna recogían la leche correspondiente a los dos ordeños diarios. Este trabajo ha demostrado diferencias en cuanto a la eficiencia de los tanques para la refrigeración de la leche y propone un sistema de monitorización a incluir en el Plan de Control de la Cadena de Frío, dentro de las Prácticas Correctas de Higiene de la leche en las explotaciones. La propuesta del estudio de la influencia de la recogida diaria sobre los recuentos microbiológicos y la búsqueda bibliográfica de la cadena de producción de leche, se plantea como una medida orientada a conocer una parte de la cadena en la que no existe un control exhaustivo por parte de las industrias y permite prever incrementos de recuentos y tomar medidas y decisiones.

Por otro lado, para comprobar el efecto de la frescura de la leche sobre su calidad, se realizó un estudio microbiológico en cada fase de la cadena de producción de leche, ordeño en tanques, transporte en camiones cisterna e industria en silos, comparando la recogida 24h frente a la recogida 48h. Los resultados indicaron que la recogida 48h tuvo un efecto negativo sobre la calidad microbiológica de la leche, y en concreto sobre los niveles de aerobios mesófilos que se vieron incrementados un 38, 23 y un 31 % en tanques, cisternas y silos

respectivamente. Además, mediante este estudio se pudo demostrar la existencia de un aumento de la carga microbiana de la leche del 50% en cisternas respecto a tanques y del 69% en silos respecto a cisternas.

## 4.2. INTRODUCCIÓN

El Control Oficial consiste en el mecanismo por parte de las Autoridades Competentes para verificar el cumplimiento de la normativa vigente tanto del operador como del alimento producido por el mismo. En el conocido como Paquete de Higiene, que es el conjunto de disposiciones relativas a la higiene de los alimentos, se incluyen tanto las condiciones de los alimentos en aspectos como la inocuidad y la seguridad alimentaria, como mecanismos de autocontrol que deben cumplir los operadores de las empresas alimentarias como el sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC), que debe ser aplicado por el operador tomando muestras en caso necesario y las Prácticas Correctas de Higiene (PCH), a efectuar por el operador sobre instalaciones, higiene, formación, control de plagas, calidad del agua y documentación, entre otras.

En el caso de la producción de leche, existen unas guías de cumplimiento de PCH a nivel de granjas, publicadas por el MAPA (INLAC, 2005). No obstante, los puntos que deben ser protocolizados se recogen en la normativa y son los siguientes: (i) Diseño higiénico de locales, Instalaciones y equipo, (ii) Plan de control de aguas, (iii) Plan de limpieza y desinfección, (iv) Plan de formación y control de manipuladores, (v) Plan de mantenimiento, (vi) Plan de control de desinsectación y desratización, (vii) Plan de control de proveedores, (viii) Plan de control de trazabilidad, (ix) Plan de control de desperdicios y (x) Plan de control de la cadena del frío. En relación con el punto (x), el Plan de control de la cadena del frío, su necesidad radica en que la leche constituye, por sus propias características, un medio favorable para la proliferación de microorganismos, lo que se ve incrementado cuando la cadena de frío se rompe, o la temperatura de refrigeración de la leche es inadecuada.

La producción de leche se inicia con el ordeño diario de los animales y su almacenamiento mediante diferentes sistemas de conducción y equipos de

refrigeración. Estos últimos cuentan con sondas que permiten medir la temperatura de su interior. Los sistemas de refrigeración permiten la regulación de la temperatura de la leche en el tanque en un rango de entre 4 - 6° C., puesto que se exige que la leche, en el momento de la recogida, esté a 6° C cuando la recogida se hace cada dos días y a 8° C cuando la recogida se realiza a diario (Real Decreto 1728/2007).

Las características del tanque, así como las rutinas de ordeño y limpieza y equipos de refrigeración, desempeñan un rol muy importante en la conservación de la leche hasta su retirada por parte del camión cisterna. Así como el plan de control de la cadena del frío, debe estar incluido en los APPCC de la industria (Lizcano y cols., 2009), no existe, sin embargo, un protocolo específico para la monitorización de los tanques, que permita garantizar un adecuado inicio de la cadena de frío y prever posibles incidencias en la industria para tomar decisiones al respecto.

La adopción de estrategias para el control del riesgo microbiológico es necesaria en especial para productos como la leche, rica en nutrientes, lo que contribuye a la multiplicación de los microorganismos (Peristeropoulou y cols., 2015). No obstante, mantener la leche en condiciones de refrigeración no previene de la proliferación microbiana. La presencia de especies de microorganismos psicrotrofos, capaces de multiplicarse a temperaturas inferiores a 7° C, es la principal causa de que el recuento de bacterias totales pueda aumentar durante el almacenamiento prolongado en frío. Algunas de estas especies son *Pseudomonas*, *Alcalígenes*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus* y géneros de la Familia Enterobacteriaceae (Shah, 1994; Stepaniak, 2000; Hayes y Boor, 2001). En muchos casos, aunque las especies no sean patógenas, su crecimiento en condiciones de refrigeración puede resultar en la producción de enzimas proteolíticas y lipolíticas que ejercen su acción incluso tras el tratamiento térmico aplicado, lo que provoca alteraciones organolépticas en leche y problemas de estabilidad (Shah, 1994; Stepaniak, 2000; Hayes y Boor, 2001). Por ello, a un adecuado control de la cadena de frío en condiciones de refrigeración, se le deben sumar unas prácticas correctas de higiene, puesto que todos los operadores que participan en la cadena de producción de leche contribuyen en mayor o menor medida en la calidad y seguridad del producto final.

Estudios previos han demostrado que el almacenamiento de leche más allá de 48 horas a 6° C permite un incremento de hasta 5 log UFC/ml de bacterias psicrotrofas (De Oliveira y cols., 2015). En este sentido, existen evidencias del efecto de cuatro ordeños sobre la multiplicación de los microorganismos presentes en la leche (De Oliveira y cols., 2015), debido a las oscilaciones de temperatura y mayor tiempo de almacenamiento en tanque. Por otro lado, el vaciado diario del tanque, frente al vaciado cada 48 horas, implica una mayor frecuencia de limpieza del mismo, lo que puede tener efecto en el punto crioscópico de la leche debido a que restos de agua de lavado pueden ser incorporados en la leche recién ordeñada y, por tanto, incrementar el punto crioscópico, lo que puede ser considerado adulteración de la leche.

En el presente trabajo se propone, por un lado i) el diseño de un protocolo de monitorización de la eficiencia de los tanques, describiendo, en el ordeño, el efecto de las diferentes fases de refrigeración y estableciendo una correlación de dicha eficiencia con la concentración microbiana de la leche; y por otro lado, ii) un estudio del efecto de la recogida 24h en la calidad de la leche frente a la recogida 48h, monitorizando las distintas etapas de la cadena, desde el punto de vista físico (punto crioscópico) y microbiológico.

## **4.3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.3.1. Descripción de la ruta de obtención de la leche**

La leche recién ordeñada fue dirigida desde la sala de ordeño al tanque de refrigeración situado en la lechería, donde se almacenó antes de ser recogida por el camión cisterna.

El camión cisterna transportó la leche en condiciones isotermas hasta la industria, en la que, tras verificar la temperatura de la leche contenida en la cisterna, se descargó y almacenó en los silos hasta su transformación posterior.

Las rutas de recogida 24h fueron efectuadas por camiones diferentes a aquellos que recogieron la leche cada 48h.

### **4.3.2. Muestras de leche**

#### *4.3.2.1. Ganaderías*

Las ganaderías que participaron en el estudio se encuentran ubicadas en la zona norte de Andalucía, a un radio de distancia inferior a 80 km de la industria. Todas ellas estaban registradas dentro del sistema de trazabilidad LETRA Q (Plan Nacional de Control de la Cadena Alimentaria: Programa Nacional de Control Oficial de las Condiciones Higiénico-sanitarias de la Producción y de la Trazabilidad de Leche Cruda, 2011-2015).

La monitorización en la fase de ordeño, esto es en el tanque de almacenamiento, se realizó en un total de 14 granjas de diferentes características, buscando diferencias en cuanto a rutina de ordeño, número de ordeños, uso de placas refrigeradoras, volumen de litros de leche, número de vacas ordeñadas y capacidad del tanque. Seis ganaderías de las analizadas realizaban dos ordeños antes de recogerse la leche, aplicándose la recogida 24h y ocho ganaderías realizaban un total de cuatro ordeños antes de la recogida, correspondientes a dos ordeños por día en la recogida 48h. Las características productivas de las ganaderías del estudio se reflejan en la Tabla 16.

En el estudio microbiológico aplicado a las fases posteriores, después de la recogida de la leche, se analizaron muestras procedentes de un total de 232 ganaderías.

En ambos tipos de estudios se siguieron las mismas especificaciones para el muestreo, lo que se describe en el apartado 4.2.2.2.

**Tabla 16.** Número de ordeños, horarios y censo de vacas en ordeño de las ganaderías participantes en el estudio

Granjas	Nº ordeños	Hora de primer ordeño	Hora de segundo ordeño	Hora de recogida de leche	Hora de limpieza del tanque	Censo de vacas
<b>1</b>	2 (24h)	6:00	18:00	5:00	5:00	171
<b>2</b>	2 (24h)	6:00	18:00	5:00	5:00	145
<b>3</b>	2 (24h)	6:00	17:30	13:00	6:00	204
<b>4</b>	2 (24h)	6:30	17:00	3:30	3:30	167
<b>5</b>	2 (24h)	17:15	6:30	9:30	10:00	134
<b>6</b>	2 (24h)	18:00	6:55	12:00	12:00	101
<b>7</b>	4 (48h)	6:45	17:45	12:30	12:30	47
<b>8</b>	4 (48h)	6:50	18:00	5:00	5:00	48
<b>9</b>	4 (48h)	18:30	7:00	12:00	14:00	50
<b>10</b>	4 (48h)	18:15	6:30	8:00	8:00	43
<b>11</b>	4 (48h)	6:15	17:30	6:00	8:00	44
<b>12</b>	4 (48h)	13:00	5:30	10:30	10:00	60
<b>13</b>	4 (48h)	6:15	18:15	3:00	3:00	68
<b>14</b>	4 (48h)	18:00	6:45	15:00	15:00	78

#### 4.3.2.2. Tanques

Para la monitorización de tanques, se recogieron muestras de leche correspondientes a los tanques procedentes de las 14 granjas seleccionadas para el estudio. Las muestras fueron recogidas de cada tanque durante la fase de equilibrio térmico (ET) de manera aséptica, utilizando pinzas desinfectadas con alcohol para sumergir en los tanques los botes estériles y recoger las muestras de leche. Los botes con la muestra fueron conservados en condiciones de refrigeración a 4° C hasta su análisis en el laboratorio. Se tomaron muestras de 40 mL de cada tanque, habiendo mezclado previamente la leche para su correcta homogeneización (Real Decreto 1728/2007).

#### 4.3.2.3. Fases posteriores a las granjas

Para monitorizar los recuentos microbiológicos en etapas posteriores al

ordeño, se analizaron muestras de leche correspondientes a la fase de transporte, es decir, muestras procedentes de las cisternas de 28 camiones, que hacían la recogida en granjas con (i) 2 ordeños por recogida (recogida 24h) y (ii) 4 ordeños por recogida (recogida 48h) y la fase de la industria, esto es, muestras procedentes de 6 silos de recepción de cisternas, con el muestreo esquematizado en la Figura 14.

**Figura 14.** Esquema de las fases de la cadena de producción de leche y número de ordeños



#### 4.3.3. Animales

Los animales pertenecientes a las granjas evaluadas fueron vacas frisonas de alta producción (40 litros diarios de media). En la fase de granja, cada explotación ha contado con una media de 97 vacas en lactación, que en el momento del estudio cumplían los requisitos sanitarios establecidos por la normativa europea (Reglamento (CE) 853/2004) que, en el caso de gérmenes a 30° C, su número debe ser  $\leq 100.000$  UFC/mL (media geométrica móvil observada durante un periodo de dos meses, con un mínimo de dos muestras al mes).

#### 4.3.4. Equipos

Para estimar la eficiencia de los tanques se registraron las fluctuaciones de temperatura de la leche en los mismos y se analizó el tiempo experimentado por cada fluctuación de temperatura o estabilidad térmica previa a cada fase del proceso de refrigeración, mediante la colocación de un sensor (DataLogger Testo 175-T3) con una sonda sumergida en el tanque.

El inicio del registro comenzó con el primer ordeño y finalizó con la recogida de leche por parte del camión cisterna. Se registró la temperatura cada 5 minutos a lo largo de una semana.

El registro de las fluctuaciones de temperatura a lo largo del ciclo completo de dos ordeños de un día equivale a la recogida 24h y cuatro ordeños equivale a la recogida 48h. La monitorización permitió distinguir las siguientes fases:

(i) la fase 1, referente al inicio de ordeño (O): 1O, 2O, 3O y 4O, representando 1O y 2O el primer y segundo ordeño correspondientes a un solo día en ganaderos con recogida 24h y al primer y segundo ordeño del primer día de ordeño en ganaderos con recogida 48h y 3O y 4O, representando el tercer y cuarto ordeño correspondientes al segundo día en ganaderos con recogida 48h;

(ii) la fase 2, referente al descenso de temperatura (DT): 1DT, 2DT, 3DT y 4DT, la cual se corresponde con el periodo en que comienza a reducirse la temperatura tras cada uno de los ordeños;

(iii) la fase 3 de estabilidad térmica (ET): 1ET, 2ET, 3ET y 4ET, que se refiere a las distintas etapas de temperatura constante correspondiente al periodo desde que deja de disminuir la temperatura hasta el siguiente ordeño o recogida por parte del camión.

Para calcular el tiempo de duración de las rampas de temperatura, cada periodo de tiempo registrado por la sonda se dividió por el número de vacas (n) de cada granja, de manera que los tiempos ofrecidos en los resultados se expresan en minutos y segundos de cada periodo por vaca.

Con respecto al estudio comparativo de recuentos por cada fase, se utilizaron los equipos BactoScan™ FC+ (Foss, Dinamarca) y el crioscopio Advanced Instruments 4250 (Norwood, USA).

#### **4.3.5. Análisis microbiológico y del punto crioscópico**

El análisis microbiológico tuvo como objetivo analizar los recuentos de aerobios mesófilos totales (MAB) y psicrotrofos (PSI) tras el primer ordeño (1O) y tras el último ordeño (2O (en recogida 24h) o 4O (en recogida 48h)), para comparar posibles diferencias debidas a las fluctuaciones de temperatura y tiempo. Cada muestra de leche fue sometida a citometría de flujo para recuento de MAB utilizando BactoScan™ FC+ (Foss, Dinamarca). Las muestras se analizaron por duplicado con objeto de contemplar la variabilidad existente en los recuentos microbianos. A cada muestra de 40 mL se adicionó 133 µL de azidiol (sodium azide/cloranfenicol) según el protocolo establecido por Barcina y cols. (1987). Los resultados expresados en impulsos de Bactoscan/mL fueron transformados en UFC/mL, según la siguiente ecuación:

$$y = 0,884 x + 0,243$$

siendo  $y = \log \text{UFC/mL}$  y  $x = \log \text{impulsos Bactoscan/mL}$ , considerando un límite de detección de 10.000 UFC/mL (Real Decreto 1600/2011).

El recuento de psicrotrofos (UFC/mL) se realizó mediante siembra en placa con PCA, siguiendo el método de siembra en superficie (APHA, 1992) e incubándose las muestras a 7° C.

La determinación del punto crioscópico se encuentra definido en la Decisión de la Comisión, de 14 de febrero de 1991, por la que se adoptan determinados métodos de análisis y de prueba de la leche cruda y de la leche tratada térmicamente. Dicho método se llevó a cabo mediante un crioscopio Advanced Instruments 4250 (Norwood, USA). consistente en un baño de refrigeración controlado mediante un termostato, con una sonda de termistor, que se trata de un termómetro de resistencia de semiconductores. Además, el crioscopio cuenta con un circuito asociado al baño y la sonda, un galvanómetro para realizar la lectura, un agitador de la muestra, y un dispositivo para iniciar la congelación y tubos de muestras. Para su análisis se tomaron muestras por duplicado con un volumen de 0,1 mL.

#### **4.3.6. Análisis de datos**

Los recuentos obtenidos en las fases citadas anteriormente fueron tabuladas en MS Excel (Microsoft, Redmond) y combinadas con los datos de tiempo-temperatura del registrador de temperatura utilizado. Además, se realizó una prueba t-Student de comparación de medias para evaluar diferencias significativas entre las variables estudiadas ( $p < 0.05$ ).

## 4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.4.1. Monitorización de la eficiencia de los tanques

La duración del tiempo de ordeño es variable en función del número de vacas. En el caso del presente estudio el número de vacas de las ganaderías con cuatro ordeños (48h) era notablemente inferior con una media de 54 animales respecto a las ganaderías con recogida 24h con 153 vacas de media, por lo que la duración del tercer y cuarto ordeño (3O y 4O) fue significativamente menor. La media de tiempo de ordeño por vaca fue de 1 minuto y 3 segundos.

En el presente estudio se observó que el tiempo necesario para alcanzar la temperatura de ET por cada ordeño fue disminuyendo con cada ordeño, así mientras que para refrigerar la leche de 1O deben pasar 2 horas 59 minutos, este tiempo se redujo en un 33% tras el 2O, un 72% tras el 3O y un 80% en el 4O (Tabla 17).

**Tabla 17.** Tiempos de duración medios (P) y temperaturas medias (T) alcanzadas en cada periodo identificado por fluctuación de temperatura

Fase	P medio (horas)	Tª media (° C)	Tª max (° C)	Tª min (° C)
1O	2:50:00	16,5	25,2	7,0
1DT	2:59:00	13,6	25,5	4,6
1ET	7:22:00	3,7	4,0	3,7
2O	2:50:00	5,3	5,7	4,0
2DT	1:59:00	5,2	5,6	4,5
2ET	6:01:00	3,9	3,9	3,7

<b>3O</b>	0:50:00	6,7	9	4,3
<b>3DT</b>	0:50:00	6,9	9,2	4,6
<b>3ET</b>	10:35:00	4,7	4,9	4,4
<b>4O</b>	1:00:00	6,5	8,2	4,7
<b>4DT</b>	0:35:00	6,4	8,2	4,6
<b>4ET</b>	1:40:00	4,8	5	4,5

P medio: duración media de cada fase

T<sup>a</sup> media: temperatura media a la que la leche se encuentra en cada fase

T<sup>a</sup> max: temperatura máxima que alcanza la leche en cada fase

T<sup>a</sup> min: temperatura mínima que alcanza la leche en cada fase

Por otro lado, en la Tabla 17 también se aprecia un incremento de temperatura tras el 3O y 4O que deben ser destacados ya que son los ordeños que se producen en la recogida 48h y no en la 24h. Estos incrementos, podrían ser un punto crítico a tener en cuenta por la relación conferida por distintos estudios y a la luz de la Tesis Doctoral, de la temperatura de almacenamiento con la proliferación microbiana, viéndose ésta favorecida por sus fluctuaciones.

Se obtuvieron los recuentos de microorganismos de cada una de las ganaderías participantes en el estudio a lo largo de los distintos días de ordeño, tal y como se muestra en la Tabla 18.

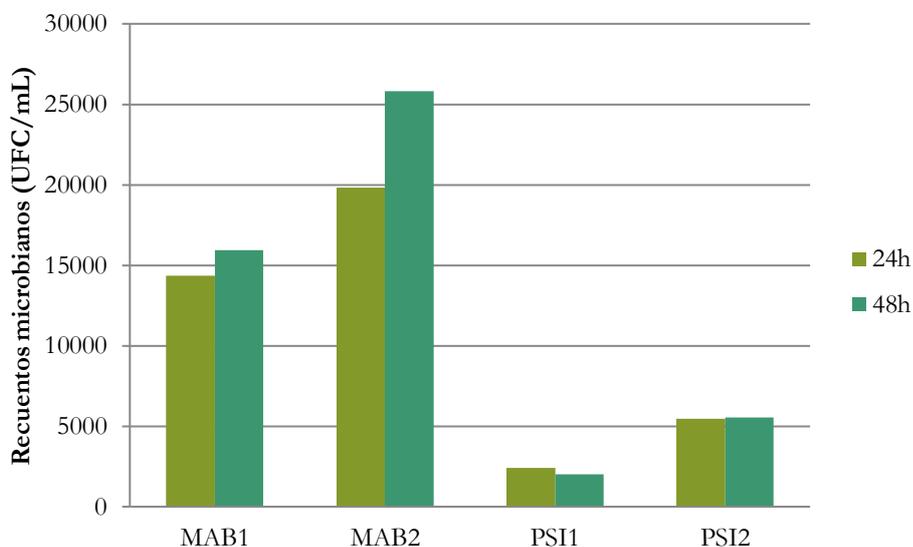
**Tabla 18.** Recuentos de microorganismos (UFC/mL) de cada ganadería tras primer ordeño (MAB1 y PSI1) y último ordeño (MAB2 y PSI2)

<b>Nº Granjas</b>	<b>Nº de ordeños</b>	<b>Nº vacas</b>	<b>MAB1</b>	<b>MAB2</b>	<b>PSI1</b>	<b>PSI2</b>
1	2 (24h)	171	≤10.000	16.000	≤100	9.350
2	2 (24h)	145	≤10.000	≤10.000	≤100	≤100
3	2 (24h)	204	13.500	14.000	2.400	5.750
4	2 (24h)	167	12.000	23.000	4.700	5.950
5	2 (24h)	134	30.658	33.587	4.778	10.500
6	2 (24h)	101	≤10.000	22.250	≤100	1.075
7	4 (48h)	47	14.000	15.250	575	1.550
8	4 (48h)	48	11.500	33.497	4.300	8.950
9	4 (48h)	50	26.732	33.196	5.158	7.293
10	4 (48h)	43	≤10.000	≤10.000	≤100	≤100
11	4 (48h)	44	≤10.000	11.000	≤100	8.400
12	4 (48h)	60	≤10.000	20.000	3.000	4.000
13	4 (48h)	68	35.304	53.462	2.800	13.000
14	4 (48h)	78	≤10.000	30.000	≤100	900

MAB1: recuentos de bacterias aerobias mesófilas en leche analizada tras el primer ordeño  
 MAB2: recuentos de bacterias aerobias mesófilas en leche analizada tras el último ordeño  
 PSI1: recuentos de microorganismos psicrotrofos en leche tras el primer ordeño  
 PSI2: recuentos de microorganismos psicrotrofos en leche tras el último ordeño  
 24h: recogida diaria  
 48h: recogida cada 48 horas

Se encontraron recuentos de MAB en el último ordeño por encima de 30.000 UFC/mL, en cinco de las catorce ganaderías analizadas (35%) (ganaderías 5, 8, 9, 13 y 14), de las cuales dos de ellas, presentaron también recuentos superiores a dicho valor en el primer ordeño (ganaderías 5 y 13). De las cinco ganaderías con estos recuentos, cuatro ganaderías realizaban cuatro ordeños (48h) (ganaderías 8, 9, 13 y 14) y una con dos ordeños (24h) (ganadería 5), tal y como se muestra en la Figura 15.

**Figura 15.** Representación gráfica de la comparación de recuentos medios de MAB y PSI de primer ordeño (MAB1 y PSI1) y último ordeño (MAB2 y PSI2) en ganaderías con dos ordeños (24h) y ganaderías con cuatro ordeños (48h)



MAB1: recuentos de bacterias aerobias mesófilas en leche analizada tras el primer ordeño  
 MAB2: recuentos de bacterias aerobias mesófilas en leche analizada tras el último ordeño  
 PSI1: recuentos de microorganismos psicrotrofos en leche tras el primer ordeño  
 PSI2: recuentos de microorganismos psicrotrofos en leche tras el último ordeño  
 24h: recogida 24h  
 48h: recogida 48h

Al comparar los recuentos del primer y último ordeño, se observó un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de los niveles de MAB del 27% en ganaderías

con recogida 24h y del 38% en ganaderos con recogida 48h, (5.447 y 9.859 UFC/mL respectivamente). Entre recogidas también se aprecia un incremento de los recuentos de MAB del 18% en la recogida 48h, mientras que para PSI no se encuentran diferencias superiores al 1%. Las temperaturas medias registradas en las fases de ET de los distintos ordeños fueron superiores a 4° C, valor a partir del cual O'Connell y cols. (2016) señalaron que la proliferación microbiana puede verse favorecida. De dicho estudio se puede extraer además que la eficiencia de refrigeración de los tanques tiene una gran influencia en los recuentos microbiológicos, especialmente al garantizar que la leche alcanza la temperatura de refrigeración deseable y se mantiene inalterable a los efectos de proliferación microbiana.

No se detectaron diferencias reseñables entre los recuentos de PSI ( $p > 0.05$ ) de los primeros ni de los últimos ordeños entre cada tipo de recogida. Aunque no existen estudios similares que puedan explicar este hallazgo, una posible teoría para explicar este resultado podría ser que debido a la proliferación de MAB, en los periodos de mayor temperatura, estos compiten con PSI. Este hecho implicaría que PSI no encontraría las condiciones óptimas para su proliferación y su multiplicación y, por tanto, no se verían favorecidas por las condiciones ofrecidas por la recogida 48h frente a la recogida 24h. Al comparar los recuentos de PSI de los primeros y últimos ordeños, éstos se incrementaron un 46% tanto en ganaderías de 2 ordeños (24h) como de 4 ordeños (48h). Estos resultados contrastan con otros estudios, donde se afirma que tiempos prolongados de almacenamiento a temperaturas de refrigeración conllevan a variaciones en las proporciones de las distintas especies de microorganismos presentes en la leche, en la que predominarían especies de microorganismos psicrotrofos (normalmente GRAM -) sobre las restantes especies (GRAM +) con mayores requerimientos nutricionales (Tatini y cols., 1991). A pesar de todo, se pone de manifiesto que existe un aumento de la concentración microbiana tras el último ordeño, siendo superiores para MAB en el caso de ganaderías con cuatro ordeños, lo que coincide con otros estudios previos (De Oliveira y cols., 2015; Novoa y Restrepo, 2007; Perko, 2011). Por otro lado, también existen trabajos que no encontraron diferencias en las etapas de refrigeración entre las distintas granjas analizadas cuando la temperatura de refrigeración se mantuvo

entre 2,8 y 3,1° C en el primer ordeño y entre 8,5 y 9° C en el segundo ordeño (Elmoslemany y cols., 2009). Este hallazgo sugeriría que la temperatura de refrigeración de la leche desde el inicio es un punto clave para mantener bajo control la proliferación microbiana.

En cualquier caso, la importancia de una revisión periódica y mantenimiento de los equipos de refrigeración radica en que su eficiencia puede verse alterada suponiendo un coste añadido debido a incrementos en los tiempos de refrigeración y, por tanto, a la energía consumida. Por otro lado, cambios como la temperatura ambiental o el incremento de animales ordeñados son factores a tener en cuenta para prever futuras inversiones como placas de refrigeración en periodos más cálidos o equipos más potentes para un mayor número de vacas. Además, es preciso que los productores presten una mayor atención a dichas temperaturas, con el objetivo de cumplir las temperaturas establecidas para la recogida 48h (6° C) y 24h (8° C).

#### 4.4.2. Monitorización de los recuentos microbiológicos en la recogida 24h y 48h y evaluación de la calidad microbiológica en cada fase

Al comparar los resultados de los recuentos de MAB en cada fase estudiada, se detectaron incrementos tanto mayores cuanto más cercana se encontraba la fase a la industria, tal y como se expresa en la Tabla 19.

**Tabla 19.** Comparativa de los recuentos de bacterias totales (MAB) obtenidos para recogida cada 48 horas (48 h) y recogida cada 24 horas (24 h) en la fase de cisternas y silos (UFC/mL)

Fase	Recuentos MAB 24h (UFC/mL)	Recuentos MAB 48h (UFC/mL)	Incremento de recuentos para MAB 24h (UFC/mL)	Porcentaje incremento recuentos MAB 24h (%)	Incremento de recuentos MAB 48h (UFC/mL)	Porcentaje incremento recuentos MAB 48h (%)
Tanques	14.800	23.900	-	-	-	-
Cisternas	37.000	48.100	22.200	60 %	24.200	50%

Silos	107.000	156.000	70.200	65 %	108.400	69%
-------	---------	---------	--------	------	---------	-----

MAB 24h: recuentos de bacterias aerobias mesófilas en leche analizada en recogida diaria

MAB 48h: recuentos de bacterias aerobias mesófilas en leche analizada en recogida cada 48h

Los recuentos de MAB experimentaron un incremento durante la fase de granjas (tanque) a transporte (cisternas) del 60% y del 50% para recogida 24h y 48h respectivamente y un incremento durante la fase de transporte (cisternas) a industria (silos) del 65 % en la recogida 24h y ligeramente mayor en la recogida 48h con un 69 %. Sin embargo, comparativamente, los recuentos de la recogida 24h fueron significativamente menores en todas las fases (tanques, cisternas y silos), tal y como se muestra en la Tabla 20. Estos resultados ponen de relieve la importancia del control en granja, y el impacto de los niveles alcanzados en esta etapa sobre las siguientes operaciones en la cadena de producción de la leche.

**Tabla 20.** Reducción de los recuentos de bacterias totales (MAB) obtenidos en cada tipo de recogida (48h y 24h) para cisternas y silos, expresando en porcentaje (%)

<b>Etapa</b>	<b>Recuentos medios de MAB 24h (UFC/mL)</b>	<b>Recuentos medios de MAB 48h (UFC/ml)</b>	<b>Diferencia recuentos MAB 24h y 48h</b>	<b>Porcentaje diferencia MAB 24h y 48h</b>
Tanques	14.800	23.900	9.100	38%
Cisternas	37.000	48.100	11.100	23 %
Silos	107.000	156.000	49.000	31 %

MAB 24h: recuentos de bacterias aerobias mesófilas en leche analizada en recogida 24h

MAB 48h: recuentos de bacterias aerobias mesófilas en leche analizada en recogida 48h

Tal y como se expone en la Tabla 20, durante la recogida 24h, los recuentos de MAB se vieron reducidos en un 38%, 23% y 31% respectivamente para cada fase (tanques, cisternas y silos) en comparación con la recogida 48h.

Otros estudios sobre los efectos en la calidad de leche durante su almacenamiento en el tanque mostraron recuentos promedio similares para MAB de 47.863 UFC/mL (Signorini y cols., 2008) y de 22.465 UFC/mL (Cempírková, 2002). En todos casos, los recuentos microbiológicos estuvieron dentro de los

niveles considerados higiénicos por distintas normativas como la comunitaria. Por su parte, el incremento de los recuentos microbianos asociados a las diferentes etapas fue descrito por otros autores (Hayes y Boor, 2001; López y Barriga, 2016), en los que se subraya la importancia de mejorar la higiene durante el ordeño, almacenamiento y refrigeración y reducir el tiempo hasta su transformación, para garantizar que los recuentos microbianos se vean minimizados.

Uno de los motivos del menor recuento microbiano experimentado en la recogida 24h, podría deberse a la reducción del número de ordeños, que decreció los niveles de contaminación iniciales de la leche de partida en la recogida por parte del camión cisterna. En otro estudio, la recogida 24h también se asoció a una mayor estabilización térmica de la leche, ya que el almacenamiento de la leche cruda durante un mayor periodo de tiempo se asoció a una redistribución de enzimas lipolíticas en la leche, acelerando la hidrólisis de las grasas y promoviendo fenómenos de oxidación (Callejo y Díaz-Barcos, 2008). Por otro lado, la mejora de la calidad microbiológica de la leche, asociada al tiempo de almacenamiento en los resultados expuestos, fue también descrita por otros autores, quienes ponen de manifiesto, además, las repercusiones de la misma, detectando una mayor degradación enzimática asociada a la recogida cada 48h (Capodifoglio y cols, 2016).

#### **4.4.3. Evaluación del punto crioscópico**

Debido a que la recogida 24 h fue una medida tomada tras haber demostrado la reducción de recuentos microbiológicos, se realizó un estudio comparativo de los puntos crioscópicos para cada fase (tanques, cisternas y silos), con el fin de evidenciar si la implantación de la medida podría conducir a un incremento del agua de lavado de los tanques en la leche.

Para evaluar su posible efecto, se analizaron las muestras de leche obtenidas en cada fase, obteniéndose medias de los valores del punto crioscópico (PC) correspondientes al periodo 1 (recogida 48h) y al periodo 2 (recogida 24h), tal y como se expone en la Tabla 21.

**Tabla 21.** Medias de punto crioscópico obtenido para las muestras recogidas cada 48 horas y cada 24 horas en cada etapa (cisternas y silos)

	<b>PC 48h</b>	<b>PC 24h</b>	<b>Reducción</b>
Tanques	-0,528	-0,530	No significativa
Cisternas	-0,529	-0,531	No significativa
Silos	-0,520	-0,523	No significativa

PC 24h: punto crioscópico para la leche recogida diariamente  
 PC 48h: punto crioscópico para la leche recogida cada 48 horas

A la vista de los resultados obtenidos, la medida de la recogida 24h no tuvo influencia significativa en el punto crioscópico de las muestras analizadas por lo que, a pesar de que inicialmente se preveía que el incremento de la frecuencia de recogida podría hipotéticamente tener un efecto en el punto crioscópico de la leche al tener más posibilidades de que las muestras de leche analizadas presentaran ciertas cantidades de agua, la medida no tiene un efecto negativo en dicha medida. Aunque no se han encontrado estudios similares que comparen el punto crioscópico de la leche recogida 24h con la recogida 48h, otros estudios establecen los factores que repercuten en la variación de dicho parámetro como el momento de ordeño, la raza, la etapa productiva o la alimentación (Henningson, 1966; Shipe y cols., 1953).

## 4.5. CONCLUSIÓN

En vista de los resultados sobre el estudio comparativo de la recogida 24h y recogida 48h, se debe concluir que el tiempo de almacenamiento influye en la proliferación de los microorganismos aerobios mesófilos, con mayores recuentos en la recogida 48h, pero no sobre los microorganismos psicrotrofos que tuvieron niveles similares para ambos tipos de recogida. Por otro lado, se demostró que la frecuencia de recogida no tuvo influencia negativa sobre el punto crioscópico de la leche.

Estos resultados confirman por tanto, la importancia del control de la cadena de frío como parte de las prácticas correctas de higiene que deben llevarse a cabo en las explotaciones. El estudio de eficiencia de los tanques ofrece una propuesta que permite clasificar los tiempos de refrigeración para comparar entre equipos de refrigeración de leche de distintas ganaderías o comparar la eficiencia de distintos tanques en la misma explotación. Dicha propuesta podría ser efectuada no sólo por ganaderos o técnicos de las explotaciones, sino también por los responsables de calidad de toda la cadena de producción de leche, para llevar a cabo sus respectivos controles de proveedores. Permite prever incrementos de recuentos y tomar medidas y decisiones, exigir controles periódicos de los equipos de refrigeración de los tanques, ajustar medidas de tratamiento de temperatura en función de la época del año, proponer mejoras de equipos en base a la monitorización periódica o garantizar una calidad del producto basada en el control de la cadena de frío.

Por último, gracias a los resultados obtenidos de este estudio, al implantarse la medida de recogida diaria en las ganaderías proveedoras de leche de esta industria láctea, se modificó el etiquetado del brick para informar al consumidor de la frescura de la leche bajo el texto “*recogida cada día*”.



# CAPÍTULO 5

---

## Evaluation of the influence of frequency of milk collection and milking dayshift on the microbiological quality of raw milk

Este trabajo fue publicado como artículo científico en la revista **Journal of Food Quality** **Volume 2018, Article ID 1306107**, con los siguientes autores: Lucía Reguillo, Manuela Hernández, Elisabeth Barrientos, Fernando Perez-Rodriguez y Antonio Valero.

Parte de su contenido ha sido también presentado como póster en el **International Conference of Predictive Modelling in Food**, en 2017, titulado **Statistical analysis of different factors related with the microbiological quality of raw milk**, con los siguientes autores: Lucía Reguillo, Manuela Hernández, Elisabeth Barrientos, Fernando Pérez-Rodríguez y Antonio Valero.



# **CAPÍTULO 5. EVALUATION OF THE INFLUENCE OF FREQUENCY OF MILK COLLECTION AND MILKING DAYSHIFT ON THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF RAW MILK**

## **5.1. ABSTRACT**

The aim of this study was to analyze the influence of milk collection frequency (24h versus 48h) and milking dayshift (morning and evening) on total mesophilic aerobic bacteria (MAB) and psychrotrophic bacteria (PSY) counts in raw milk samples. MAB counts were determined by flow cytometry (BactoScan) and PSY counts by the plate counting agar method. An univariate statistical analysis was performed to find out significant differences among the studied factors. Results obtained showed that collecting milk every 24h was effective in reducing MAB and PSY counts by 32 and 18 %, respectively, compared to 48h milk collection. This positive impact allowed reducing up to 4° C the temperature of the heat treatment in the dairy industry, thus involving energy savings of 22 %. Milking during the mornings showed a significant reduction of MAB counts in comparison to milking performed during the evenings ( $P < 0.05$ ). These results are highly useful for the improvement of milk quality through the optimization of collection and milking systems set at primary production.

## **5.2. INTRODUCTION**

The widespread use of refrigerating raw milk from milking on the farm to its delivery to dairy industries mitigates the risk of product deterioration associated with the growth of thermophilic and mesophilic microorganisms and proliferation of pathogenic microorganisms (Samardžija y cols., 2012). Raw milk contains saprophytic bacteria with glycolytic, proteolytic, and lipolytic activities. Their presence and multiplication can be conditioned by storing raw milk below 7° C,

favoring the selection of psychrotrophic species such as *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Lactobacillus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus* and species of *Enterobacteriaceae* family. Thermophilic and mesophilic microorganisms may be ubiquitous in nature and can be found on operators' hands or in udders, milking parlours, milk containers, and so on (Samardžija y cols., 2012).

*Pseudomonas* spp., *E. coli*, heat-resistant streptococci, and *Bacillus* spores have been isolated from biofilms that might form in milking equipment (Ozer B. y Akdemir-Evrendilek, 2014). Cleaning and disinfecting milking equipment, proper preparation of udders, and correct hygienic practices are essential to reduce bacterial counts (Signorini y cols., 2008). Although there is no scientific evidence confirming that milking dayshift influences microorganism counts, factors related to the stage of lactation, diet composition, and energy status have been described to favor lipolysis due to their influence on milk lipases (Toušová y cols., 2013).

One of the routine analyses of dairy industries to check the hygienic-sanitary quality of milk is monitoring the total bacterial counts at 30° C. The current EU regulation requires MAB counts to be below 100,000 CFU/mL (Regulation EC 853/2004), while EU standards by food business operators normally set a more stringent limit for the production of high-quality milk (30,000 CFU/mL) (Samardžija y cols., 2012). In terms of psychrotrophic bacteria (PSI) counts, different limits associated with high-quality milk have already been established in EU standards such as 5,000 CFU/mL (Samardžija y cols., 2012). This is because psychrotrophic bacteria are currently considered as an additional quality indicator, and in countries like the Czech Republic, a limit of 50,000 CFU/mL has already been established (Cempírková, 2002). Enzymatic degradation produced by this microbial group can contribute to casein and lipid degradation, causing product spoilage (Baur y cols., 2015) (Novoa y Restrepo, 2007). In this line, some studies have used PSI counts to predict milk stability after heat treatment and packaging (Novoa y Restrepo, 2007). Moreover, since PSI counts are also indicators of poor hygienic conditions (Samardžija y cols., 2012) (Signorini y cols., 2008), it would be worthy to further investigate the relationship between MAB and PSI counts in raw milk samples and how they can affect final milk quality.

Storing time and temperature of raw milk from collection until reception in dairy industries is definitely one of the key factors helping to preserve milk quality. Milk must be transported in conditions that guarantee the maintenance of the cold chain without exceeding 10° C. According to European legislation, milk must be cooled down to a maximum of 6° C in the industrial level unless it is treated immediately (Regulation EC N° 853/2004). Heat treatment of milk aims to extend the shelf-life, reducing the microbial load (Raikos, 2010).

UHT guarantees the safety and stability of milk for months, maintaining the organoleptic qualities of the milk unaltered (Regulation EC N° 853/2004). This treatment applies continuous heat at high temperature, not less than 135° C, for a short period of time (between 4 and 15 seconds). During the application of such treatment in the dairy industry, energy is expended as a result of the temperature and time applied. This expense can be quantified by measuring the tons of steam generated during treatment.

Reducing time elapsed from milking to the heat treatment of milk might minimize spoilage due to microbial growth and enzymatic activity. To this end, the frequency of milk collection by trucks on farms should be increased from collection for every 48 hours to daily collection. In Spain, dairy industries must ensure that milk is stored under isothermal conditions in both tanker trucks during transport and receiving silos in the industry, requiring temperatures in the tank at the farm level to be less than 8° C when milk collection is performed on a daily basis or below 6° C when milk collection is less frequently carried out (Spanish Royal Decree 1600/2011).

This study was aimed at examining the influence of milking dayshift and the time elapsed between milking and its delivery to the industry (frequency of milk collection) on the MAB and PSI counts analyzed in raw milk. Besides, the impact of daily collection on energy expenditure in the industry was quantified.

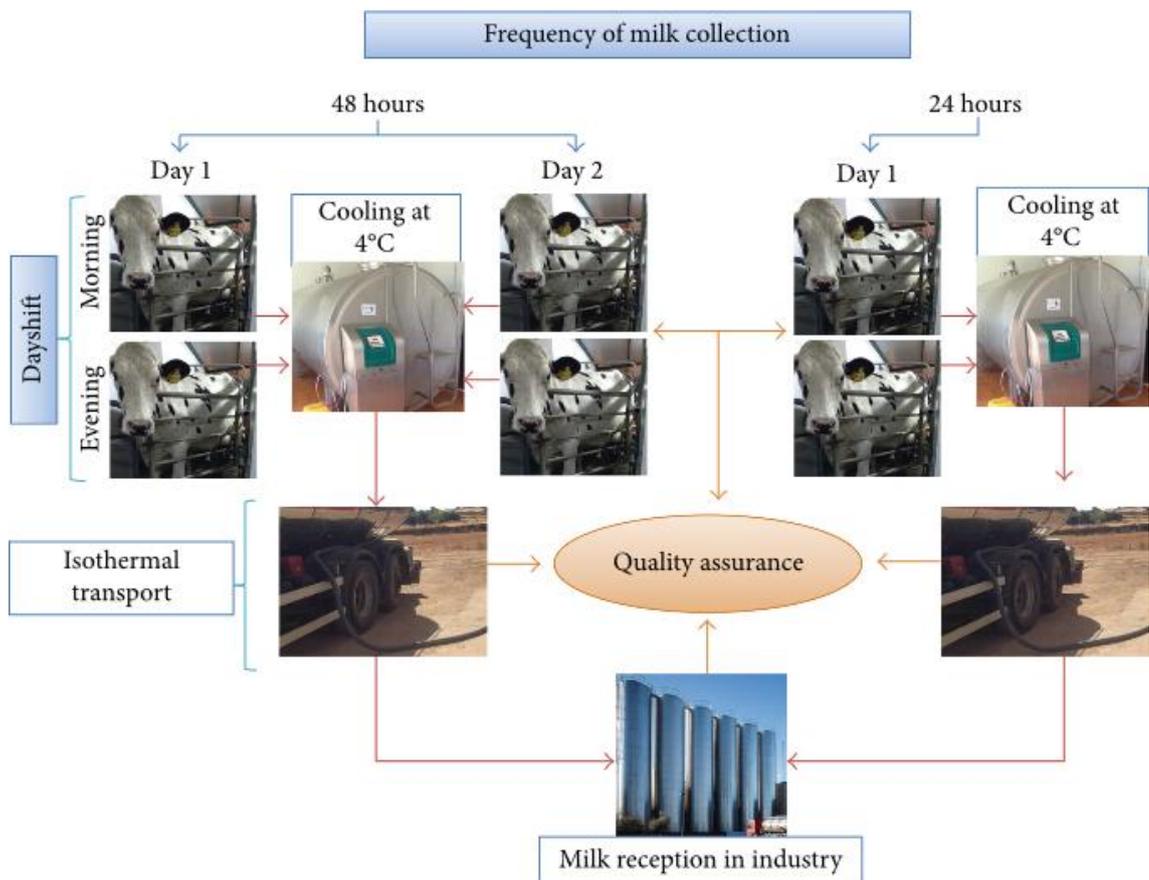
## **5.3. MATERIALS AND METHODS**

### **5.3.1. Sampling**

A total of 778 milk samples taken from 29 tankers from 232 suppliers were analyzed. Of these 778 samples, 391 corresponded to milk collected after 48 hours during February 2016 and 387 to milk collected daily (24 h) during March 2016. Milk was collected from the cattle farms by tankers. Hoses connected to the tanks poured the refrigerated milk into different compartments. The milk stored within the tank trucks was kept at isothermal conditions.

The tank trucks collected milk from different livestock farms and then made final delivery to the industry where analyses were carried out prior to milk unloading in silos (Figure 16).

**Figure 16:** Steps in the milk primary production chain from the farm to the dairy industry considering two frequencies of milk collection at the farm (i.e., 24 and 48 h)



Elaboración propia

Farms, in this study, were located in the northern Andalusia region (Spain) within a radius of less than 80 kilometres from dairy industry facilities. The livestock corresponded to high-yield Friesian cows (35 liters of milk per day). The farms participating in the study followed the production guidelines set out in the Cow Raw Milk Production Manual of the Ministry of Agriculture and Fisheries, Food and Environment. The milk was produced by animals that complied with the health requirements established by European legislation (Regulation EC N° 853/2004), which requires levels of  $\leq 100,000$  CFU/mL for bacterial counts at 30° C (moving the geometric mean observed over a period of two months, with a minimum of two samples per month).

Milk samples were collected when the tanks were delivered to the industry by each tank truck under aseptic conditions using alcohol-disinfected tongs to hold sterile containers, which were subsequently capped, identified, and stored at 4° C until their analysis in the laboratory. For sample collection, two 40 mL samples were taken from each tank at the time of delivery to the industry; the milk was previously mixed to ensure its correct homogenization (Spanish Royal Decree 1728/2007).

### **5.3.2. Studied factors associated with milk collection**

The first factor studied was milking dayshift, which corresponded to two different periods: mornings or dayshift 1 (6:00–9:00 h) and evenings or dayshift 2 (17:00–20:00 h). From three to four hours after each milking, milk was collected and transported under conditions described in Section 2.1.

The second factor analyzed was the frequency of milk collection, which corresponded to two periods: (i) daily collection (24 h) during March 2016 and (ii) daily collection for every 48 h during February 2016 in the livestock farms.

### **5.3.3. Microbiological analyses**

MAB were determined in the laboratory using BactoScan™ FC+ (Foss, Denmark). To stabilize milk samples microbiologically, a volume of 133 µl azidiol (sodium azide/chloramphenicol) was added to each 40 mL sample [9]. The results expressed in pulses of BactoScan/mL were transformed into CFU/mL, according to the following equation:

$$y = 0.884x + 0.243$$

where  $y = \log \text{CFU/mL}$  and  $x = \log \text{BactoScan/mL pulses}$ , considering a detection limit of 10,000 CFU/mL (Spanish Royal Decree 1600/2011).

For the determination of PSI counts, tenfold dilutions from the milk samples were performed and 0.1 mL was plated onto plate count agar (Oxoid, Spain) using the International Dairy Federation procedure (1985). The control and inoculated plates were left to air-dry at room temperature before being incubated at 7° C for 10 days. PSI counts were expressed in CFU/mL, while the limit of quantification was 100 CFU/mL.

Raw milk samples at both dayshifts and for both types of collection were analyzed in duplicate in order to capture the variability in microbial counts.

#### **5.3.4. Assessing energy consumption in heat treatment**

In those milk samples having reduced MAB and PSI counts, the heat treatment temperature could be lowered to 4° C, maintaining the same milk organoleptic quality. This temperature was selected within the typical working range allowed for UHT milk. The amount of steam generated in two 8-month periods (Tm) (April 2015–December 2015 and April 2016–December 2016) was compared to that of the typical heat treatment before April 2016 and treatment applied using a reduction of 4° C from this date onwards. To measure the steam generated during the heat treatment of milk, quantometers were placed in the Vortex-type thermizers (Emerson, USA). Quantometers were used with a built-in temperature probe capable of indicating steam temperature and quantifying supplied energy. The percentage of energy savings was calculated according to the steam saturation table obtained in accordance with the ISO 9001 standard,

using the enthalpy of steam as a reference value and the key performance index (KPI) relating milk production per month and the associated steam to energy cost.

### **5.3.5. Statistical analysis**

The data obtained from microbial counts were processed in MS Excel (Microsoft, Redmond, USA). The average, maximum, and minimum values of MAB and PSI results were calculated, in CFU/mL, for the milking dayshifts and frequencies of collection considered in this study.

Microbiological milk samples were also classified according to quality criteria applied by the dairy companies under study. For MAB count, the criteria consisted of  $\leq 50,000$  CFU/mL as a quality premium payment,  $> 50,000$  to  $< 100,000$  CFU/mL for minimum payment, and  $\geq 100,000$  CFU/mL for milk not suitable for processing at the industrial level in accordance with the requirements established in Regulation N° 853/2004. For PSI levels, milk samples were classified into two quality ranges, that is,  $\leq 10,000$  and  $> 10,000$  CFU/mL. These ranges are associated with the absence or presence of enzymatic alterations (e.g., lipolysis) in the finished product (Signorini y cols., 2008; Novoa y Restrepo, 2007).

For statistical analysis, SPSS version 15.0 (Chicago, Illinois, USA) was used. A variance homogeneity test (Levene statistic) was performed, as well as a series of parametric tests (ANOVA) and nonparametric tests (Kruskal–Wallis test) analyzing the dayshift and type of collection as independent variables and the microbial counts as dependent variables. Significant differences were considered with a confidence level of 95% ( $P < 0.05$ ).

## **5.4. RESULTS AND DISCUSSION**

### **5.4.1. Analysis of the effect of the milk collection frequency (24 and 48h) on microbial counts**

According to the results obtained, in the samples collected after 24 h ( $n = 387$ ), the count ranges were  $1.0 \times 10^4 - 1.8 \times 10^5$  and  $1.0 \times 10^2 - 7.3 \times 10^4$  CFU/mL for MAB and PSI, respectively. For the samples collected after 48 hours ( $n = 391$ ), values ranged in the intervals  $1.0 \times 10^4 - 9.9 \times 10^5$  CFU/mL and  $1 \times 10^2 - 2.7 \times 10^5$  CFU/mL for MAB and PSI, respectively.

The largest mean value was obtained for MAB in milk collected every 48 h, with a value of  $4.4 \times 10^4$  CFU/mL. This value was 10 times higher than that obtained for PSY at 24 and 48 h ( $4.4 \times 10^3$  and  $5.4 \times 10^3$  CFU/mL, resp.). The coefficient of variance denoted a high variation in counts, which was remarkably higher for two-day collection (Table 22).

**Table 22:** Mesophilic aerobic bacteria (MAB, CFU/mL) and psychrotrophic bacteria (PSI, CFU/mL) counts obtained according to the frequency of milk collection (24 and 48 h)

Microorganisms	Collection time (h)	Mean	Min.	Max.	Standard deviation	5th percentile	95th percentile	Coefficient of variation (5)
MAB	24	29,599	10,000	175,000	27,185	10,000	75,000	92
MAB	48	44,016	10,000	993,000	78,730	11,000	91,000	179
PSI	24	4,432	100	73,000	7,011	100	16,000	158
PSI	48	5,459	100	270,400	20,138	100	17,080	369

The results of the statistical analysis indicated that there was not variance homogeneity in the observed data ( $P < 0.05$ ). For this reason, a nonparametric Kruskal–Wallis test was applied to study the differences in microbial counts associated with the frequency of milk collection and milking dayshift. When examining the mean counts, milk collected every 48 h showed an increase in counts of 32% and 18% with respect to milk collected every 24 h for MAB and PSI, respectively.

The Kruskal–Wallis test revealed significant differences ( $P < 0.05$ ) in the MAB counts obtained for different milking dayshifts, while no significant differences were observed in PSI counts ( $P \geq 0.05$ ). The reduction observed for MAB counts could have been influenced by the shorter time from milk collection till reception in the industry, which led to lower microbial growth. Likewise, higher maximum population densities were reached when milk was collected every 48 h rather than daily milk collection. Other studies that investigated the effects of housing and milking technologies on the milk quality showed similar counts for PBC and MAB compared to the obtained count of 24h collection for the present study (Signorini y cols. 2008; Cempírková, 2002). The association between the elapsed time and the increase of microbial load has been previously described by other studies (Hayes y Boor, 2001; López y Barriga, 2016).

The ratio of MAB and PSI can be used to analyze the effectiveness of different measures applied for improving hygienic-sanitary conditions of raw milk and understanding the relationship between both groups of microorganisms. According to European standards for high-quality milk, counts shall not exceed 30,000 CFU/mL of MAB and 5,000 CFU/mL of PSI (ratio 6:1) because higher values and ratios are related to increases in the proportions of proteolytic and lipolytic phenomena (Cempírková, 2002). Mean counts observed for 24 hours of collection were very close to those in the EU standards of MAB and PSI (29,599 and 4,432 CFU/mL, respectively); however, the ratio of MAB:PSI for 48 h collection was approximately 8:1 (44,016:5,459 CFU/mL).

Another effect of daily milk collection (24 h) was the reduction in the number of milkings (4 and 2 milkings for 48 and 24 h, resp.). The frequency of milk collection influenced the temperature rise of the milk stored in the tank. For instance, when two milkings are carried out daily and milk is collected every two days (48 h), milk would be obtained from 4 milkings on two consecutive days, thus implying that the milk obtained from the first milking would increase by up to 3° C due to the addition of fresh milk (~38° C) (the second milking on day 1 and the first and second milkings on day 2). In contrast, if the milk is daily collected, the amount of milk coming from the first milking presents only one temperature rise. Then, milk is cooled until lower temperatures are reached (4° C). Although the effect of both frequencies of milk collection (24h and 48h) on changes in

chemical properties and sensory quality of milk has not yet been investigated, temperature rises during raw milk storage can lead to a redistribution of milk lipase enzymes by increasing their contact with fat, thus accelerating the hydrolysis of fat globules and the production of oxidation and browning phenomena (Callejo y Díaz-Barcos, 2008).

This is in line with other studies in which high levels of PSI in raw milk were associated with the presence of thermostable lipases and proteases, causing alterations in both fat and casein proteins after heat treatment (Barbano y cols., 2006). Although time and temperature are relevant factors involved in milk degradation, the proteolytic and lipolytic activity of PSI also depends on the hygienic practices and milking system employed (Capodifoglio y cols., 2016). The reduction in both MAB and PSI counts during daily collection could contribute to the fact that no incidences of proteolysis were recorded in the industry.

The improvement in the microbiological quality of milk associated with storage time has also been described by other authors who reported greater enzymatic degradation of milk (up to 7 %) in 48 h when compared with fresh samples (Capodifoglio y cols., 2016) and a correlation between milk samples with counts of more than 10,000 CFU/mL of PSY stored at 7° C with milk spoilage (Novoa y Restrepo, 2007). Although scientific literature indicates that time and initial contamination are determinants of PSI proliferation, the results of the statistical analysis described in this study did not show significant differences associated with the reduction of collection time (24h) in the decrease of PSI; hence, further research would be necessary to examine the role that certain livestock farms with high levels of PSI may have on milk quality stored for more than 48 hours.

#### **5.4.2. Analyses of the effect of milking dayshift on microbial milk counts**

The ranges of counts obtained for milking dayshift 1 (mornings) were  $1.0 \times 10^4 - 9.9 \times 10^5$  CFU/mL and  $1.0 \times 10^2 - 2.7 \times 10^5$  CFU/mL for MAB and PSI, respectively, while for milking dayshift 2 (evenings), microbial counts ranged

between  $1.0 \times 10^4 - 4.2 \times 10^5$  CFU/mL and  $1.0 \times 10^2 - 7.3 \times 10^4$  CFU/mL, respectively.

Both MAB and PSY counts were statistically lower for milking in the morning according to the Kruskal–Wallis statistical analysis ( $P < 0.05$ ).

By comparing the above shown results in Table 23 with the European standards for high-quality milk (ratio of MAB and PSI, 6:1), the mean ratio of morning and evening milking counts was slightly higher than that of the EU standards (7:1).

**Table 23:** Mesophilic aerobic bacteria (MAB, CFU/ml) and psychrotrophic bacteria (PSI, CFU/ml) counts obtained according to the milking dayshift (morning and evening)

Microorganisms	Milking dayshift	Mean	Min.	Max.	Standard deviation	5th percentile	95th percentile	Coefficient of variation (5)
MAB	Morning	36,928	10,000	993,000	59,361	10,000	86,000	161
MAB	Evening	38,369	10,000	420,000	60,593	12,000	87,000	158
PSI	Morning	4,970	100	270,400	15,097	100	16,100	304
PSI	Evening	5,230	100	73,000	15,452	100	16,550	295

The coefficient of variance informed a high variation in counts, which was again remarkably higher for PSI.

To the best of our knowledge, there is a lack of information in literature explaining these microbial differences in milk quality as a function of the milking dayshift. Nonetheless, chemical parameters of milk, especially lactose, ash, nonfat solids, and total solids, play an essential role as nutrients for bacteria (Quigley y cols., 2013). Cow physiology, diet composition, negative energy balance, or low concentrations of insulin can influence milk composition and therefore bacterial growth. Higher free fatty acid contents can result from spontaneous and induced lipolysis associated with evening milking (Toušová, 2013). Furthermore, biosanitary conditions in the livestock farms, good hygienic practices, and collection trucks and equipment and facilities management may also influence microbial counts in milk associated with milking dayshift (Murphy,

1997). Unlike agri-food industries, farms are not required to conduct an HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points), but they need to adhere to good manufacturing and hygienic practices. Moreover, in addition to the European “Hygiene Package” regulations, Spain published a Guide to Correct Practices for Dairy Cattle Breeding developed by the Interprofessional Dairy Organization (INLAC) in 2005, which outlines requirements and good practices grouped by areas within the first phase of milk production (MARM, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Guía para la Producción Responsable: Manual de Producción de Leche Cruda de Vaca, Spain).

#### 5.4.3. Classification of results according to quality ranges

The results for MAB and PSI counts classified by the quality ranges established as a function of 24 h and 48 h collection and milking dayshift are presented in Tables 24 and 25, respectively.

**Table 24:** Percentage of samples according to the quality standards of the industry and frequency of milk collection (24 and 48 h) for mesophilic aerobic bacteria (MAB) and psychrotrophic bacteria (PSI)

Microorganisms	Range (CFU/mL)	24h	48h
MAB	< 50,000	337 (87%)	294 (75%)
	≥ 50,000	50 (13%)	97 (25%)
PSI	< 10,000	340 (88%)	345 (89%)
	≥ 10,000	47 (12%)	46 (11%)

**Table 25:** Percentage of samples according to the quality standards of the industry and milking dayshift (morning and evening) for mesophilic aerobic bacteria (MAB) and psychrotrophic bacteria (PSI)

Microorganisms	Range (CFU/ML)	Morning	Evening
----------------	----------------	---------	---------

MAB	< 50,000	294 (83%)	333 (80%)
	≥ 50,000	61 (17%)	84 (20%)
PSI	< 10,000	302 (85%)	383 (92%)
	≥ 10,000	53 (15%)	34 (8%)

When the results were classified by range, samples with counts of MAB above 50,000 CFU/mL collected every 48 h were 12% higher than samples collected every 24 h (97 and 50, resp.) ( $P < 0.05$ ). Likewise, the number of samples collected every 24h with MAB counts below 50,000 CFU/mL was 12 % higher than that of samples collected every 48h (337 and 294, resp.). However, PSI counts did not present significant differences between the two types of milk collection.

The classification of the results according to quality ranges, as described in Introduction, showed that daily collection enabled the microbiological quality of the milk to be maintained within the CFU/mL levels suitable for the industry (<100,000 CFU/mL is the limit for milk collection and minimum payment). Note that minimum payment refers to the minimal microbial counts required for milk enabling the payment by the dairy industry.

Regarding milking dayshift (morning and evening), no significant differences were observed in MAB counts ( $P < 0.05$ ). In contrast, when milk was obtained in the evening, the number of samples presenting PSI counts above 10,000 CFU/mL decreased by 7% significantly ( $P < 0.05$ ). When ranges of CFU/mL of PSI were below 10,000, the evening milking showed also an increase of 7% of milk samples compared with morning milking (383 and 302, resp.).

These results were contrary to those derived from the statistical analysis of microbial counts, when ranges were not applied. The reasons for these discrepancies are associated with the system used to classify the results by quality ranges and will therefore depend on the PSI limit established, which, in this study, was set at 10,000 CFU/mL.

The average value obtained in the statistical analysis can be applied in a global analysis by dairy industries in order to evaluate the impact of different measures to reduce microbial counts.

#### 5.4.4. Energy saving in industry

As a consequence of the reduction of microbial counts in milk after daily collection, a decrease of 4° C could be applied in the heat treatment of milk at the industry maintaining organoleptic characteristics and food safety. A comparison of key performance index (KPI) and percentage savings per unit of energy per month for typical and modified heat treatments (reducing 4° C) is presented in Table 26. An average saving of 22 % (per unit of energy) was achieved associated with the modified heat treatment.

**Table 26:** Total energy savings expressed as key performance index (KPI) during 2015 (typical heat treatment) and 2016 (heat treatment reducing 4° C) and percentage savings per unit of energy

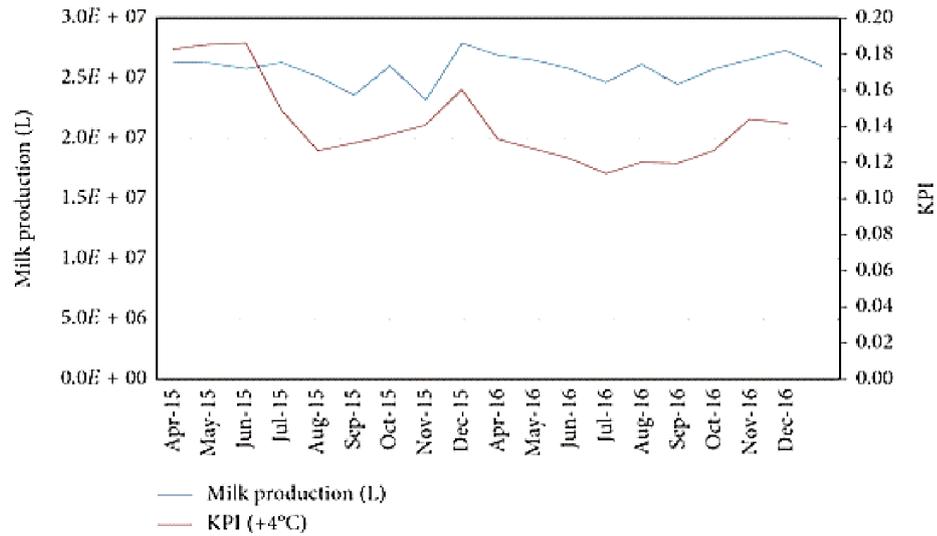
Month	KPI (Typical HT)	KPI (modified HT*)	Energy saving (%)	KPI saving (%)
April	0,18	0,13	35	38
May	0,19	0,13	44	46
June	0,19	0,12	52	52
July	0,15	0,11	39	30
August	0,13	0,12	1	5
September	0,13	0,12	5	9
October	0,14	0,13	8	7
November	0,14	0,14	15	2
December	0,16	0,14	16	13

\* HT: heat treatment

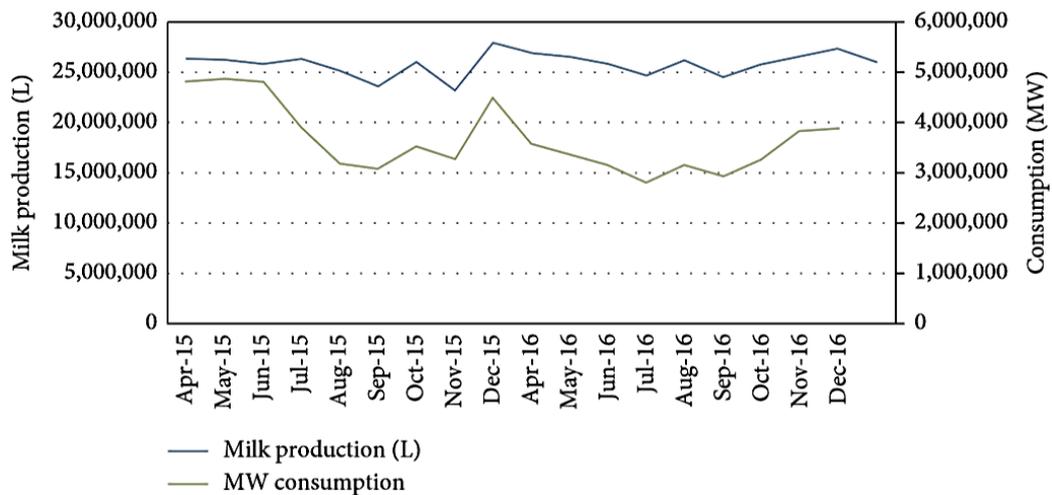
Over the analyzed period, it can be observed that the higher milk production occurred in December in both periods (the first one since April 2015 to December 2015 and the second one since April 2016 to December 2016). This fact implied a higher cost of production in order to treat the total milk produced (liters) compared with months with less production (September) (Figure 17). Another

important factor is the reduction of KPI associated with the summer months (July, August, and September), with an associated reduced megawatt consumption (MW) on Figure 18.

**Figure 17:** Graphical representation of milk production (liters) and the key performance index (KPI) during the 8-month study period, comparing 2015 (+4° C) and 2016 (-4° C)



**Figure 18:** Graphical representation of megawatt consumption (MW) during the 8-month study period, comparing 2015 (+4° C) and 2016 (-4° C)



The increase of heating temperature and/or time is associated with denaturation of  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin, which bind to the surface of

casein micelles. Heat treatment induces changes of the protein structure at the molecular level. The reduction of temperature and/or time of the treatment may be associated with beneficial compensation for the negative impact of heat treatment on the organoleptic properties of milk protein-based emulsions (Raikos, 2010).

These results suggest that the daily collection of milk not only reduced the MAB counts of milk but also allowed to reduce up to 4° C of the temperature of the heat treatment, ensuring the same final milk safety (checked by the quality control point of the industry at this stage) and energy cost-saving associated with the steam produced by the lower heat temperature applied.

## 5.6. CONCLUSIONS

Daily milk collection was an effective measure to improve the hygienic-sanitary quality of raw milk, significantly reducing MAB counts by 32 % in relation to 48h collection. This improvement in microbiological quality has allowed to adjust the temperature of the subsequent heat treatment in milk without compromising its hygiene and quality.

On the other hand, milking dayshift played an important role in maintaining the microbiological quality, with lower counts being recorded when milking was performed in the morning. Further research is needed to determine the main reasons of this difference. The use of quality ranges used in this study for MAB and PSI counts based on EU regulations and scientific references may help the dairy industries to classify and analyze different measures adopted to improve milk quality and safety.

Finally, this study showed a practical application of the implementation of daily milk collection in the energetic savings resulting from a milder heat treatment helping to better preserve the organoleptic quality and safety of milk. Reduction of temperature yielded at the same time a lower steam generation, thus being more respectful to the environment.





# CAPÍTULO 6

---

## Food quality management systems in the dairy industry: a case study on the application of predictive microbiology in the microbial quality of milk

Este trabajo forma parte de un libro titulado **Technological Approaches for Novel Applications in Dairy Processing** como capítulo, editado por Nurca Koca, publicado el 20 de junio de 2018. Sus autores han sido: Lucía Reguillo Granados, Fernando Pérez y Antonio Valero.

Parte de su contenido ha sido también presentado como póster en el **VII Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba**, en 2018, titulado **Exposure assessment model of *Pseudomonas fluorescens* in the raw milk production chain using MicroHibro software**, con los siguientes autores: Lucía Reguillo, Fernando Pérez-Rodríguez y Antonio Valero.



# **CAPÍTULO 6. FOOD QUALITY MANAGEMENT SYSTEMS IN THE DAIRY INDUSTRY: A CASE STUDY ON THE APPLICATION OF PREDICTIVE MICROBIOLOGY IN THE MICROBIAL QUALITY OF MILK**

## **6.1. ABSTRACT**

Agri-food industries must guarantee the safety of the produced foods through the application of the existing regulations, by correctly implementing quality control systems. In relation to the quality of drinking milk, it is extremely important to monitor the industrial treatments to which it is subjected to avoid the multiplication of spoilage and pathogenic microorganisms. Raw milk must undergo strict quality controls at the primary production level based on the knowledge of the main factors that influence their quality and microbiological safety, hygienic practices, health status of cows, frequency and moment of collection, storage temperature and time of transportation. To improve food safety and estimate food shelf life, predictive microbiology is a widely used tool for the estimation of microbial behaviour as a function of intrinsic and extrinsic by using mathematical models. Throughout this chapter, a description of the current food quality management systems (FQMS) carried out by dairy industries will be provided by reflecting the current challenges, the guidelines, and available tools. A case study based on the application of predictive microbiology considering the importance of controlling certain factors in the primary production dairy chain will be developed.

**Keywords:** quality management system, dairy industry, MicroHibro, HACCP, predictive microbiology

## 6.2. INTRODUCTION

Food industries are responsible of assuring the quality and food safety by means of the implementation of quality management systems (QMS). Industrial QMS allows to accomplish with the specifications between the food companies and customers, claiming the quality along the time (Khanson, 2011). The food production chain connects different actors and stages. In the case of dairy production, the chain includes some steps as milking, milk collection, milk reception, industrial treatment and dairy transformation, packaging, storage, distribution, and consumption (Khanson, 2011; Russel, 2000). Each stage should offer added value to the product with minimal cost (Marth y Steele, 2001) and apply the European Union legislation such as: Regulation (EC) N° 178/2002, laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety, Regulation (EC) N° 852/2004 on the hygiene of foodstuffs, Regulation (EC) N° 853/2004 laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs, and Regulation (EC) N° 854/2004 on the organization of official checks on products of animal origin intended for human consumption.

Milk is a nutritious food, which allows the growth of microorganisms. Its composition includes proteins, fats, carbohydrates, vitamins, minerals, and essential amino acids, which provide an adequate environment for the microorganisms' proliferation because of a neutral pH and a high-water activity on milk. Some microorganisms use these nutrients directly, and others unleash the metabolism of them. Their proliferation is determined by temperature, time, and nutrient availability (Marth y Steele, 2001; Quigley y cols., 2013). For this reason, good manufacturing and good hygiene practices (GMP and GHP) applied at all the stages of the chain must to be adopted.

QMSs are focused in the control of the main hazard sources that can occur in the food industry. The dairy chain implies several limitation and potential hazard that can reduce the quality and safety of milk. The intrinsic characteristic of milk, as an ideal environment for microorganisms (Quigley y cols., 2013), combined with its direct contact with equipment and facilities during the different

stages of milk production make the implementation of QMS in the dairy production chain a challenge (Signorini y cols., 2008). Two types of hazards have been considered the most relevant: chemical hazards are more associated to feed and farm and microbiological hazards more related with farm and dairy processing (Valeeva y cols., 2005). Application of validated predictive models is recognized as a valuable tool able to estimate behavior of potential microbiological hazards or spoilage microorganisms on raw milk during production chain. The obtained outcome can provide an estimation of the impact of relevant factors within the milk production chain and corrective measures to be applied.

### **6.3. QUALITY MANAGEMENT SYSTEM OF THE DAIRY PRODUCTION CHAIN**

#### **6.3.1. General consideration of the self-control and quality management system (QMSs)**

The self-control systems are based on the Hazard Analysis of Critical Control Point System (HACCP). This is a systematic procedure focused to identify microbiological, chemical, and physical hazards as early as food manufacturing and to eliminate these hazards by taking the suitable measures (Shah, 1994), (CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003. HACCP/General Principles of Food Hygiene). Correct practices and conditions described on the Codex Alimentarius and Regulation (EC) N° 853/2004 define prerequisites to be deemed before the development of HACCP.

The International Organization for Standardization (ISO) created the international standards which give specifications for products, services, and systems, to ensure quality, safety, and efficiency. They comprise standards for the development of a quality system of any type of organization and any part of the world. They were directed for the assurance of the process quality and the establishing of an international normative frame for the management and quality control (Russel, 2000; Barendsz, 1998). The requirements applied by the food

industry can be tougher than the compliance of legal rules. The ISO certification has become a very important strategy for the companies because it provides the confidence to customers and other stakeholders to control food safety hazards. In addition, international standards enhance transparency in the development of food quality and safety procedures, thus helping to improve and update food safety systems (ISO 22000:2005). The implementation of these standards is fixed with the ISO 9000:2000—Quality management systems—fundamentals and vocabulary, which takes part of others onto NMX ISO 9000:2000 with guidance, technical reports, and specifications (Russel, 2000; Barendsz, 1998).

### **6.3.2. QMS applied in farms and transport**

Although HACCP are systems implemented in the industries, the primary production has no duty of developing them. On this case guidance and advices for the correct management are followed in relation with animal health, food, traceability, hygiene, and cleaning (CAC/RCP 57-2004. Code of Hygienic Practice for Milk and Milk Products).

The milk collection by the trucks in farms must be done in hygienic conditions to prevent microbial contamination. For the correct handling of raw milk, the truck driver must be trained to use suitable clothes and to avoid the entrance to stables. Milk samples will be collected for quality control, verifying the temperature of storage (8° C for daily collection and 6° C for each 48h collection), and trucks must maintain the milk temperature on tanks below 10° C according to EC Regulation N° 853/2004.

Current transportation unit designing must have an efficient cleaning and drainage system to prevent corrosion and the transference of foreign substances to milk (CAC/RCP 47-2001 Code of Hygienic Practice for the Transport of Food in Bulk and SemiPacked Food). Complete cleaning and disinfection of truck are made after use and for 48h. Trucks must have available the Agreement on the International Carriage of Perishable Foodstuffs and on the Special Equipment to be Used for such Carriage (ATP), which is a treaty of United Nations laying down

rules about international transport of perishable food like milk between states members of the treaty (Agreement on the International Carriage of Perishable Foodstuffs and on the Special Equipment to be Used for Such Carriage).

Finally, the round-trip sheet of the truck must include information of the address industry, of the driver, of the suppliers of milk or farms, and of the date, hour, deposit, or liters collected.

### **6.3.3. QMS applied to the dairy industry**

There are seven principles on the development of the HACCP on a dairy industry (Peristeropoulou y cols., 2015). They are conducting a hazard analysis, identifying the critical points in the process, establishing critical limits, critical control point monitoring requirements, corrective actions verification, as well as record-keeping procedures and documentation of the system. The principles of HACCP are mainly oriented to achieve the following objectives—identifying, assessing, and controlling health hazards—to increase the level of product quality and safety and to low product liability risks and to enhance consumers' protection and confidence (Codex Alimentarius Commission; Lizcano y cols., 2009).

The process and product description lead to describe the different production stages, and it helps to detect and define the hazard and critical points in the industry. Onto the different stages of the dairy industry, there are some where milk is not heat-treated (so it is raw) and others where milk receives a heat treatment. Regarding raw milk, time and temperature conditions are some of the main factors affecting milk quality. Bacterial counts can be highly influenced by the time since the milk is collected in tanks until it is thermally treated in the industry (De Oliveira y cols., 2015; Godič Torkar y Golc Teger, 2008). Despite that the most spoilage and pathogenic microorganisms are inactivated by the thermal treatment, the previous stages in which milk remains untreated are very important from the assurance of quality point of view, to minimize undesirable effect of microbiology in the treated and packaged product (Shah, 1994). These

stages are tank truck reception and storage on silos. Truck's reception involves the stage in which milk go from tank of truck to silo of industry. Silo is a big container for the storage of milk in isothermal conditions. The temperature of milk must be below 6° C until its transformation except when milk will be transformed immediately after or over the next 4 h. The truck reception is an important quality control point where quality control technicians collect milk samples for analyses before content passes to silo. Because raw milk is stored on tanker trucks and silos under isothermal conditions, if refrigeration temperature of tanks is not working properly, initial microorganisms could grow until reaching unacceptable levels. Thus, cooling and storage temperature of milk in farms should be controlled to prevent microbial contamination.

For safety assurance, antibiotic waste, mycotoxins, somatic cells, and bacterial counts in milk of trucks before discharging from cisterns to silos should be analyzed. Besides, from a quality point of view, additional physicochemical parameters of milk such as color, odor, appearance, acidity, alcohol stability, cryoscopic point, and milk temperature at arrival to industry are usually monitored. Likewise, chemical composition (mainly fat, proteins and drymatter) is also analyzed (Regulation (EC) N° 854/2004).

Hazards must be identified to be eliminated or reduced to acceptable safety levels. The hazard occurrence probability and importance (i.e., severity of foodborne illness) allow to define different tolerance levels for hazard (Table 27). The source of hazards can be produced by biological, chemical, or physical agents. The incidences can be determined by the presence of any of these agents or favorable conditions for the effect of them on the human health. Incidences by biological agents can be caused by the reception of milk with higher somatic cells or bacteria than legal limits accepted. Biological agents can be originated by mastitis cows, por management practices during the milking, cooling, and storage or through damaged equipment.

**Table 27.** Classification of hazards according to their level of tolerance based on their occurrence probability and importance

	<b>Importance</b>
--	-------------------

Probability	Low	Medium	High
Unlikely	Tolerable	Tolerable	Medium
Temporary	Tolerable	Medium	Not admitted
Likely	Medium	Not admitted	Not admitted

All these factors involve tissue damages on udder or proliferation of pathogenic microorganisms related to mastitis process. Incidences by chemical hazard can occur because the presence of disinfectant waste associated to milk blended with water cleaning. Incidences by physical hazard can be caused by the presence of foreign material when the maintenance of tank, truck, or silo does not have been verified consistently (CAC/ RCP 1-1969).

#### 6.4. CASE STUDY ON THE APPLICATION OF PREDICTIVE MICROBIOLOGY TOOLS TO DETERMINE THE EFFECT OF PRODUCTION CHAIN CONDITIONS ON THE MICROBIAL QUALITY OF MILK

The optimization of the milk production chain to reduce spoilage before the heat treatments at industry greatly relies on the knowledge of storage temperature and times at the different steps in the primary production chain (Lin y cols., 2016).

The temperature of milk below 7° C for a long storage period is associated with the proliferation of certain psychrotrophic bacterial species. The glycolytic, proteolytic, and lipolytic activity of these types of bacteria can produce deterioration of milk quality after heat treatment (Samardžija y cols., 2012). The most common species of psychrotrophic bacteria are *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Bacillus cereus*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, and *Enterobacteriaceae* family (Quigley y cols., 2013). *B. cereus*, *Streptococcus*, and *Pseudomonas* spp. are known as the most persistent bacteria able to survive forming biofilms on equipment in dairy industries (Ozer y Akdemir-Evrendilek, 2014). The main concern of these psychrotrophic species is related to the survival

capacity of their enzymes and spores to typical heat treatments applied to milk. Species as *Pseudomonas fluorescens* produce extracellular enzymes when bacterial population reaches or exceeds  $10^6$  CFU/ml in food (Lin y cols., 2016). They can contribute to casein and lipid degradation, causing product alteration during distribution and home storage (Baur and cols., 2015). In addition, an increase in the number of milking times from two milking per collection and truck (only 1-day milking) to four milking per collection and truck (2-day milking) can result in a larger hydrolysis of fat globules and higher production of oxidation and browning phenomena because of temperature rises during different milkings (Callejo y Díaz-Barcos, 2008).

Predictive microbiology is a scientist branch within food microbiology aimed at predicting microbial behavior in foods at different processing and storage conditions. Predictive microbiology is gaining relevance in the establishment of HACCP systems in food industries as tool to identify microbial hazards, set control limits, and/or define corrective measures to be implemented. One of the most relevant applications is focused on the study of the bacterial behaviour on foods under different environmental conditions. The kinetic parameters (i.e., maximum growth rate, lag time, inactivation rate, etc.) are estimated by means of mathematical equations. The use of predictive microbiology is very interesting in order to optimize food processes and to provide assistance in decision-making in a short time frame to food industries. To this sense, the use of mathematical models by the food industry will depend on the development of appropriate and easy-to-use software tools, which encompass predictive models and allow different users to retrieve information from them in a rapid and convenient way.

On this case study, microbial growth was assessed at different time and temperature conditions during the milk production chain, from farm to industry, by the application of predictive microbiology. Further, corrective measures and recommendations to industrials are provided on the storage and handling practices to avoid milk spoilage before application of thermal treatments.

#### **6.4.1. Selection of a predictive microbiology model**

*Pseudomonas* spp. was selected as the reference spoilage microorganism group given its relevance as psychrotrophic bacteria and its influence on milk stability (Ozer y Akdemir-Evrendilek, 2014).

The model for *Pseudomonas* spp. corresponded to the one developed by Lin (Lin y cols., 2016) for *P. fluorescens* in UHT milk, considering storage temperature as the prediction variable:

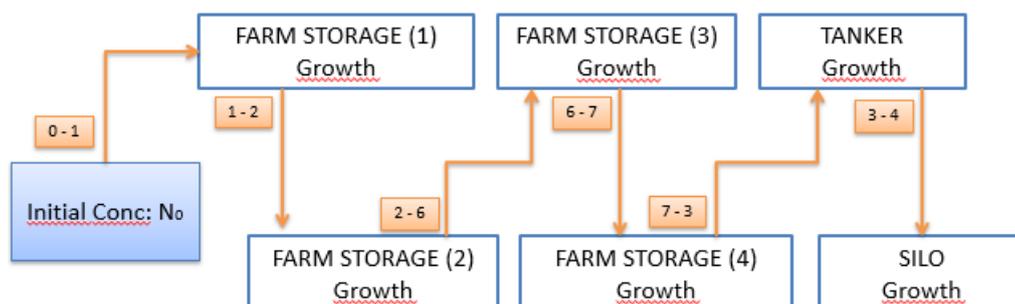
$$\sqrt{\mu} = c (T - T_0)$$

where  $\mu$  is the growth rate,  $c$  is the slope of regression line,  $T$  is the storage temperature, and  $T_0$  is the hypothetical minimum growth temperature where the extrapolation of the regression line intersects the Taxis.

#### 6.4.2. Definition of the stages and variables for dairy chain

The different stages considered in the present study are represented in Figure 19. At Farm, milk is stored up to its collection by tank trucks, and it can be split into four different steps: (1) the cooling process after the first milking, (2) storage at low temperature, (3) the cooling process after the second milking, and (4) storage at low temperature up to collection. The stage Tanker in Figure 19 represents for milk storage during tank truck transport from farm to industry. Finally, Silo stands for the milk storage in the containers at industry.

**Figure 19.** Flow diagram showing the stages considered for the exposure assessment model



Since the purpose was to determine *Pseudomonas* spp. growth along the different represented steps by applying the selected predictive model, growth factors along the different considered steps and initial bacterial concentration at farm had to be defined beforehand.

To this end, an expert knowledge elicitation was carried out using the Delphi method (Okoli y Pawlowski, 2004; European Food Safety Authority. Guidance on expert knowledge elicitation in food and feed safety risk assessment), where five experts were identified in base of their experience (Table 28) and asked for their estimation for time and storage temperature of raw milk at the different stages studied: during storage at farm, in tankers and silos at industry facilities.

**Table 28.** Description of the profile of selected experts

<b>Responsibilities, education and specialization</b>				
<b>Nº</b>	<b>Job position</b>	<b>Qualification</b>	<b>Experience</b>	<b>Experience (year)</b>
1	Cistern reception control	Technician	Responsible for ensuring specifications of raw milk during reception of cistern trucks by means of analyzing milk quality and composition	4

2	Cistern reception control	Technician	Responsible for ensuring specifications of raw milk during reception of cistern trucks by means of analyzing milk quality and composition	3
3	Milk quality control chief	Graduate	Manager responsible for the quality of the milk, dairy products and industrial processes	15
4	Cistern truck driver	Operator	Responsible for the hygienic collection of milk from tanks to cistern of truck and collection of quality control samples from farms	25
5	R + D responsible	Graduate	Responsible for the Research and Development Department of dairy products	3

The values obtained from the Delphi method are presented in Table 30 together with the initial concentration of psychrotrophic bacteria on raw milk at farm based on the study of Cempírková. These values were used to define probability distributions that were then used to input the selected growth predictive models to predict *Pseudomonas* growth from farm to industry.

### 6.4.3. Case study assumptions

It should be mentioned that model by Lin y cols. has certain limitations concerning its application in the present case study. While the targeted product in the present study was raw milk as the study scope encompasses from farm to industry (i.e., before processing), the predictive model used was performed in UHT and low-fat milk. Therefore, predictions from the model could overestimate the actual growth in raw milk, in which competing microbiota and higher fat content are expected to reduce bacterial growth in comparison with treated milk. Nonetheless, estimates are still useful to represent for a worse-case scenario in which bacterial growth is not influenced by the accompanying microbial population. Besides, the model domain of Lin y cols. was between 4 and 29° C so that temperatures below 4° C have not been considered for the exposure assessment model.

To enable to assess the suitability of the milk production chain in terms of microbial quality, a cut-off value was set determining spoilage associated with microbial protease activity after heat treatment. This reference value corresponded to 10<sup>6</sup> CFU/ml in food as discussed previously (Lin y cols., 2016).

**Table 29.** Representative values for temperature (C) and time (h) along the different steps from farm to industry for the milk production chain and initial concentration of *Pseudomonas* spp. at farm (log CFU/ml) [28]

Parameters	T <sup>a</sup> (° C)			Time (h)			<i>Pseudomonas</i> spp. (log CFU/mL)		
	Max	Min	Med	Max	Min	Med	Max	Min	Med
<b>Tank</b>	3.9	3.5	3.7	18	1	12	4.81	2.84	3.66
<b>Tanker</b>	6	3.5	4.5	8	1	5	-	-	-
<b>Silo</b>	6.5	3.5	4.0	24	4	14	-	-	-

#### 6.4.4. Exposure assessment model

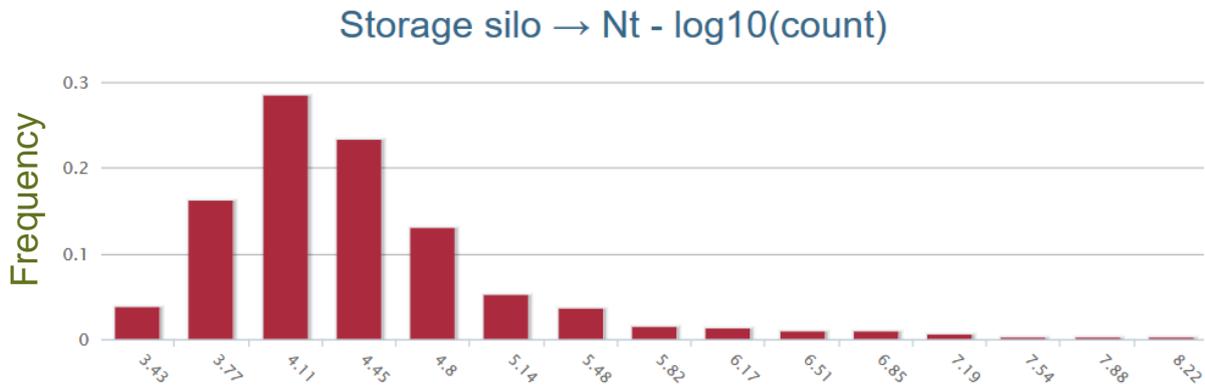
An exposure assessment model was implemented in MicroHibro software v 1.7.7. ([www.microhibro.com](http://www.microhibro.com)) including the stages abovementioned and based on the application of the selected predictive microbiology model. Storage time and temperature of milk at each stage were introduced by defining triangular distributions based on data presented in Table 29. Since distributions were used, a Monte Carlo simulation was performed in MicroHibro with 10,000 iterations. The Monte Carlo method implemented in MicroHibro enables to run the *Pseudomonas* growth model with a total of 10,000 random combinations of time and temperature for each step in the milk production chain and returns a probability distribution reflecting variability in the output which, in our case, corresponded to the concentration of *Pseudomonas* after storage in Silo.

The output from the model simulation provided the final concentration distribution for *Pseudomonas* after silo storage and just before heat treatment at industry as shown in Figure 20.

The simulated data in MicroHibro software yielded a mean concentration corresponded to 3.8 log CFU/ml, which means an increase in 0.2 log CFU/ml with respect to the initial concentration defined at farm second expert specifications in Table 30. The maximum value also resulted in a slightly higher increase of 0.4 log CFU/ml than that at farm. These results evidence that the milk production chain as defined in this study was adequate to significantly reduce milk spoilage due to psychrotrophic bacteria growth.

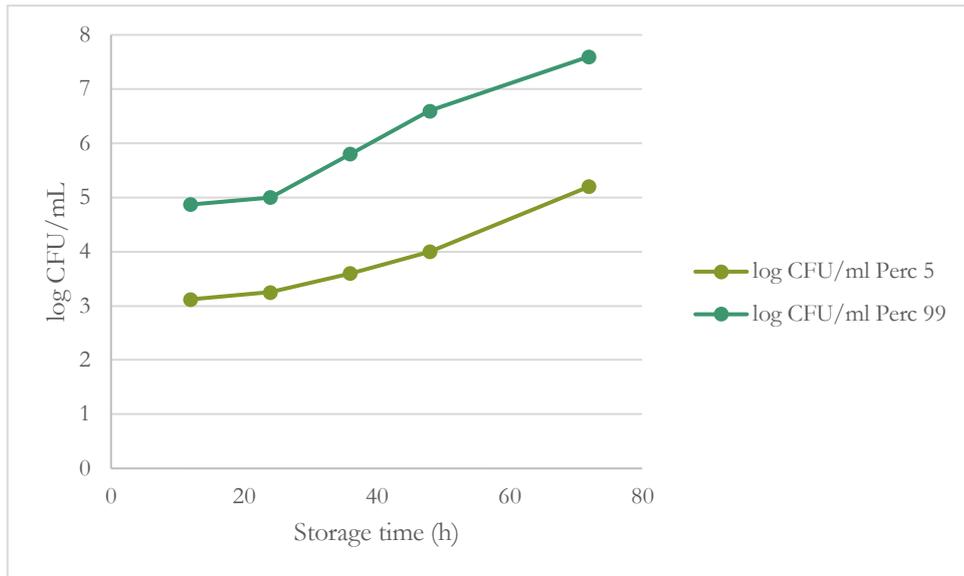
A scenario analysis was also performed in which different constant values for time and temperature during storage in silo were tested. According to the simulated data, the 5th and 99th percentiles (log CFU/ml) of the final concentration of *Pseudomonas spp.* were calculated. Percentile is a statistic widely used in exposure assessment studies to indicate the values below which a percentage of observations fall.

**Figure 20.** Simulated output distribution for final concentration of *Pseudomonas* after silo storage and before heat treatment at industry obtained using MicroHibro software



In figure 21 the 5th and 99th percentiles are represented for obtained final levels of *Pseudomonas* for different storage time in silo. According to figure 21, both percentiles showed a significant increase as time increased. For times higher than 36 h, the 99th percentile for *P. fluorescens* concentration was above 5.5 log CFU/ml (i.e., 1% of simulated values exceeded this limit). Considering a worst-case scenario (99th percentile), predicted microbial concentration was above 6 log CFU/ml (microbial quality criterion) when the storage time was around 40 h.

**Figure 21.** Simulated percentiles for the concentration of *Pseudomonas* versus storage time (h). The blue and yellow lines represent for the 99th and 5th percentiles, respectively



This fact shows the importance of maintaining a short-time milk storage in silos before processing. Besides, although considering relatively low counts of *P. fluorescens*, it is recommended that milk should not be stored in tanks for more than 24 h since unloaded milk remaining inside tanks could have a high risk of milk contamination to silos.

**Figure 22.** Simulated percentiles for the concentration of *Pseudomonas* versus storage temperature ( $^{\circ}$  C). The blue and yellow lines represent for the 99th and 5th percentiles, respectively

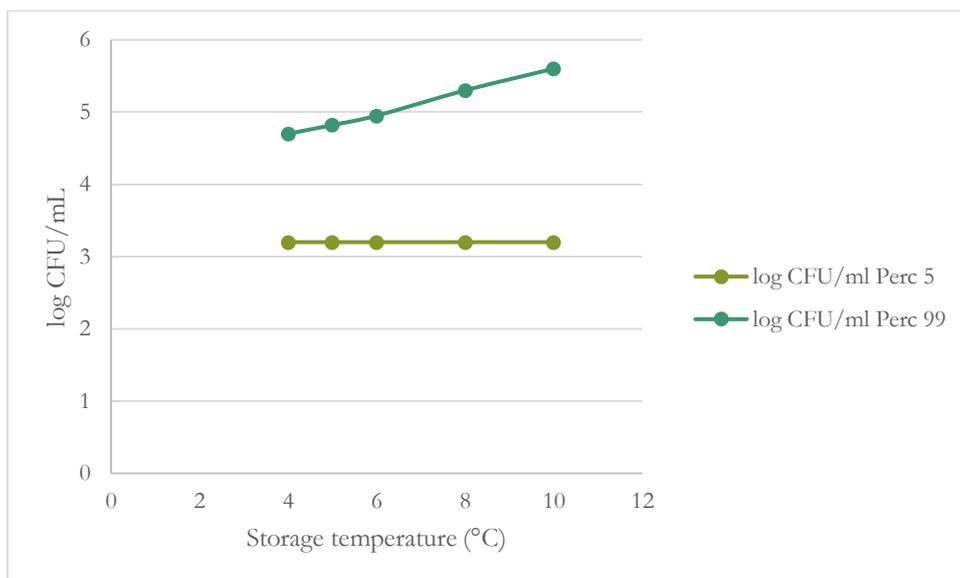


Figure 22 shows the effect of temperature. Results are only significant if considering extreme values (99th percentile) from the exposure assessment model. Even though, storage temperatures did not yield to increase levels of *P. fluorescens* above 6 log CFU/ml when simulated 99th percentile was considered for 10° C of storage temperature. However, extreme combinations of long storage times and high temperatures should be avoided to prevent milk from microbial spoilage. Storage temperature maintenance between 4 and 6° C seems to be enough to prevent the high proliferation of bacteria.

## 6.5. CONCLUSIONS

Quality system of food industries must apply the current regulations and guarantee the compliance of specifications indicated by customer. Industries can be tougher from the quality point of view by means the application of ISO 22000 and 9000:2000 Standards whose compliance provides confidence and positioning with respect to other companies. One of the most relevant parts when developing a HACCP consists in the identification and classification of hazards and analyzes possible incidences and correcting measures. Predictive microbiology is an efficient tool for the prediction of microbial safety and quality associated with specific steps along the milk production and distribution chain. To this respect, the case study presented herein evidenced that the current temperature and time values observed in the milk production chain are suitable to maintain milk microbial quality. In addition, specific critical limits were identified, especially for storage time at silo, where times shorter than 36 h could be a reliable measure to reduce milk spoilage due to microbial protease activity after heat treatment.



# CAPÍTULO 7

---

## Reflexión final y conclusiones



## CAPÍTULO 7. REFLEXIÓN FINAL Y CONCLUSIONES

En un entorno globalizado en el que cualquier información es accesible y difundida con efectividad por todo el mundo, es clave establecer mecanismos adecuados de comunicación al consumidor, apoyados en la transparencia y en una información veraz. En este sentido, aspectos como la preocupación por el medio ambiente, salud pública y el bienestar animal, deben ser tenidos en cuenta por parte de las Administraciones Públicas y productores en aras de satisfacer las inquietudes sociales.

Por todo ello, las industrias alimentarias se ven obligadas a estar actualizadas, detectando problemáticas potenciales asociadas a la difusión rápida de información, las cuales pueden conducir en ocasiones al deterioro de la imagen del sector. Y así, a lo largo del desarrollo de la Tesis Doctoral y de la incursión experimentada en una industria como COVAP, se considera importante enumerar algunos aspectos de manera previa a las conclusiones:

- El sector agroalimentario constituye un sector estratégico y muy complejo. Estratégico porque los seres vivos no podemos sobrevivir sin agua y alimento. La importancia de la agricultura y la ganadería como sectores económicos, radica en su condición de eslabón más débil al tiempo que necesario. Complejo porque una gestión o práctica incorrecta o inadecuada a lo largo de la cadena de producción-distribución, puede provocar desde rechazo o renuncia hacia la industria, marca o sector, hasta toxoinfecciones alimentarias e incluso la muerte, derivando en repercusiones comerciales y económicas en la que el sector, de manera global, se ve afectado.

- Ciertas actitudes y aptitudes a lo largo de la cadena de producción y distribución de alimentos pueden ser decisivas para el desarrollo de un producto final valorado por el consumidor, siendo a la vez nutritivo y sano. Se precisa de una gran confianza en proveedores, transportistas, responsables de la gestión de la calidad y producción en la industria, distribuidores etc. La confianza es fruto

de la comunicación activa, la transparencia y el compromiso, un trinomio que sin liderazgo no es posible alcanzar.

A continuación, se exponen las principales conclusiones de la presente Tesis Doctoral:

1. Habiéndose encontrado diferencias en las características y especificaciones de los equipos de refrigeración durante el estudio, se ha detectado que dichas diferencias intervienen en las rampas de temperatura que experimenta la leche durante el proceso de refrigeración. Por ello, es recomendable, que la monitorización de los equipos de refrigeración del tanque sea tenida en cuenta a la hora de añadir actuaciones de control de calidad. (*Capítulo 4*)
2. La monitorización de tanques mediante el registro de las rampas de temperatura realizada en la Tesis Doctoral, se presenta como una propuesta de medida que permite clasificar las distintas etapas y calcular su duración, ofreciendo, además, la posibilidad de comparar entre equipos de refrigeración de leche de distintas ganaderías o comparar la eficiencia de distintos tanques en la misma explotación. También, permite prever incrementos de recuentos y tomar decisiones no sólo en granjas sino también en etapas posteriores, exigir mejoras de equipos en base a la monitorización periódica o garantizar una calidad del producto basada en el control de la cadena de frío. (*Capítulo 4*)
3. La hora de ordeño se ha identificado como un factor importante en el mantenimiento de la calidad microbiológica de la leche, asociándose, de manera significativa, menores recuentos al ordeño de la mañana. (*Capítulo 5*)
4. Los factores asociados a la cadena de producción de leche, como el tiempo de almacenamiento y/o la mezcla de leche en cada fase, intervienen en el grado de contaminación de microorganismos aerobios mesófilos y psicrotrofos, siendo los recuentos medios de aerobios mesófilos un 27% superiores en la recogida 48h comparada a la recogida cada 24h. Asimismo,

los recuentos se incrementaron una media del 60% en silos y en cisternas con respecto a las anteriores fases de la cadena. Por ello, se propone la recogida diaria como una medida efectiva en la mejora de la calidad higiénico-sanitaria de la leche cruda en relación con la recogida cada 48h (*Capítulo 4 y 5*).

5. A pesar de que la recogida cada 24h implica una mayor frecuencia de limpieza de los tanques, no se encontraron diferencias significativas en el punto crioscópico de la leche para cada tipo de recogida, lo que supone que no existe una diferencia en la cantidad de agua residual del lavado del tanque para cada tipo de recogida. (*Capítulo 4*)
6. El establecimiento de rangos de calidad para recuentos de aerobios mesófilos y psicrotrofos, basados en la normativa europea y en referencias científicas, pueden contribuir a realizar una clasificación objetiva para la interpretación de los resultados obtenidos de recuentos tras la aplicación de medidas de mejora de calidad y seguridad alimentaria, como ha sido, en este caso, la medida de recogida diaria frente a la recogida 48h. (*Capítulo 5*)
7. Cualquier modificación en la cadena de producción de leche, puede contribuir a la adopción de medidas y ajustes en fases posteriores que repercutan en aspectos como las características organolépticas de la leche envasada, la eficiencia energética o contribuciones con el medio ambiente, sin poner en riesgo la calidad higiénica de la leche. En este trabajo, se aplicó una reducción de la temperatura de tratamiento térmico de la leche para ser envasada que supuso un ahorro energético para la industria. (*Capítulo 5*)
8. A través del uso de herramientas cuantitativas para el análisis del riesgo se verifica que los actuales valores de tiempo y temperatura medios en la cadena de producción de la leche analizada, esto es, 3.7, 4.5 y 4.0° C y 12, 5 y 14 horas para tanques, cisternas y silos, respectivamente, son efectivos en el aseguramiento de la calidad microbiológica de la leche. (*Capítulo 6*)

9. Aplicando un enfoque de Microbiología Predictiva, basado en el microorganismo indicador de alteración *Pseudomonas fluorescens* se determinó un límite crítico para el almacenamiento en silo, que correspondió a un tiempo máximo de 36 h, cuyo cumplimiento evitaría, con una probabilidad del 99 %, el deterioro de la leche asociado a la actividad de la proteasa bacteriana después del tratamiento térmico. (Capítulo 6)
  
10. En general, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral ponen de manifiesto la importancia del control de la cadena de frío a lo largo de las diferentes fases desde granja a industria, donde la fase de ordeño constituye el primer punto crítico de la calidad y seguridad de la leche. La evaluación de distintas estrategias preventivas y control basado tanto en estudios de campo, como en enfoques de Microbiología Predictiva supone una importante contribución al sector lechero. Con un gran potencial de aplicación para las industrias lácteas, cooperativas y Administraciones Públicas en distintos ámbitos y niveles y en distintos países. Su mayor valor radica en la demostrada repercusión de estos resultados en la calidad de la leche cruda y envasada y en que proporciona un mayor conocimiento del comportamiento microbiológico y de la influencia de los distintos factores asociados a la cadena, con carácter universal.



# CAPÍTULO 8

---

Referencias  
bibliográficas



## CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA

### A

Aalipour F., Mirlohi M. y Jalali M. (2013). Prevalence of antibiotic residues in commercial milk and its variation by season and thermal processing methods. *Int J Env Health Eng.* 2:41.

AECOSAN. Seguridad Alimentaria. Leche y productos lácteos [Internet]:

[http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/leche.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/leche.htm)

(Acceso: 17/05/2019).

AECOSAN. Seguridad Alimentaria. Listeria [Internet]:

[http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/listeria.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/listeria.htm)

(Acceso: 12/07/2019).

AESAN. (2010). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los biofilms y su repercusión en la seguridad alimentaria. *Revista del Comité científico:* 12. [Internet]:

[http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/evaluacion\\_riesgos/informes\\_comite/BIOFILMS.pdf](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/BIOFILMS.pdf)

(Acceso: 23/04/2020).

Agreement on the International Carriage of Perishable Foodstuffs and on the Special Equipment to be Used for Such Carriage. [Internet]: <https://www.unece.org> (Acceso: 04/04/2017).

Akhtar S., y Ahad K. (2017). Pesticides Residue in Milk and Milk Products: Mini Review. *Pak. J. Anal. Environ. Chem.* 18(1): 37 – 45.

Alhussien M.N. y Dang, A.K. (2018). Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. *Vet World*. 11(5): 562–577.

Amiot J. (1991). *Ciencia y Tecnología de la Leche. Principios y Aplicaciones*. Editorial Acribia. Zaragoza, España: 1-47; 112-124.

Amiot J., Fournier F., Lebeuf Y., Paquin P. y Simpson R. (2002). Composition, propriétés physicochimiques. Valeur nutritive, qualité technologiques, et techniques d'analyse du lait. Dans: science et technologie du lait: transformation du lait, Presses internationales polytechnique, montréal: pp. 1– 73.

## B

Bach A. y Juaristi J.L. (2008). Sistemas y prácticas de manejo en rebaños de vacuno lechero en España. XXIV CURSO DE ESPECIALIZACIÓN FEDNA.

Barbano D. M., Ma Y. y Santos M. V. (2006), "Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life," *Journal of Dairy Science*, vol. 89, no. 1, pp. 15–19.

Barcina Y., Zorraquino M.A., Pedauye J., Ros G. y Rincón F. (1987). Azidiol como conservante de muestras de leche. *Anales de Veterinaria*, vol. 3, pp. 65–69.

Barendsz A.W. (1998). Food safety and total quality management. *Food Control*. 9(2–3):163170. DOI: 10.1016/S0956-7135(97)00074-1

Baur C., Krewinkel M., Kranz B., Von Neubeck M., Wenning M., Scherer S., Stoeckel M., Hinrichs J., Stressler T. y Fischer L. (2015) Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *International Dairy Journal*. 49:23-29.

Bedolla, C.C., Castañeda V.H. y Wolter W. (2007) Methods of detection of the bovine mastitis. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. ISSN 1695-7504. Volumen VIII Número 9.

- Berg R.W. y Sandine W.E. (1970). Activation of bacterial spores. A review. *Journal of Food Protection* 33(10):435-441.
- Bhardwaj A., Kapila S., Mani J. y Malik R.K. (2009) Comparison of susceptibility to opsonic killing by in vitro human immune response of *Enterococcus* strains isolated from dairy products, clinical samples and probiotic preparation. *Int J Food Microbiol* 128: 513–515.
- Blowey R. y Edmonson P. (1995). Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche. *Acribia*. Zaragoza. 208 pp.
- Bradley A.J., Leach K.A., Breen J.E., Green L.E. y Green M.J. (2007). Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Vet Rec* 160: 253–257.
- Braem G., De Vliegher S., Verbist B., Heyndrickx M., Leroy F. y De Vuyst L. (2012). Culture-independent exploration of the teat apex microbiota of dairy cows reveals a wide bacterial species diversity. *Vet Microbiol* 157: 383–390.
- Bramley A.J. y McKinnon C.H. (1990). The microbiology of raw milk. in *Dairy Microbiology*, Vol. 1. Robinson, R.K. (ed.) Elsevier Science Publishers, London. Pp. 163-208.
- Bulletin of the International Dairy Federation (IDF) N° 501/ 2019: The World Dairy Situation 2019.
- Burke N., Zacharski K.A., Southern M., Hogan P, Ryan M.P. y Adley C.C. (2018). *The Dairy Industry: Process, Monitoring, Standards, and Quality*. Descriptive food science. Valero, A. (ed). IntechOpen.

## C

- CAC/GL 30-1999. Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment [Internet]: [http://www.fao.org/docs/eims/upload/215254/CAC\\_GL30.pdf](http://www.fao.org/docs/eims/upload/215254/CAC_GL30.pdf) (Acceso: 21/03/2020)

- CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003. HACCP/General Principles of Food Hygiene. [http://www.fao.org/input/download/standards/23/CXP\\_001e.pdf](http://www.fao.org/input/download/standards/23/CXP_001e.pdf) (Acceso: 08/11/2016).
- CAC/RCP 47-2001. Code of Hygienic Practice for the Transport of Food in Bulk and SemiPacked Food [Internet]: <http://www.ico.org/projects> (Acceso: 01/12/2016).
- CAC/RCP 57-2004. Código de Prácticas de Higiene para la Leche y los Productos Lácteos.
- Callejo A. (2010). Desinfectantes de pezones. Frisona española nº 178: 94 – 100.
- Callejo A. y Díaz-Barcos V. (2008). Calidad de la leche. Lipolisis. Frisona Española, vol. 166, ISSN 0211-3767, pp. 98–102.
- Calo L.L., McDowell R.E., VanVleck L.D. y Miller P.D. (1973). Simultaneous Selection for Milk and Beef Production Among Holstein-Friesians. *Journal of Dairy Science*. Vol. 56 (8): 1880 – 1884.
- Calvinho L. (2005). Estreptococos ambientales causantes de mastitis bovina. Jornada Técnica de Actualización en Mastitis, Montevideo, Uruguay, 20 de mayo.
- Capodifoglio E., Centola-Vidal A.M. y Santos Lima J.A. (2016). Lipolytic and proteolytic activity of *Pseudomonas* spp. isolated during milking and storage of refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science*, vol. 99, pp. 5214–5223.
- Cempírková, R. (2002). Psychrotrophic vs. total bacterial counts in bulk milk samples. *Veterinarni Medicina*, vol. 47, no. 8, pp. 227–233.
- Chandan R.C., Kilara A. y Shah N.P. (2015). *Dairy Processing and Quality Assurance*. John Wiley & Sons. P.: 121-123.
- Codex Alimentarius Commission (CAC). (1997). Hazard analysis and critical control point (HACCP) system and guidelines for its application. Report of the 29th session of the Codex Committee on Food Hygiene, Alinorm. 97/13A, Appendix II. Rome.

Colorado J., Echeverri J.J., Olivera-Angel M. y López-Herrera A. (2018). Microorganismos aislados en cultivo bacteriológico de muestras de leche de vacas holstein clínicamente sanas. *Ces veterinary medicine and zootechnics* 13(1):31-41.

Comisión Europea (2020). [Internet]:

[https://ec.europa.eu/knowledge4policy/food-fraud-quality\\_en](https://ec.europa.eu/knowledge4policy/food-fraud-quality_en)

(Acceso: 02/09/2020)

## D

D'Angelo L., Cicotello J., Zago M., Guglielmotti D., Quiberoni A. y Suarez V. (2017). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Food Microbiology* 66. 28-39.

De Jonghe V., Coorevits A., De Block J., Van Coillie E., Grijspeerdt K. y Herman L., De Vos P., Heyndrickx M. (2010). Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* 136:318–325.

Deloitte. Capitalizing on the Shifting Consumer Food Value Equation (2015). Deloitte Development LLC. [Internet]: <https://www2.deloitte.com> (Acceso: 24/02/2018).

Deloitte. Global Dairy Sector – Trends and opportunities January (2017). Deloitte Development LLC. [Internet]: <https://www2.deloitte.com> (Acceso: 23/05/2018).

De Oliveira G., Favarin L., Luchese R.H. y McIntosh D. (2015). Psychrotrophic bacteria in milk: How do we really know? *Brazilian Journal of Microbiology.* 46(2):313-321.

De Vuyst L. y Tsakalidou E. (2008). *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. *Int Dairy J* 18: 476–485.

Desrosier N.W. y Heiligman F. (2006). Heat-activation of bacterial spore. *Journal of Food Science* 21(1):54 – 62 DOI: 10.1111/j.1365-2621.1956.tb16892.x

Dhanashekar R., Akkinapalli S. and Nellutla A. (2012). Milk-borne infections. An analysis of their potential effect on the milk industry. *Germas* 2(3):101 – 109.

## E

Eijlander R.T., Abee T. y Kuipers O.P. (2011). Bacterial spores in food: how phenotypic variability complicates prediction of spore properties and bacterial behavior *Curr. Opin. Biotech.* 22:180–186.

Elmoslemany A., Keefe G.P., Dohoo I.R. y Jayarao B.M. (2009). Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. Part 1: Overall risk factors. *Journal of Dairy Science.* 92, (6): 2634 – 2643.

Elmoslemany A., Keefe G.P., Dohoo I.R., Wichtel J.J., Stryhn H. y Dingwell R.T. (2010). The association between bulk tank milk analysis for raw milk quality and on-farm management practices. *Preventive Veterinary Medicine.* 95(1-2):32-40

European Food Safety Authority. (2014). Guidance on expert knowledge elicitation in food and feed safety risk assessment. *EFSA Journal.* 12(6):3734.

## F

FAO. Food and Agriculture Organization. (2017). [Internet]: <http://www.fao.org/agriculture-consumer-protection-department/en> (Acceso: 24/07/2017).

FAO. Food and Agriculture Organization. (2020). [Internet]: <http://www.fao.org/3/y4392e/y4392e07.htm> (Acceso: 03/09/2020).

FAO/OMS, Food and Agriculture Organization/Organización Mundial de la Salud. (2016). Risk communication applied to food safety handbook. Food safety and quality series, 2.

Food Intolerance Network. (2013). What is lactose intolerance?. [Internet]. <https://www.food-intolerance-network.com/food-intolerances/lactose-intolerance/basic-information.html>  
(Acceso: 09/06/2019).

## G

Godič Torkar K y Golc Teger S. (2008). The microbiological quality of raw milk after introducing the two-day's milk collecting system. *Acta Agriculturae Slovenica*. 92(1):61-74.

Gould G.W. (2006). History of science – spores. *J. Appl. Microbiol.* 101:507–513.

Guijarro R., Calvo E. y Soto S. (2002). Desinfección de ubres preordeño y prevención de mamitis: situación legal y análisis de eficacia. *Mundo ganadero*: 89 – 92.

## H

Halasa T., Huijps K., Østerås O. y Hogeveen H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Q.* 29: 18 – 31.

Hayes M.C. y Boor K. (2001). Raw milk and fluid milk products. *Applied Dairy Microbiology*, E. H. Marth and J. Steele, Eds., pp. 59–76, New York, USA, 2nd edition.

Hamann J. (2010). Mastitis and raw milk quality, safety and yield in *Improving the Safety and Quality of Milk: Milk Production and Processing*. Griffiths M., Ed., pp. 246-263.

Henningson R.W. (1966). Cryoscopy of Milk: Effect of Variations in the Method. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*. 49 (3): 511–515

Hornstra L.M., Ter Beek A., Smelt JP., Kallemeijn WW. Y Brul S. (2009). On the origin of heterogeneity in (preservation) resistance of *Bacillus* spores: input for a 'systems' analysis approach of bacterial spore outgrowth *Int. J. Food Microbiol.*, 134:9–15

**I**

Informe de la consulta mixta FAO/OMS Roma, Italia, 27-31 de enero. (1997).  
Gestión de riesgos e inocuidad de los alimentos. Estudio FAO  
alimentación y nutrición, 65.

INLAC, Guía de prácticas correctas para ganaderías de vacuno de leche  
[Internet]:

[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/publicaciones/INLAC\\_tcm30-103710.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/publicaciones/INLAC_tcm30-103710.pdf) (Acceso: 31/03/2020).

ISO 22000:2005. Food Safety Management Systems—Requirements for any  
Organization in the Food Chain [Internet]: <https://www.iso.org/iso-22000-foodsafety-management.html> (Acceso: 10/08/2017).

Istamboulié G., Paniel N., Zara L., Reguillo L., Barthelmebs L., Noguer T. (2016).  
Development of an impedimetric aptasensor for the determination of  
aflatoxin M1 in milk. *Talanta*. 146 (1): 464-469.

**J**

Jenness R. (1988) Composition of Milk. In: Wong N.P., Jenness R., Keeney M.,  
Marth E.H. (eds) *Fundamentals of Dairy Chemistry*. Springer, Boston, MA.

Jiménez W.A. (2005). Evaluación de la calidad físico-química y microbiológica  
de la leche bovina de tres principales pequeños productores de Santa Ana  
Mixtan del parcelamiento nueva concepción Escuintla, Guatemala. PhD.  
Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Medicina  
Veterinaria y Zootecnia. Guatemala.

**K**

Keyport, N.J. (1995). Dairy Practices Council. DPC #4 Guidelines for installation,  
cleaning, and sanitizing of large parlor milking systems

Khanal S.N., Anand S., Muthukumarappan K., Huegli M. (2014). Inactivation of  
thermoduric aerobic spore formers in milk by ultrasonication. *Food Control*.  
37:232-239.

Khanson Q. (2011). An introduction to HACCP. 1st ed. Toronto, Canada: Qamrul A. Khan.

## L

Lahtinen S., Ouwehand A.C., Salminen S., von Wright A. (2011). Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 4th ed by CRC Press, Boca Ratón, Florida, USA. Pp. 2-6.

Lin H., Shavezipur M., Yousef A., Maleky F. (2016). Prediction of growth of *Pseudomonas fluorescens* in milk during storage under fluctuating temperature. Journal of Dairy Science. 99:18221830.

Linn J.G. (1988). Factors Affecting the Composition of Milk from Dairy Cows. Designing Foods: Animal Product Options in the Marketplace. National Research Council.

Lizcano L., López de la Torre C., Roldán C., Ercilla A., Rodríguez F. y Santero M.J. (2009). Manual de Aplicación del Sistema APPCC en Industrias Lácteas de Castilla la Mancha. 1st ed. Toledo, Spain: Cecam.

López A.L. y Barriga D. (2016). La leche. Composición y características. Tecnología, Postcosecha e Industria Agroalimentaria, Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera.

## M

Marth E.H. y Steele J.L., editors. (2001). Raw milk and fluid milk products. Applied Dairy Microbiology. 2nd ed. New York, USA: Marcel Dekker; 736 p.

Martindale M.K. (1999). The Complete Drug Reference. 32<sup>th</sup> Antibacterials. UK, London: The Pharmaceutical press. 1:115-32.

Masud T., Ali A.M. y Shah, M.A. (1993). Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy products. In: Australian Journal of Dairy Technol. 48(1):30-36.

- McDonald K. y Sun D.W. (1999). Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 53, 1 – 27.
- McKinnon C.H. y Pettipher G.L. (1983). A survey of sources of heat-resistant bacteria in milk with particular reference to psychrotrophic spore-forming bacteria. *J Dairy Res.* 50(2):163-70.
- Meslier V., Loux V. y Renault P. (2012). Genome sequence of *Leuconostoc pseudomesenteroides* strain 4882, isolated from a dairy starter culture. *J. Bacteriol.* 194, 6637. 10.1128/jb.01696-12
- MARM, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Guía para la Producción Responsable: Manual de Producción de Leche Cruda de Vaca, Spain. [Internet]: [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/manual\\_produccion\\_leche\\_cruda\\_vaca\\_tcm30-111501.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/manual_produccion_leche_cruda_vaca_tcm30-111501.pdf) (Acceso: 12/07/2018).
- MAPA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Subdirección General de Productos Ganaderos, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. (2019). Informe de coyuntura del sector vacuno de leche.
- MAPA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Subdirección General de Productos Ganaderos, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. (2020). Estructura del sector vacuno lechero en España y en la unión europea 2015-2018.
- Milk Market Observatory. (2019). Annual production series of dairy products. European Commission. [Internet]: [https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/food-farming-fisheries/farming/documents/eu-dairy-historical-production-stocks-series\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/food-farming-fisheries/farming/documents/eu-dairy-historical-production-stocks-series_en.pdf) (Acceso: 09/03/2020).
- Montanari G., Borsari A., Chiavari C., Ferri G., Zambonelli C. y Grazia L. (2004). Morphological and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans*. *Journal of Applied Microbiology* 97:802–809.

Mourad G., Samir M. y Bettache G. (2014). Composition and nutritional value of raw milk. *Biological Sciences and Pharmaceutical Research* Vol. 2(10):115-122.

Murphy S.C. (1997). Raw milk bacteria tests: standard plate count, preliminary incubation count, lab pasteurized count and coliform count-what do they mean for your farm?. *Proceedings of the National Mastitis Council Regional Meeting*. Syracuse NY, USA. 34–42.

## N

Nisha A.R. (2012). Antibiotic residues: A global health hazard. *Vet World* 1:375-7.

Novoa C.F. y Restrepo L.P. (2007). Influence of psychrotrophic bacteria in proteolytic activity of milk. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia (Bogotá)* 54:1.

## O

O'Connell A., Ruegg P.L., Jordan K., O'Brien B. y Gleeson D. (2016). The effect of storage temperature and duration on the microbial quality of bulk tank milk. *J. Dairy Sci.* 99:3367–3374.

OCDE-FAO. Leche y productos lácteos- perspectivas agrícolas 2019-2028. [Internet]:

[http://www.fao.org/3/CA4076EN/CA4076EN\\_Chapter7\\_Dairy.pdf](http://www.fao.org/3/CA4076EN/CA4076EN_Chapter7_Dairy.pdf)

(Acceso: 15/08/2019)

Okoli C. y Pawlowski S.D. (2004). The Delphi method as a research tool: An example, design considerations and applications. *Information Management*. 42(1):15-29

Oomes S., van Zuijlen A., Hehenkamp J., Witsenboer H., van der Vossen J. y Brul S. (2007). The characterization of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. *International Journal of Food Microbiology*, 120:85–94.

Ozer B. y Akdemir-Evrendilek G. (2014). Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments, CRC Press, Boca Raton, FL, USA. ISBN: 978-81482235029.

## P

Palop A., Mañas P. y Condon S. (1999). Sporulation temperature and heat resistance of Bacillus spores: A review. Volume 19(1):57–72.

Pascual M.R. y Calderón V. (2015). Microbiología Alimentaria. 2ed. Díaz de Santos. 281 – 284.

Pereira A.P.M. y Sant'Ana A.S. (2018). Diversity and fate of spore forming bacteria in cocoa powder, milk powder, starch and sugar during processing: A review. Trends in Food Science and Technology. 76:101-118.

Pérez-Rodríguez, F., Valero, A. (2013). Predictive Microbiology in Foods. In: SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition Series. Ed. Springer (Germany). ISBN: 978-1-4614-5519-6.

Peristeropoulou M., Fragkaki A.G., Printzos N. y Laina I. (2015). Implementation of the hazard analysis critical control point (HACCP) system to a dairy industry: Evaluation of benefits and barriers. Journal of Food Nutrition and Dietetics.1(1):102. DOI: 10.19104/jfnd.102

Perko, B. (2011). Effect of prolonged storage on microbiological quality of raw milk. Mljekarstvo/Dairy 61(2):114-124.

Programa Nacional de Control Oficial de las Condiciones Higiénico-sanitarias de la Producción y de la Trazabilidad de Leche Cruda 2011 – 2015. Plan Nacional de Control de la Cadena Alimentaria.

## Q

Quigley L., O'Sullivan O., Stanton C., Beresford T.P., Ross R.P., Fitzgerald G.F. y Cotter P.D. (2013). The complex microbiota of raw milk. FEMS Microbiol Rev. 37(5):664-98. doi: 10.1111/1574-6976.12030.

## R

- Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C. y Hinchcliff K.W. (2002). Medicina Veterinaria. Mastitis Bovina. Edit. Mcgraw-hill. 9o Edición. Vol 1. Madrid, España. 728 - 810.
- Raikos V. (2010). Effect of heat treatment on milk protein functionality at emulsion interfaces: a review. *Food Hydrocolloids*, vol. 24(4) 259–265, 2010.
- Real Decreto 237/2000, de 18 de febrero, por el que se establecen las especificaciones técnicas que deben cumplir los vehículos especiales para el transporte terrestre de productos alimentarios a temperatura regulada y los procedimientos para el control de conformidad con las especificaciones.
- Real Decreto 319/2015, de 24 de abril, sobre declaraciones obligatorias a efectuar por primeros compradores y productores de leche y productos lácteos de vaca, oveja y cabra.
- Real Decreto 1600/2011, de 4 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 217/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan la identificación y registro de los agentes, establecimientos y contenedores que intervienen en el sector lácteo, y el registro de los movimientos de la leche, y el Real Decreto 1728/2007, de 21 de diciembre, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los operadores del sector lácteo.
- Real Decreto 1728/2007, de 21 de diciembre, por el que se establece la normativa básica de control que deben cumplir los operadores del sector lácteo y se modifica el Real Decreto 217/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan la identificación y registro de los agentes, establecimientos y contenedores que intervienen en el sector lácteo, y el registro de los movimientos de la leche.
- Red Nacional de Granjas Típicas (RENGRATI). Análisis de la estructura productiva en el primer año sin cuotas. Panel Nacional de Vacuno de Leche. 2016. [Internet]: <https://www.mapa.gob.es> (Acceso: 01/03/2016).
- Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos

generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria.

Reglamento (CE) N° 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo de 2009, por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal.

Reglamento (CEE) N° 804/1968, por el que se establece la Organización Común de Mercados en el sector de la leche y los productos lácteos.

Reglamento (CE) N° 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios.

Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. [Internet]: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do> (Acceso: 04/06/2017).

Reglamento (CE) N° 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano. [Internet]: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content>. (Acceso: 22/03/2017).

Reglamento (UE) N° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor.

Reglamento (CE) N° 1234/2007 del Consejo, de 22 de octubre de 2007, por el que se crea una Organización Común de Mercados Agrícolas y se establecen disposiciones específicas para determinados productos agrícolas.

Reglamento (UE) N° 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de diciembre de 2013, por el que se crea la Organización Común de Mercados de los Productos Agrarios.

Reglamento (CE) N° 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

Reglamento (UE) N° 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios.

Roberts T.A., Gibson A.M. y Robinson A. (1981). Prediction of toxin production by *Clostridium botulinum* in pasteurized pork slurry. *J. Food Technol.* 16: 337 – 355.

Russel S. (2000). ISO 9000:2000 and the EFQM excellence model: Competition or co-operation? *Journal of Total Quality Management.* 11(4–6):657-665.

Rysanek D., Babak V. y Zouharova M. (2007). Bulk tank milk somatic cell count and sources of raw milk contamination with mastitis pathogens. *Veterinarni Medicina.* 52 (6): 223–230.

## S

Samardžija D., Zamberlin Š. y Pogačić T. (2012). Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. *Mljekarsivo.* 62 (2) 77–95, 2012.

Sánchez J.I., Martínez B. y Rodríguez A. (2005). Rational selection of *Leuconostoc* strains for mixed starters based on the physiological biodiversity found in raw milk fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 377–387. 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.025

Scheldeman P., Herman L., Foster S. y Heyndrickx M. (2006). *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk *J. Appl. Microbiol.*, 101:542–555.

Scheldeman P., Pil A., Herman L., De Vos P. y Heyndrickx M. (2005). Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms *Appl. Environ. Microbiol.*, 71:1480–1494.

- Shah N.P. (1994). Psychrotrophs in milk: A review. *Milchwissenschaft.*, 49:432-437.
- Shipe W.F., Dahlberg A.C. y Herreington, B.L. (1953). Variations in the Freezing Point of Cow's Milk. *J. Dairy Sci.*; 36: 924.
- Signorini M.L., Sequeira G.J., Bonazza J.C., Dalla-Santina R., Marti L.E., Frizzo L. y Rosmini M. (2008). Use of indicator microorganisms for the hygienic-sanitary conditions evaluation in the milk primary production. *Revista Científica Fcv-Luz.* 18 (2): 207–217.
- Smit G, Smit B.A. y Engels W.J. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol Rev.* 29 (3): 591 - 610.
- Solinas C., Corpino M., Maccioni R., Pelosi U. (2010). Cow's milk protein allergy. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 3:76-9.
- Soomro A.H., Masud T. y Kiram A. (2002). Role of acid lactic bacteria (LAB) in food preservation and human health – A review. *Pakistan journal of nutrition* 1 (1): 20-24.
- Spreer E. (1991). *Lactología industrial.* Zaragoza, España. Acribia. 7-55.
- Stanley G. (1998). *Microbiología de los productos lácteos fermentados.* En: R. Early; *Tecnología de los productos lácteos.* Segunda edición. Editorial Acribia Zaragoza, España.
- Stepaniak L. (2000). Bacteria other than *Pseudomonas* spp. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, vol. 1, Academic Press, New York. H. Roginski, J.W. Fuquay, P.F. Fox (Eds.). 2345–2351.
- Storhaug C.L., Fosse S.K., Fadnes L.T. (2017). Country, regional, and global estimates for lactose malabsorption in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2: 738–46.
- Tatini S.R., Mekala P., El-Habaz A., y Griffiths M.W. (1991). Rapid Detection of Psychrotrophic Bacteria In Manufacturing Grade Raw Milks. *J Food Prot.* 54(11):861-867.

- Te Giffel M.C., Wagendorp A., Herrewegh A. y Driehuis F. (2002). Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81(1-4):625-30.
- Tenenhaus-Aziza, F., Ellouze, M. (2015). Software for predictive microbiology and risk assessment: A description and comparison of tools presented at the ICPMF8 Software Fair. *Food Microbiology*, 45, 290-299.
- Toušová R., Stádník L. y Ducháček J. (2013). Effects of season and time of milking on spontaneous and induced lipolysis in bovine milk fat,” *Czech Journal of Food Science*. 31 (1): 20–26.
- Tsakalidou E., Nolet L.M.L. y Toldrá F. (eds) (2009). *Handbook of Dairy Foods Analysis*. Boca Raton: CRC Press: 647-664.

## V

- Valeeva N.I., Meuwissen M.P., Lansink A.G. y Huirne R.B. (2005). Improving food safety within the dairy chain: An application of conjoint analysis. *Journal of Dairy Science*. 88(4):1601-1612.
- Valero A. (2006). Aplicaciones de modelos predictivos en evaluación de riesgo de *Listeria monocytogenes* en alimentos mínimamente procesados. Tesis Doctoral dirigida por Zurera G., García-Gimeno R.M., y Hervás C. Dpto de Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Córdoba.
- Veisseyre, R. (1988). *Lactología técnica*. 2ed., Zaragoza, ES., Acribia. 68-73; 116-118.

## W

- Waite, R. (1961). A note on a method of overcoming the effect of udder disease or injury in experiments involving milk yield and composition. *J. Dairy Res.* 28, 75–79.
- Ward P.N., Holden M.T.G., Leigh J.A., Lennard N., Bignell A., Barron A., Clark L., Quail M.A., Woodward J., Barrell B.G., Egan S.A., Field T.R., Maskell D., Kehoe M., Dowson C.G., Chanter N., Whatmore A.M., Bentley S.D. y Parkhill J. (2009). Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*. *BMC Genomics* 10: 54.

Widyastuti Y., Rohmatussolihat R. y Febrisiantosa A. (2014). The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. *Food and Nutrition Sciences* 05(04):435-442.

Wilcox, C.J., Pfau, K.O., Mather, R.E. y Bartlett, J.W. (1959). Genetic and environmental influences upon solids-not-fat content of cow's milk. *J. Dairy Sci.* 42, 1132–1146.