

Informe final publicable de proyecto

INFLUENCIA DE ESPORAS PRESENTES EN LA LÍNEA DE PROCESAMIENTO DE LECHE ENTERA EN POLVO SOBRE SUS PROPIEDADES TECNOLÓGICAS Y SENSORIALES

Código de proyecto ANII: FMV_3_2020_1_162265

04/01/2024

CELANO JORCÍN, Laura Teresita (Responsable Técnico - Científico)

REGINENSI RIVERA, Stella Maris (Investigador)

TECHEIRA PEREIRA, NORA SOLEDAD (Investigador)

ELLIS DE LUCA, Ana Claudia (Investigador)

GÁMBARO GARCÍA, Adriana (Investigador)

GONZALEZ RAMOS, Marcela Joan (Investigador)

LÓPEZ PEDEMONTE, Tomás (Investigador)

OLIVERA RODI, Jorge Arturo (Investigador)

PANIZZOLO MARTÍNEZ, Luis Alberto (Investigador)

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA. INSTITUTO TECNOLÓGICO REGIONAL SUROESTE (Institución Proponente) \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE AGRONOMÍA \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA \\
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA

Resumen del proyecto

Se identificó la población y evaluó la capacidad de deterioro enzimático y la dinámica de esporas de bacterias mesófilas y termófilas durante el proceso de secado de leche entera en polvo. El recuento de esporas termófilas mostró un aumento hacia el final del proceso. Las principales actividades enzimáticas presentadas fueron proteolítica y fosfolipolítica. Se identificaron 20 especies, siendo más frecuentes *Bacillus licheniformis* (65.8 %), *B. pumilus* (6.3 %) y *B. aerius* (5.4 %). La población de esporas en LEP evaluada durante el período de vida útil a 25 °C y 35 °C mostró que la población de esporas anaerobias y termófilas desaparecen con el tiempo, sin embargo permanece estable el recuento de esporas de aerobios mesófilos. La cepa F2 fue la más abundante dentro de la especie *B. licheniformis* que fue la única especie aislada también hacia el final de la vida útil en leche entera en polvo. También se evaluó el efecto de la concentración de esporas (102 y 104 esporas/mL) para un aislamiento seleccionado de cepa F2 de *B. licheniformis* con actividad proteolítica, lipolítica, fosfolipolítica y β -galactosidasa en leche UAT elaborada a partir de LPE. Se evaluaron los parámetros: pH, acidez, gelación, viscosidad, composición en lactosa, proteína y caseína y variación de color. No se obtuvo crecimiento bacteriano luego del tratamiento térmico, posiblemente debido a que la cepa seleccionada no sobrevivió, pero se observaron cambios de color, disminución de pH y aumento de viscosidad a partir del día 15 que evidencian disminución de la vida útil del producto. La actividad enzimática residual de las propias esporas podría ser la causa aunque se debe profundizar en este aspecto. Estos resultados aportan conocimiento original sobre diversidad de especies esporulantes, su frecuencia dentro del proceso de secado y su potencial de deterioro enzimático, datos que aún no se poseían a nivel nacional y constituyen una primera aproximación para la toma de decisiones eficiente en busca de un producto final de calidad superior y accesible a mercados más exigentes.

Ingeniería y Tecnología / Otras Ingenierías y Tecnologías / Alimentos y Bebidas / Microbiología de productos lácteos deshidratados

Palabras clave: bacterias esporuladas / leche entera en polvo / aptitud tecnológica /

Introducción

La microbiota de la leche cruda es compleja. Está conformada por diversos grupos entre los que se encuentran bacterias Gram negativas patógenas y coliformes; Gram positivas ácido lácticas y formadoras de esporas (mesófilas y termófilas), y en menor proporción, hongos y levaduras (Sadiq et al., 2018; Tilocca et al., 2020). Las esporas son estructuras de resistencia a condiciones extremas tales como altas temperaturas, bajo pH y baja actividad hídrica disminuida, pudiendo sobrevivir a los procesos normalmente utilizados para la elaboración de leche en polvo, asegurando la germinación y posterior desarrollo de su forma vegetativa (Eijlander et al., 2019; Li et al., 2020). Por sus características, estos procesos tienden a eliminar las formas vegetativas favoreciendo la permanencia e incluso el aumento de especies formadoras de esporas en el producto final afectando significativamente su calidad e inocuidad (Wedel et al., 2019). La capacidad de las especies formadoras de esporas de sobrevivir en condiciones extremas, de causar toxiinfecciones y de alterar las propiedades sensoriales y tecnológicas, son aspectos que impactan directamente en la calidad y seguridad alimentaria de los productos lácteos deshidratados (Li et al., 2019; Mehta et al., 2019). Estos factores generan pérdidas económicas asociadas a la leche en polvo y los productos que la utilizan como ingrediente, tales como fórmulas para bebés y niños pequeños, sopas, salsas y productos de confitería (Lagrange et al., 2015).

El proceso de obtención de leche en polvo comienza concentrando por evaporación y luego secando por atomización. Brevemente, la leche se pasteuriza y concentra hasta un 48- 50 % de sólidos en un evaporador de uno o más efectos, de película descendente a temperaturas menores a 75 °C. La leche concentrada se transporta hacia la torre de secado, donde el producto es atomizado y secado por aire sanitario caliente, a temperaturas entre 180 y 230 °C hasta un 3 a 7 % de humedad. Las partículas deshidratadas pasan a un sistema de lecho fluido donde adquieren su tamaño y humedad final según se trate de leche entera (2.5-3 %) o descremada (3.5-4 %), mediante la aplicación de aire inyectado a 80-100 °C y es finalmente envasado en atmósfera inerte de N₂ (Moejes & Boxtel, 2017).

En la leche en polvo las esporas no producen deterioro porque se encuentra en un estado metabólicamente inactivo. Sin embargo, cuando las condiciones de humedad y temperatura son adecuadas, por ejemplo al rehidratar el polvo, son capaces de germinar a su forma vegetativa, reproducirse y liberar enzimas hidrolíticas o toxinas. Durante el proceso de secado se generan condiciones que favorecen un aumento selectivo de bacterias esporuladas y de la concentración de esporas, debido a las altas temperaturas alcanzadas principalmente en los evaporadores y las placas de intercambio de

calor. Las formas vegetativas, principalmente las termófilas, son capaces de formar biofilms y liberar enzimas con la consiguiente pérdida de calidad en el producto final (Flint et al., 2020; Sadiq et al., 2018). La etapa de precalentamiento (40-65 °C) promueve las condiciones óptimas para el crecimiento de bacterias termófilas y formación de biofilms donde éstas pueden esporular. El tiempo operativo del proceso es clave, ya que luego de 12 a 16 h. de producción continua se constata un aumento exponencial de la población de bacterias termófilas que generan esporas con alta resistencia térmica. Para minimizar este efecto aumentando el tiempo de producción existen diferentes acciones: limpieza intermedia, tratamiento de leche a ultra alta temperatura (UAT), y diferentes sistemas de precalentamiento que no siempre son efectivos. Una vez que la leche pasteurizada pasa a los evaporadores, la formación de biofilms ya no es tan crítica, sin embargo se observa un aumento en la concentración de esporas que se adhieren por hidrofobicidad a la superficie pasando al concentrado (Westergaard, 2001).

Hasta el momento se han aislado e identificado de productos lácteos deshidratados o concentrados lácteos 35 especies bacterianas aerobias y anaerobias facultativas capaces de esporular, perteneciente a 15 géneros diferentes (Sadiq et al., 2018). Las especies pertenecientes al género *Bacillus* son las más frecuentes, seguidas por los géneros *Geobacillus* y *Anoxybacillus* (Bursová et al., 2018; Heini et al., 2018; Karaca et al., 2019). De ellas, la especie *B. cereus* es la única que puede originar toxiinfecciones alimentarias asociadas tanto a la secreción de la toxina cereulida preformada en el alimento (síndrome emético), o a la ingestión de la bacteria en alto número (>10⁶ ufc/g) que produce enterotoxinas en intestino delgado (síndrome diarreico) (Bursová et al., 2018). En Uruguay el grupo liderado por la Dra. Reginensi, participante en este proyecto, ha analizado 22 muestras de leche en polvo presente en el mercado, aislando e identificado 5 géneros en el siguiente orden de frecuencia *B. licheniformis*, *A. flavithermus*, *B. subtilis sensu lato*, *B. megaterium* y *B. pumilus* (Reginensi et al., 2011).

Otro aspecto a considerar es la diversidad en la termorresistencia de las esporas intra e inter especie. Hasta el momento, las esporas de *B. sporothermodurans* presentan la mayor termorresistencia (D140 de 3.4-7.9 s), seguidas por las de *G. stearothermophilus* (D140 es 0.9 s) (Aouadhi et al., 2016). Además la alta hidrofobicidad que presentan las esporas les permite adherirse y permanecer en las superficies luego de aplicados los procesos de limpieza y desinfección. En condiciones favorables formarán biofilms, pudiendo además liberar enzimas, mayormente termorresistentes, que provocan interferencias tecnológicas y defectos sensoriales en productos lácteos deshidratados (De Jonghe et al., 2010). Sus efectos son diversos dependiendo de la cepa, pero aún no ha sido investigadas en profundidad (Sadiq et al., 2018).

Al momento actual no se ha reportado bibliografía internacional ni datos publicados a nivel nacional sobre la identidad, frecuencia y capacidad de deterioro de bacterias esporuladas mesófilas y termófilas presentes en cada etapa del proceso de secado de productos lácteos deshidratados, siendo éste el punto de partida del siguiente proyecto.

El siguiente proyecto propone caracterizar la población total de bacterias mesófilas y termófilas capaces de esporular en diferentes condiciones de humedad y temperaturas alcanzadas durante el proceso de obtención de la leche entera en polvo. Las exigencias microbiológicas actuales fijadas por el Reglamento Bromatológico Nacional, no consideran realizar recuento de esporas en la materia prima (leche cruda) ni en el producto final deshidratado. De todos modos la industria de productos lácteos deshidratados realiza controles de recuento de esporas de rutina en la leche cruda remitida a planta, en los diferentes puntos del proceso y en el producto final deshidratado, con el fin de obtener mayor información sobre la eficiencia de los procesos de limpieza y la calidad del producto final. Este análisis de rutina se realiza en forma general, tiene carácter puramente informativo y no considera las características genéticas de la población, la diversidad de cepas presentes, su frecuencia, su concentración y su potencial como agentes causantes de toxiinfecciones o deterioro de producto. Todas estas variables, que actualmente no se conocen, se vuelven determinantes para la calidad del producto final, su inocuidad, su vida útil y su posible aplicación como ingrediente en la elaboración de otros productos lácteos, en particular de aquellos destinados a poblaciones vulnerables (lactantes, ancianos, inmunodeprimidos).

Conocer las características de la población de bacterias esporuladas mesófilas y termófilas en las diferentes etapas del proceso, brindará herramientas para rever tanto los procesos como los protocolos de limpieza actualmente utilizados en la industria de productos lácteos deshidratados.

Este proyecto busca transferir los resultados obtenidos para su aplicación en la industria láctea con el fin de minimizar el impacto de los principales microorganismos identificados que presentan mayor capacidad de deterioro. Esto repercutirá en aspectos relacionados con la inocuidad, cambios fisicoquímicos y sensoriales que pudieran ocurrir al rehidratar la leche entera en polvo u otros alimentos que la contengan. Alcanzar un producto de mejor calidad en los términos antes dichos permitirá obtener un producto con mayor valor agregado y calidad superior, que aumente el acceso a mercados más diversos y exigentes. Los estándares de comercio internacionales involucran cada vez más niveles de corte en función de la presencia de esporulados en productos lácteos deshidratados. La identificación y características de la población de bacterias esporuladas mesófilas y termófilas, permitirá estimar, predecir y por ende, evitar o minimizar

reacciones de deterioro asociadas a la liberación de enzimas, toxinas u otros metabolitos. Este conocimiento es fundamental para la toma de decisiones en relación con el destino comercial de los diferentes lotes, evitando así su rechazo y la pérdida económica asociada. Otro aspecto no menor es el vinculado a los protocolos de limpieza que se implementan en las plantas industriales y que en muchos casos son determinantes para definir horas de funcionamiento ininterrumpido de los evaporadores y torres de secado. En particular se buscará la implementación de un sistema de análisis no rutinario (a demanda) a efectos de la identificación de poblaciones de esporas más frecuentemente asociadas a alteraciones sensoriales y tecnológicas en productos lácteos deshidratados. Se entiende que este control no forma parte de las actividades regulares de los laboratorios de apoyo a la producción ni de aquellos dedicados a su contralor. En este proyecto se pondrán a punto y estandarizarán diferentes técnicas fisicoquímicas que resultan un complemento valioso e ideal para estimar el impacto real de la presencia de las esporas y sus enzimas en los productos, así como predecir la vida útil de los mismos. Se incorporará para el análisis los datos relativos a las diferentes regiones de procedencia de las muestras y plantas industriales, así como su variación estacional. En este sentido, la continuidad en la adquisición y análisis de muestras de forma periódica permitirá iniciar la construcción de una biblioteca de datos que podrá ser consultada de forma regular por las industrias del sector lácteo de todo el país y actualizada constantemente. Los resultados obtenidos y las herramientas generadas en este proyecto permitirán minimizar pérdidas en el sector de productos lácteos deshidratados en general, con especial foco en este caso en la leche entera en polvo; aumentando su rendimiento, y evitando o minimizando situaciones de reprocesamiento. Esperamos realizar aportes que se traduzcan en mejoras sensibles tanto en calidad como en rendimiento económico. Durante la ejecución del proyecto se formarán recursos humanos, con el fin de generar un grupo de investigadores altamente capacitados en la temática, tanto desde el punto de vista experimental como crítico. Para ello, participarán activamente durante todas las etapas de proyecto, tanto en la puesta a punto de las distintas metodologías como en las distintas instancias de discusión y evaluación de los resultados obtenidos.

Como resultados de este proyecto esperamos contribuir a establecer cuál es la situación actual desde el punto de vista microbiológico en las diferentes etapas del proceso de secado de leche entera en polvo y su evolución a lo largo de la vida útil en diferentes temperaturas de almacenamiento. Se construirá una colección de aislamientos identificados de bacterias formadoras de esporas, aisladas de cada uno de los puntos del proceso y con capacidad probada de producir enzimas proteolíticas, glucolíticas, lipolíticas y fosfolipolíticas, potencialmente deteriorantes del producto final LEP. Además se determinará el efecto sobre diferentes parámetros fisicoquímicos de la concentración de esporas de un aislamiento seleccionado sobre una elaboración de leche UAT realizada utilizando LEP de origen comercial

Metodología/diseño del estudio

Se realizaron cuatro muestreos trimestrales para análisis microbiológico entre octubre de 2021 y octubre de 2022 en cuatro puntos del proceso de secado de leche entera en polvo: leche cruda (LC), leche pasteurizada (LP), Concentrada (C) y leche entera en polvo (LEP). El tiempo de la leche cruda en el silo fue de aproximadamente 24 h desde su recibo antes de su procesamiento y el tiempo de elaboración al momento de obtener las muestras fue de 2 h en todos los casos. Las condiciones de pasteurización fueron de 74-76 °C/15s y todas las muestras dentro del proceso corresponden a un mismo silo de origen. Además se estudió la evolución de la población de esporulados con el tiempo mediante muestreo microbiológico del producto final (LEP) cada 6 meses durante 24 meses (vida útil del producto) en muestras provenientes de un mismo lote y envasadas en condiciones de atmósfera inerte (N₂) para 2 temperaturas de almacenamiento (25 °C y 35 °C).

La población de aerobios mesófilos y termófilos se analizó mediante recuento en placa (TSA, 30 °C/ 72 h) (ISO 4833, 2013) y 55 °C/ 24 h, respectivamente (Ronimus et al., 2006). Para el recuento de esporas aerobias mesófilas y termófilas, previo a la siembra, la muestra se sometió a tratamiento térmico extremo (80 °C/10 min.) y luego se sembró en TSA/ 32 °C/48 h, o 55 °C/24 h respectivamente (Ronimus et al., 2006). Las bacterias esporuladas anaerobias mesófilas y termófilas se cuantificaron en tubos con medio reforzado para clostridios (RCM) sellados con parafina y calentados (80 °C/10 min). Posteriormente se incubaron a 37 °C y a 55 °C/ 7 días respectivamente (André et al., 2013). Los aislamientos que se obtuvieron de los tubos positivos por formación de gas, se sembraron mediante estriado en agar RCM (Jonsson, 1990) y se incubaron a 37 °C/ 72 h en anaerobiosis. Para todos los aislamientos se realizó su caracterización fenotípica y los aislamientos puros se conservaron en TSA o RCM con glicerol (15 %), según el caso, a -80 °C para identificación adicional (Bermúdez et al., 2016).

Las actividades enzimáticas proteolítica, lipolítica, lecitinasa y glucolítica como potenciales agentes de deterioro se evaluó mediante utilización de medios selectivos (Mehta et al., 2019): actividad proteolítica: PCA y 10 % de LDRE; lipolítica: PCA y 1% de tributirina; lecitinasa: PCA y 8 % de yema de huevo; y por último galactosidasa: agar brain heart infusion

(BHI), suplementado en superficie con X-gal/ IPTG. Las placas se incubaron a 37 °C/ 72 h, en aerobiosis o anaerobiosis, según correspondiera a las condiciones del aislamiento y las actividades enzimáticas se evaluaron en forma cualitativa. Para la identificación genética, los cultivos puros en medio líquido (TSB ó RCM) se centrifugaron (10000 rpm, 10 min., TA) y se extrajo el ADN del pellet mediante kit comercial (ZymoResearch™ para hongos y procariotas). El ADN extraído mediante kit fue corroborado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en buffer TAE 1X conteniendo 3 a 5 µL de Good View (100V/25 min).

Los cebadores fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rd1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') se utilizaron para amplificar un fragmento de 1540 bp del gen 16S ARNr (Weisburg et al., 1991) en las siguientes condiciones: desnaturalización (94 °C/ 7 min.), 35 ciclos de: 94 °C/1 min; 56 °C/1 min. y 72 °C/ 1 min. y final de 10 min. (Weisburg et al.,1991). Al finalizar cada corrida de PCR se analizó el ADN mediante electroforesis en geles de agarosa para la confirmación la amplificación. Los productos de amplificación se enviaron para su secuenciación a servicio externo (MacroGen Sequencing Service). Las secuencias obtenidas se compararon con el banco de datos NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Con el fin de evaluar la presencia de especies diferentes previo a su secuenciación, y de cepas, se utilizó RAPD-PCR para amplificación de fragmentos al azar a partir del cebador OPR13 (5'GGACGACAAG-3') según Rominus et al., (1997) en las siguientes condiciones luego de su puesta a punto: desnaturalización a 94 °C/3 m. 45 s. y luego 35 ciclos de hibridación y amplificación de 94 °C/15 s, 36 °C /15 s, 72 °C/ 2 m., 72 °C/ 4 m. finalizando a 4 °C. Al finalizar cada corrida de PCR se analizó el ADN mediante electroforesis en geles de agarosa (1.5% en solución tampón TAE 1X) , 90 min /75 mV para la confirmación la amplificación.

Posteriormente se evaluó el efecto de liberación de enzimas sobre diferentes propiedades tecnológicas en LEP reconstituida e inoculada con diferentes cargas microbianas y luego sometida a un tratamiento UHT a escala piloto. Para ello se obtuvo un cultivo puro joven (18 h, 37 °C) en BHI de un aislamiento seleccionado por mayor frecuencia y capacidad de alteración, se plaqueó en botellas de cultivo estériles conteniendo TSA /0.05 mg/L de Mn y se incubó 72 h./37 °C hasta una esporulación del 90 %. Las esporas se cosecharon con NaCl (0.85 %) y esferas de vidrio estériles. La suspensión obtenida se sometió a tratamiento térmico (10 min. a 80 °C) para eliminar las formas vegetativas, se centrifugaron (20 min / 4000xg /5 °C), lavaron con agua destilada estéril, cuantificaron y conservarán (NaCl, 0.85 % y 4 °C) hasta su utilización (López-Pedemonte et al., 2003). Se prepararon 3 réplicas de 1500 mL cada una para las condiciones: control LEP reconstituida al 10 % p/v), condición B (LEP reconstituida al 10 % e inoculada con una carga final de 102 esporas /mL) y condición A (LEP reconstituida al 10 % e inoculada con una carga final de 104 esporas /mL) y se sometieron a un tratamiento de UHT (137 °C/7s) según Wang et al (2022) con un precalentamiento previo. Se utilizó un caño de acero inoxidable de 12 m, y 3.5 *10⁻⁶ m² de sección, y se ajustaron las condiciones de la bomba para fijar el caudal en 356 mL/min. Las muestras se almacenaron en recipientes estériles de 100 mL y se incubaron en temperatura controlada de 25 °C, simulando una condición de almacenamiento convencional en galpones, en ausencia de luz (Richards et al, 2016). Para todas las réplicas de control B y A se realizó cada 15 días el recuento de vegetativos aerobios totales y esporulados mesófilos totales, pH, acidez (°D), color, proteólisis, lipólisis, composición de las muestras UHT en lactosa, caseína y proteína, gelación y viscosidad.

El pH se determinó mediante uso de pHmetro y la acidez se determinó mediante titulación ácido-base utilizando ácido oxálico como patrón primario y fenolftaleína como indicador.

El color se determinó utilizando un colorímetro Kónica Minolta CR410, y los parámetros de color se expresaron según el sistema CIELAB, con iluminante D65 y un ángulo visual de 0°. Los componentes que aplican al espacio de color de este sistema son L* (negro: L* 0 y blanco: L* 100), a* (rojo-verde: negativo a* verdoso y positivo a* enrojecimiento) y b* (amarillo-azul: negativo b* azul y amarillo b* positivo) (McGuire, 1992). Las mediciones se realizaron por duplicado y considerando un volumen fijo de 20 mL. La diferencia de color total (ΔE) se determinó según Baldevbhai & Anand (2012).

La actividad proteolítica se cuantificó mediante el método del orto-ftaldehído (OPA), según Perucho et al. (2015), con modificaciones mediante determinación fluorimétrica utilizando lector de placa multipocillo Varioskan® y se expresó en función de la calibración realizada con glicina.

La solución de OPA se preparó disolviendo 32 mg de OPA (O-ftaldialdehído para fluorometría, Merck, Japón) en 0.8 mL de metanol puro (J.T.Baker Fisher Scientific, Waltham, MA) y mezclando esta solución con 7,14 µL solución amortiguadora 0.4 M y pH 9.5 de tetraborato de sodio de sodio decahidratado (99,5% Acros Organic, Fisher Scientific), 60 µL de 2-mercaptoetanol (Applichem Panreac, Darmstadt, Hesse, Alemania) y 7,1 µL de solución SDS al 10% (p/v) (Merck, Darmstadt, Hesse, Alemania). El ensayo consistió en mezclar 20 µL de solución de OPA con 40 µL de solución de muestra (1% p/v), y luego de transcurrido 1 min agregar 10 µL de ácido acético (Macron Fine Chemicals). La medida se realizó a 240 nm λ_{ex} y 450 nm λ_{em} luego de 1 min de incubación a temperatura ambiente. Se construyó una curva estándar en un rango de 1 a 45 mg/Ll con agua milli-Q, utilizando L-glicina como patrón a partir de una solución stock inicial de 45 mg/mL

La actividad lipolítica cualitativa se determinó mediante titulación de ácidos grasos libres (AGL) con NaOH (0.1 N)

(IDF,1989) previa extracción de materia grasa. El contenido de AGL será expresado como porcentaje de ácido oleico según ecuación presentada por De Jonghe (De Jonghe et al., 2010).

La composición de la leche para las réplicas de control, B y A se realizó mediante determinaciones por espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) utilizando un equipo MilkoScan™ FT3.

Las determinaciones de viscosidad y gelación se realizaron en un reómetro Anton Paar MCR 301. Para la determinación de viscosidad se utilizó una geometría de círculo concéntrico PP30/P2, y se obtuvieron los registros durante 60 s. a 30 °C. Para la determinación de gelación se utilizó una geometría ST22-4V-16 y se obtuvieron los registros durante 300 s a 30 °C (Sandra et al. 2011).

El análisis estadístico de los datos se realizó aplicando análisis de varianza (ANAVA). Para ello, se utilizó el software estadístico Infostat® (Universidad Nacional de Córdoba) que permita realizar esta prueba de acuerdo con el diseño experimental planteado aplicando un p valor < 0.05.

Resultados, análisis y discusión

A partir de las poblaciones de esporas se obtuvieron 355 aislamientos Gram positivos. Se obtuvieron aislamientos cultivables para las poblaciones de EAM, EAT y EAnM. Para EAnT sólo se informó recuento de de 7.4 NMP/mL en uno de los muestreos para LEP.

La población de formas vegetativas mesófilas dentro del proceso mostró una disminución significativa en LC en relación al punto C ($6.67 \pm 0.76 \log_{10}$ UFC/mL y $2.83 \pm 1.24 \log_{10}$ UFC/mL, respectivamente).

No se observó diferencia en los recuentos entre LP y producto final lo que indica una recuperación de la población hacia el final del proceso posiblemente debido a la presencia de alguna fuente de contaminación interna como presencia de biofilms o esporas adheridas por hidrofobicidad, promoviendo un aumento de formas vegetativas mesófilas entre el concentrado y el producto final (Cho et al.,2018). Entre ambas etapas, además, se ubica el secado por lecho fluido, sin embargo este punto no fue muestreado por temas técnicos de la empresa y podría explicar en parte el incremento observado. La población de esporas aerobias termófilas, por su parte, no mostró variaciones significativas durante el proceso.

Se observaron diferencias en el recuento de formas vegetativas y esporas mesófilas en LC ($6.54 \pm 0.76 \log_{10}$ UFC/mL vs $2.03 \pm 0.22 \log_{10}$ UFC/mL, respectivamente), esperable debido a que la mayor de microorganismos vegetativos presentes en LC no poseen la capacidad de formar esporas (ej. coliformes y hongos). Luego de la pasteurización se registró un incremento de esporas que igualó a la población de formas vegetativas que se mantuvo hasta el final del proceso. Esto podría ser debido a la presencia de esporas que sobreviven al proceso y germinan, ya que se entiende que las vegetativas no esporulantes disminuyen su recuento en la etapa de pasteurización o se eliminan completamente durante la concentración por no presentar estructuras de resistencia que les permitan sobrevivir a las condiciones extremas de proceso (Eijlander et al., 2019)

En relación al recuento de termófilos para cada etapa, no se observaron diferencias entre ambas poblaciones VAT y EAT ni entre ni dentro de cada etapa del proceso.

El estudio de poblaciones de esporas mesófilas y termófilas dentro de cada etapa, mostró diferencias dentro de LC y LP, siendo mayor el recuento de EAM (2.05 ± 0.15 y $2.1 \pm 0.4 \log_{10}$ UFC/mL, respectivamente) sobre EAT (1.1 ± 0.1 y $1.6 \pm 0.1 \log_{10}$ UFC/mL, respectivamente).Durante el proceso la población de esporas mesófilas mostró un recuento constante, mientras que la de termófilas aumentó hacia producto final en relación a LC y LP, posiblemente debido a una capacidad de germinación y esporulación de EAT, que se encuentra favorecida por las condiciones térmicas del proceso.

Se realizó recuento y aislamiento de la población total de esporas cada 6 meses en LEP provenientes de un mismo lote de elaboración e incubadas a 25 °C y 35 °C. Se obtuvieron 72 aislamientos Gram positivos.

No se observó variación en el recuento de EAM durante la vida útil con independencia de la temperatura de incubación siendo $2.5 \pm 0.2 \log_{10}$ UFC/mL a 25 °C y $2.5 \pm 0.3 \log_{10}$ UFC/mL a 35°C. Por su parte la población de EAT mostró un comportamiento similar para ambas temperaturas con recuentos de $2 \log_{10}$ UFC/mL hasta los 12 meses de incubación, no recuperándose colonias en posteriores muestreos. Para EanM y EAnT sólo se obtuvieron recuentos de 20 y 11 NMP/mL para el muestreo inicial.

Esta primera aproximación muestra que la población de esporas disminuye con el tiempo volviéndose 0 para las especies anaerobias y termófilas, pero prevaleciendo en el caso de aerobios mesófilos, por lo que es importante profundizar en su identidad y capacidad de deterioro considerando que, en caso de obtenerse un producto con mayor recuento de EAM, éste permanecerá prácticamente inalterable durante su vida útil (Mc Hugh et al., 2017).

Para todos los aislamientos se determinó la presencia de actividad proteolítica, lipolítica, lecitinasa y β -galactosidasa mediante utilización de medios diferenciales.

Para la población de EAM, la actividad proteolítica fue mayoritaria (50.5 %), seguida por lecitinasa (26.06 %), lipolítica (13.3

%) y finalmente β -galactosidasa (10.3 %). Un comportamiento similar se observó para la población de EAT donde la actividad proteolítica (42.42 %) fue seguida por la actividad lecitinasa (24.24 %), aunque en este caso la actividad β -galactosidasa (26.52 %) superó a la lipolítica (6.82 %). Los aislamientos anaerobios mesófilos no crecieron en los medios diferenciales por lo que no pudieron ser evaluados.

Para la población de EAM se observó un predominio en LC de aislamientos con 2 y 3 actividades, sobre aquellos con 1 y 4 actividades. En la etapa de pasteurización predominaron aislamientos con 1 actividad (siempre proteolítica), mientras que en C aumentan los que presentaron 2 y 3 actividades y se recuperaron los de 4 actividades que, si bien fueron aislados en LC, no se recuperaron en LP. Este aumento en la capacidad de deterioro (2, 3 y 4 actividades) de los aislamientos podría deberse a la ocurrencia de una contaminación en C (Cho et al.; 2018). En LEP se observó una presencia similar de aislamientos con hasta 3 actividades.

Por su parte las EAT en LC presentaron un número similar de aislamientos con 1,2 y 3 actividades y menor para 4 actividades. En LP predominaron los aislamientos con 2 actividades y hacia el final se seleccionaron aquellos con mayor capacidad potencial de deterioro (2, 3 y 4 actividades).

En el ensayo de incubación a 25 y 35 °C durante la vida útil hasta los 6 meses sólo se recuperaron aislamientos con actividad proteolítica, pero al transcurrir el tiempo se seleccionaron aquellos con 2 y 3 actividades enzimáticas, siendo la proteolítica la de mayor frecuencia, seguida por β -galactosidasa y lecitinasa.

El ADN de los aislamientos obtenidos para el primer (65) y tercer muestreo (65) fue amplificado utilizando el par de primers rD1 y fD1, secuenciado e identificado utilizando la base de datos BLAST (NIH). Los correspondientes al segundo (109) y cuarto (84) muestreo fueron inicialmente amplificados mediante RAPD PCR con oligoprimero OPR13 (5'GGACGACAAG-3') para eliminar presencia de clones. De este modo se obtuvieron 75 perfiles que se amplificaron para su identificación por 16S. Hasta el momento se identificó el 80% del total de aislamientos, debiéndose repetir el proceso para los que no han podido ser identificados. Se obtuvo un total de 20 especies, siendo la más frecuente *Bacillus licheniformis* (65.8 %) seguida por *B. pumilus* (6.3 %) y *B. aerius* (5.4 %), en concordancia con lo obtenido para únicamente LEP en estudios realizados por Reginensi et al. (2011) en Uruguay.

Se obtuvieron aislamientos de *B. cereus*, especie importante por su doble rol como microorganismo alterante y como patógeno, aunque en baja frecuencia. El grupo *B.cereus sensu lato* es extenso y difícil de discriminar mediante 16S por lo que se requerirá de una identificación más precisa para determinar la especie. Se estudió el perfil de cepas (F1, F2 y G) para los aislamientos identificados como *B. licheniformis* mediante RAPD-PCR para conocer su frecuencia dentro del proceso y su perfil enzimático. De acuerdo con lo ya observado por González et al. (2016) para LPE en Uruguay, se obtuvo mayoritariamente la cepa F2 (55%), seguida por F1 (45%), no observándose en este caso la presencia de la cepa G.

Para el estudio del efecto de la concentración de esporas sobre propiedades tecnológicas de la leche LEP reconstituida, inoculada y sometida a un tratamiento UAT, se seleccionó un aislamiento de *B.licheniformis* cepa F2 con actividad proteolítica, lipolítica y β -galactosidasa proveniente del punto C. Para ello se obtuvo un inóculo concentrado de esporas de 7×10^{11} esporas/mL. La LEP se preparó en un 10% p/v a partir de un stock obtenido en anaquel con 1 mes de elaborada para minimizar un posible deterioro de la muestra de partida.

Se inocularon 102 esporas/mL y 104 esporas/ mL en batch de 1500 mL de LEP reconstituida por triplicado y un control sin inoculación. Se realizó el recuento de esporas mesófilas (activadas a 80°C/10 min) previo y posterior al proceso. Los recuentos previos coincidieron con lo inoculado obteniéndose un promedio de 2×10^4 y 3×10^2 esporas/mL para las muestras A (alta carga) y B(baja carga), respectivamente. No se obtuvieron recuentos para ninguna de las condiciones entre 0 y 30 días de incubación. Esto podría deberse a una destrucción completa de la cepa inoculada, ya que si bien se han reportado cepas de *B. licheniformis* capaces de sobrevivir al proceso de UAT, en este caso eso no ocurrió.

El valor de pH para control, A y B previo al tratamiento térmico fue 6.65 ± 0.05 y las réplicas de control fueron estables (etanol 68 °C, acidez e incubación a 37 °/7 días), obteniéndose valor normal de acidez (9.91 °D) y ausencia de grumos.

Se realizaron análisis de color, pH y acidez, gelación, viscosidad, composición en lactosa, proteína y caseína y proteólisis, quedando aún por cuantificar la lipólisis.

La diferencia de color (ΔE) en leche UHT almacenada a 20 °C durante 24 semanas no debe exceder el valor de 2.3 para que sea imperceptible por parte del consumidor (Sunds et al, 2018). En este caso el almacenamiento durante 30 días a 25 °C mostró un ΔE en las réplicas control de 1.45, mientras que para la leche conteniendo una carga baja de esporas (B) fue de 3.59 y para una carga alta 4.8, lo que indica un cambio de color perceptible y rechazado por el consumidor. Este cambio se observó a partir de los 15 días, permaneciendo en valores aceptables hasta ese momento: ΔE de 0.62 y 0.78 para B y A.

El pH de la leche UAT normalmente es de 6.68 (0.02), siendo en este caso levemente superior: 6.85 (0.05). La leche UAT con 8 meses de vida útil tiene un pH de 6.45. En este estudio el pH de las muestras A y B fue de 6.35 y 6.58, respectivamente. Esto se asocia a un aumento en compuestos de Maillard que generan un oscurecimiento de la leche (Richard, et al. 2016) y que podría traducirse en mayor sedimentación y gelación de la leche (Li et al.; 2021). Es por eso que se monitoreó la

presencia de gel para todas las condiciones entre 0 y 30 días no registrándose eventos de gelificación en ninguna de las muestras. En relación a la viscosidad tampoco se observó un aumento durante el período evaluado. La viscosidad reportada para leche UHT es de 3 mPa.s-1 y en este caso se obtuvo un valor de entre 2.4 y 2.7 mPa.s-1 para todas las condiciones ensayadas (Datta, N. & Deeth, H. (2003). Tampoco se observaron variaciones en la composición de lactosa, glucosa, galactosa y proteína para la leche UAT control, A y B durante el período evaluado determinada mediante FTIR. Por otra parte, la presencia de enzimas resistentes al proceso de UAT, tanto endógenas (plasmina) como exógenas (proteasas de origen bacteriano) contribuyen a la formación de gel (Vaghela, et al. 2017). La proteólisis a partir de enzimas bacterianas de la leche UAT puede dar como resultado la gelificación de la leche UHT mediante la hidrólisis de las caseínas y la liberación del complejo κ -lactoglobulina / κ -caseína que se forma durante el tratamiento térmico (Richads et al., 2016). La proteólisis en este caso se determinó mediante fluorescencia utilizando el reactivo OPA, no observándose diferencias en los 30 días para las condiciones ensayadas, lo que se corresponde con la ausencia de gelificación observada hasta el momento. Tampoco se observaron variaciones en la composición de lactosa, glucosa, galactosa y proteína para la leche UAT control, A y B durante el período evaluado determinada mediante FTIR.

Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones y recomendaciones

Se observó una selección de aislamientos con mayor capacidad de deterioro y resistencia a altas temperaturas a lo largo del proceso de elaboración de la leche entera en polvo que llegó hasta el producto final.

A diferencia de los trabajos realizados por Reginensi et al (2011), en este caso no se obtuvieron especies termófilas estrictas, aunque se observó un aumento de esporas con resistencia a altas temperaturas provenientes de especies mesófilas con capacidad termófila facultativa pertenecientes al género *Bacillus*, principalmente *B. licheniformis*.

La leche entera en polvo puede ser utilizada como ingrediente lácteo para la elaboración de leche UAT o quesos, principalmente en países con bajo nivel de desarrollo y la presencia de especies de anaerobios esporulados, en particular *C. tyrobutyricum* es capaz de producir efectos notorios de hinchazón tardía con un recuento de 1×10^4 esporas/mL. En este caso la frecuencia y recuento de esporas anaerobias fue bajo por lo que no serían una amenaza en caso de ser utilizada para la elaboración de queso, y tampoco fue identificada esta especie.

Los recuentos de formas vegetativas fue similar al de esporas de aerobios mesófilos luego de la etapa de pasteurización, lo que indica que su origen podrían deberse a contaminación proveniente de la formación de biopelículas (o biofilms) durante la etapa de concentración, o de la etapa de atomización, mediante adherencia de las esporas a la superficie de acero inoxidable por hidrofobicidad.

Las actividades proteolítica y lecitinasas fueron las más frecuentes en los aislamientos de esporas, seguidas por la actividad galactosidasa y lecitinasas. Los aislamientos con mayor presencia de actividades enzimáticas se obtuvieron dentro del proceso en el punto de concentración, y durante el ensayo de vida útil a dos temperaturas de incubación se seleccionaron y permanecieron durante el período de 24 meses evaluado.

En cuanto a la identidad de los aislamientos se observó un predominio de la cepa F2 de *B. licheniformis*. Esta especie y cepa se encontró siempre presente en los aislamientos en condiciones tanto mesófilas como termófilas y presentó una alta capacidad potencial de deterioro, ya que los aislamientos con 2,3 o 4 actividades en la mayoría de los casos pertenecían a ella.

Al estudiar el efecto de la concentración de esporas de *B. licheniformis* (cepa F2) sobre LEP reconstituída, inoculada y sometida a tratamiento UAT, sólo se observaron diferencias en relación al color entre el control y las muestras, que se puede atribuir a algún efecto debido a la presencia de esporas con independencia de su carga. Sin embargo, el hecho de que no se haya obtenido crecimiento durante la incubación indica que, si bien existen reportes de que algunos aislamientos de *B. licheniformis* son capaces de sobrevivir al tratamiento UAT, este no fue el caso, por lo que el efecto observado sobre el color podría atribuirse a otros factores que se deberán estudiar más en detalle. Se plantea continuar con este estudio previa evaluación de la sobrevivencia de otros aislamientos que también fueron seleccionados como posibles candidatos.

Los resultados obtenidos en este proyecto permitieron caracterizar la frecuencia y diversidad de la población en los diferentes puntos dentro del proceso de elaboración de LEP. Son un punto de partida para profundizar en el estudio ecológico de la especie *B. licheniformis* de forma de establecer lineamientos para la implementación de ciclos de trabajo y

limpieza eficaces y que permitan minimizar la presencia de esta especie, generando un producto de mayor calidad asociada además a la inocuidad.

Referencias bibliográficas

- André, S., Zuber, F., & Remize, F. (2013). Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-year survey. *International Journal of Food Microbiology*, 165(2), 134–143.
- Aouadhi, C., Rouissi, Z., Kmiha, S., Mejri, S., & Maaroufi, A. (2016). Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus sporothermodurans* spores to nisin and heat. *Food Microbiology*, 54, 6–10.
- Baldevbhai, P.J. and Anand, R. (2012) Color Image Segmentation for Medical Images Using L* a* b* Color Space. *IOSR Journal of Electronics and Communication Engineering*, 1, 24-45. <https://doi.org/10.9790/2834-0122445>
- Bermúdez, J., Gonzalez, M. J., Olivera, J. A., Burgueña, J. A., Juliano, P., Fox, E. M., & Reginensi, S. M. (2016). Seasonal occurrence and molecular diversity of clostridia species spores along cheesemaking streams of 5 commercial dairy plants. *J. Dairy Sci*, 99, 3358–3366.
- Bursová, S., Necidová, L., & Harustiaková, D. (2018). Growth and toxin production of *Bacillus cereus* strains in reconstituted initial infant milk formula. *Food Control*, 93. Catarino, I., Martins, A. P. L., Duarte, E., Schwinden, E., Norberta, M., & Pinho, D. (2013). Rennet coagulation of sheep milk processed by ultrafiltration at low concentration factors. *Journal of Food Engineering*, 114(2), 249–254.
- Cho, T. J., Kim, H. W., Kim, N. H., Park, S. M., Kwon, J. Il, Kim, Y. J., Rhee, M. S. (2018). New insights into the thermophilic spore-formers in powdered infant formula: Implications of changes in microbial composition during manufacture. *Food Control*, 92(May), 464–470. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.036>
- De Jonghe, V., Coorevits, A., De Block, J., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Herman, L., Heyndrickx, M. (2010). Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 136(3), 318–325.
- Eijlander, R. T., van Hekezen, R., Bienvenue, A., Girard, V., Hoornstra, E., Johnson, N. B., Wells-Bennik, M. H. J. (2019). Spores in dairy – new insights in detection, enumeration and risk assessment. *International Journal of Dairy Technology*, 72(2), 303–315.
- Flint, S., Bremer, P., Brooks, J., Palmer, J., Sadiq, F. A., Seale, B., Md Zain, S. N. (2020). Bacterial fouling in dairy processing. *International Dairy Journal*, 101.
- González, M. J., Gorgoroso, F., Reginensi, S. M., Olivera, J. A., & Bermúdez Address, J. (2013). Polyphasic identification of closely related *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from dairy farms and milk powder. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*, 2(5), 2326–2331.
- Heini, N., Stephan, R., Ehling-schulz, M., & Johler, S. (2018). Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from powdered food products. *International Journal of Food Microbiology*, 283(January), 59–64.
- Jonsson, A. (1990). Enumeration and confirmation of *Clostridium tyrobutyricum* in silages using neutral red, D-cycloserine, and lactate dehydrogenase activity. *J Dairy Sci*, 73(3), 719–725.
- Karaca, B., Buzrul, S., & Coleri Cihan, A. (2019). Anoxybacillus and Geobacillus biofilms in the dairy industry: effects of surface material, incubation temperature and milk type. *Biofouling*, 35(5).
- Lagrange, V., Whitsett, D., & Burris, C. (2015). Global Market for Dairy Proteins. *Journal of Food Science*, 80.
- Li, F., Hunt, K., Buggy, A. K., Murphy, K. M., Ho, Q. T., O'Callaghan, T. F., Tobin, J. T. (2020). The effects of sequential heat treatment on microbial reduction and spore inactivation during milk processing. *International Dairy Journal*, 104.
- Li, F., Hunt, K., Van Hoorde, K., Butler, F., Jordan, K., & Tobin, J. T. (2019). Occurrence and identification of spore-forming bacteria in skim-milk powders. *International Dairy Journal*, 97, 176–184.
- Li, S., Ye, A., & Singh, H. (2021). Physicochemical changes and age gelation in stored UHT milk: Seasonal variations. *International Dairy Journal*, 118, 105028. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105028>
- López-Pedemonte, T. J., Roig-Sagués, A. X., Trujillo, A. J., Capellas, M., & Guamis, B. (2003). Inactivation of spores of *Bacillus cereus* in cheese by high hydrostatic pressure with the addition of nisin or lysozyme. *Journal of Dairy Science*, 86(10), 3075–3081.
- McGuire, R.G. (1992) Reporting of Objective Color Measurements. *HortScience*, 27, 1254-1255.
- McHugh, A. J., Feehily, C., Hill, C., Cotter, P. D., & Turner, M. (2017). Detection and Enumeration of Spore-Forming Bacteria in Powdered Dairy Products. *Frontiers in Microbiology*, 8(January), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00109>
- Mehta, D. S., Metzger, L. E., Hassan, A. N., Nelson, B. K., & Patel, H. A. (2019). The ability of spore formers to degrade milk proteins, fat, phospholipids, common stabilizers, and exopolysaccharides. *Journal of Dairy Science*, 102(12), 10799–10813.
- Moejes, S. N., & Boxtel, A. J. B. Van. (2017). Energy saving potential of emerging technologies in milk powder production. *Trends in Food Science & Technology*, 60, 31–42.

- Perucho, J., Gonzalo-Gobernado, R., Bazan, E., Casarejos, M. J., Jiménez-Escrig, A., Asensio, M. J., & Herranz, A. S. (2015). Optimal excitation and emission wavelengths to analyze amino acids and optimize neurotransmitters quantification using precolumn OPA-derivatization by HPLC. *Amino Acids*, 47(5), 963–973. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1925-1>
- Reginensi, S. M., González, M. J., Olivera, J. A., Sosa, M., Juliano, P., & Bermúdez, J. (2011). RAPD-based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk. *International Journal of Food Microbiology*, 148(1), 36–41.
- Richards, M., Buys, E. M., & De Kock, H. L. (2016). Survival analysis, consumer perception and physico-chemical analysis of low fat UHT milk stored for different time periods. *International Dairy Journal*, 57, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.02.037>
- Ronimus, R. S., Parker, L. E., & Morgan, H. W. (1997). The utilization of RAPD-PCR for identifying thermophilic and mesophilic *Bacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 147(1), 75–79. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(96\)00507-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(96)00507-1)
- Ronimus, R. S., Rueckert, A., & Morgan, H. W. (2006). Survival of thermophilic spore-forming bacteria in a 90+ year old milk powder from Ernest Shackleton's Cape Royds Hut in Antarctica. *The Journal of Dairy Research*, 73(2), 235–243.
- Sadiq, F. A., Flint, S., & He, G. (2018). Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria. *International Dairy Journal*, 85, 159–168.
- Sunds, A. V., Rauh, V. M., Sørensen, J., & Larsen, L. B. (2018). Maillard reaction progress in UHT milk during storage at different temperature levels and cycles. *International Dairy Journal*, 77, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.08.008>
- Tilocca, B., Costanzo, N., Morittu, V. M., Spina, A. A., Soggiu, A., Britti, D., Piras, C. (2020). Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. *Journal of Proteomics*, 210(July 2019).
- Vaghela, K. D., Chaudhary, B. N., & Mehta, B. M. (2018). A Review on Proteolysis Rate in UHT Milk: Its Mechanism, Pattern, Assessment and Enzymatic Changes during Storage. *Research & Reviews: Journal of Dairy Science and Technology*, 6(3), 1–16. Retrieved from <http://sciencejournals.stmjournals.in/index.php/RRJoDST/article/view/134>
- Wang, Y., Deng, Y., Sun, J., Cai, W., & Han, X. (2022). The effect of extracellular protease secreted by *Pseudomonas fluorescens* W3 on the quality of UHT milk, (April), 1–9. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16660>
- Wedel, C., Wenning, M., Dettling, A., Scherer, S., & Hinrichs, J. (2019). Resistance of thermophilic spore formers isolated from milk and whey products towards cleaning-in-place conditions: Influence of pH, temperature and milk residues. *Food Microbiology*, 83(November 2018), 150–158.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703.
- Westergaard, V. (2001). *Tecnología de La Leche en Polvo – Evaporación y Secado por Atomización*, 166.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional. (CC BY-NC-SA)