

LA UNIVERSIDAD DEL ZULIA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN E INDUSTRIA ANIMAL
CÁTEDRA DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA LECHE

INTRODUCCIÓN AL CONTROL DE CALIDAD DE LA LECHE CRUDA
GUÍA PRÁCTICA

MARACAIBO, 2003

Introducción

La calidad de la leche comercial y de sus derivados elaborados en una industria láctea, depende directamente de la calidad del producto original o materia prima, proveniente de las zonas de producción y de las condiciones de transporte, conservación y manipulación en general hasta la planta. Por lo tanto, el éxito y buen nombre de la industria y en última instancia la calidad del producto que llega al consumidor, dependen del control que se lleve sobre la leche cruda.

En la presente guía se incluyen algunas de las pruebas más comúnmente empleadas en las industrias lácteas con el propósito de establecer la calidad sanitaria. De estas pruebas, unas pueden realizarse en el campo o en la receptoría de la planta; tal es el caso de las determinaciones de temperatura, caracteres organolépticos, lactofiltración y de la prueba lactométrica (peso específico), mediante las cuales es posible reconocer algunas leches inaceptables, evitando que dañen la leche de buena calidad al mezclarse en camiones cisternas o en los tanques de almacenamiento. Otras, como la prueba del alcohol, las determinaciones de acidez, pH y las basadas en la reducción de colorantes, son realizadas en un laboratorio con el objeto de determinar la calidad de leches sospechosas o como técnicas rutinarias de control.

A las referidas pruebas de calidad sanitarias es necesario sumar las determinaciones de adulteraciones como la adición de inhibidores o la adición de agua, a veces enmascarada por la adición de cloruros y otros sólidos; la medición del contenido de grasa total, sólidos totales y otros análisis químicos o microbiológicos que requieren de equipos especiales y personal más especializado. Estas determinaciones serán consideradas en secciones prácticas posteriores.

Objetivos

- Analizar la importancia del control de la calidad de la leche cruda como materia prima de la Industria láctea.
- Reconocer las pruebas que determinan la aceptación o rechazo de la leche cruda en la industria láctea.
- Aplicar las pruebas utilizadas para determinar indirectamente la calidad sanitaria de la leche cruda.
- Interpretar los resultados del análisis aplicado en la recepción de leche cruda a nivel de planta.

Toma de la Muestra

Para obtener buenos resultados es requisito indispensable tomar muestras que sean verdaderamente representativas del producto a analizar y con una frecuencia tal, que permita establecer si el producto cumple o no con los requisitos mínimos impuestos por la planta o los reglamentos.

Las llamadas pruebas de recepción o de plataforma se realizan directamente sobre la leche cruda bien mezclada y sin mayor preparación. Pero para las pruebas de laboratorio es indispensable seguir ciertas pautas que permitan tomar la muestra en forma representativa y conservarla de manera adecuada hasta su análisis. (AOAC, 1981; APHA, 1979; MIF, 1964). En Venezuela, el muestreo debe hacerse según la norma COVENIN 938-83, la cual especifica el procedimiento para cada producto lácteo.

La muestra debe ser tomada por una persona sana, capacitada y autorizada, preferiblemente por triplicado. La cantidad de leche necesaria para un análisis corriente, desde el punto de vista físico-químico es de 200-500 mL, mientras que para un análisis microbiológico bastan 150 mL. La leche no debe estar congelada, debe mezclarse bien durante el muestreo, pasándola 3 o 4 veces consecutivamente de un recipiente a otro. Si se encuentra en recipientes muy grandes, en camiones o tanques de almacenamiento; debe agitarse en forma completa, manteniendo la agitación por 30 segundos. Si se observa la nata separada, la agitación debe continuarse suavemente hasta que se distribuya uniformemente, sin dejar partículas visibles. Seguidamente se puede determinar la temperatura. La muestra debe ser colectada con probadores adecuados como el cucharón, el tubo de muestreo o frascos especiales y transferirla a un recipiente apropiado, limpio y seco, debidamente rotulado para la identificación posterior.

Cuando el análisis no ha de efectuarse inmediatamente después de tomar la muestra, ésta debe guardarse en un recipiente estéril, herméticamente cerrado y protegido contra contaminaciones, bien identificado, y mantenido a una temperatura de 0 a 5 °C (sin congelar). Si la muestra ha de transportarse, el recipiente debe llenarse completamente. Estas muestras deben analizarse con prontitud pero si el análisis ha de hacerse después de 4 horas, es necesario anotar en el informe de laboratorio la hora del muestreo y la hora del análisis.

En caso de que resulte prácticamente imposible tomar muestras de cada lote de leche enviado por un determinado productor durante cierto tiempo, se procederá a tomar una "muestra compuesta", es decir aquella que esta integrada por una mezcla de pequeñas porciones representativa de cada lote, de un volumen proporcional a los mismos, cada una no menor de 10 mL. La muestra compuesta total no debe ser menor de 150 mL, recolectados durante 10 a 15 días, en porciones de 10 ó 15 mL/día y debe mantenerse bajo refrigeración, adicionada de un preservativo; es frecuente el empleo de tabletas de cloruro de mercurio (sublimado corrosivo) o dicromato potásico en la proporción de una tableta (0,5 g de reactivo) por 250 mL de muestra, o bien formaldehído en la proporción de 0,1 mL (2 gotas) de solución al 36% por cada 30 mL de muestra. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que estos compuestos pueden afectar la determinación de grasa, disminuyendo los resultados. Además si se ha de practicar una determinación de fosfatasa, la muestra solo podrá conservarse con cloroformo como preservativo y el tapón del recipiente debe ser libre de sustancia fenólicas.

Es lógico suponer también, que aquellas muestras que vayan a ser analizadas desde el punto de vista microbiológico, no deben adicionarse ningún preservativo químico, deben guardarse bajo refrigeración y analizarse antes de pasadas las 24 horas. Por otra parte, cuando el muestreo ha de realizarse sobre un número excesivamente grande de muestras y sobre todo, cuando éstas se destruyen, es necesario recurrir a procedimientos de muestreo estadístico como los recomendados por el Departamento de la Defensa de los Estados Unidos (Military Standard Sampling Procedures), algunos aceptados por la norma COVENIN.

Pruebas de Muelle (Plataforma)

Dentro de este grupo estan la determinación de la temperatura, caracteres organolépticos, peso específico y lactofiltración.

Temperatura

La leche cruda, debe ser entregada a la planta en las primeras 2 horas que siguen al ordeño para evitar el rápido crecimiento bacteriano que ocasiona la disminución de su calidad y su rápida descomposición. De lo contrario, la leche debe refrigerarse rápidamente después del ordeño y mantenerse entre 0-5 °C hasta su procesamiento. La determinación de la temperatura de la leche cruda al ser entregada a la planta es por consiguiente, un buen indicio

(aunque no necesariamente) del cuidado que se ha tenido en la granja o durante su transporte para tratar de conservarla en óptimas condiciones.

La determinación de la temperatura adquirió mayor importancia en nuestro medio cuando se implementó el aumento del precio de la leche refrigerada. Actualmente la mayoría de las plantas procesadora solo reciben leche fría. En Venezuela casi todos los vehículos utilizados para el transporte de leche no poseen sistemas de refrigeración, sin embargo los tanques tienen aislantes que permiten conservar la temperatura. No obstante, es normal que durante el trayecto, la leche pierda cierto grado de frío, pero la misma nunca debe llegar a la planta a más de 10 °C.

Para la determinación de la temperatura de la leche deben observarse las siguientes condiciones:

- Los termómetros deben estar debidamente calibrados y graduados de tal manera que cubran aproximadamente de -10 a +100 °C, con divisiones no menores de 1 °C.
- Deben dejarse suficiente tiempo para que la temperatura del termómetro se estabilice a la temperatura del producto y cuando no pueda leerse directamente el termómetro introducido en la muestra, debe retirarse y leerse con rapidez.
- Los termómetros deben estar limpios y libres de contaminación; al hacer la lectura deben insertarse convenientemente en la muestra.
- No debe medirse la temperatura directamente en muestras destinadas a análisis microbiológicos; en este caso, debe hacerse en un recipiente por separado.

La temperatura debe determinarse diariamente en los camiones tanques que llegan, en los tanques de almacenamiento de la planta, en un número representativo de cantaras de cada productor y por lo menos dos veces a la semana en la leche procesada almacenada en las casas y en la que retorna de las rutas de distribución (MYF, 1964).

Caracteres Organolépticos

Textura: La leche tiene una viscosidad de 1,5 a 2,0 centipoises a 20 °C, ligeramente superior al agua (1,005 cp). Esta viscosidad puede ser alterada por el desarrollo de ciertos microorganismos capaces de producir polisacáridos que por la acción de ligar agua aumentan la viscosidad de la leche (leche mastítica, leche hilante).

Color: el color normal de la leche es blanco, el cual se atribuye a reflexión de la luz por las partículas del complejo caseinato-fosfato-cálcico en suspensión coloidal y por los glóbulos de grasa en emulsión. Aquellas leches que han sido parcial o totalmente descremadas o que han sido adulteradas con agua, presentan un color blanco con tinte azulado. Las leches de retención o mastíticas presentan un color gris amarillento. Un color rosado puede ser el resultado de la presencia de sangre o crecimiento de ciertos microorganismos. Otros colores (amarillo, azul, etc), pueden ser producto de contaminación con sustancias coloreadas o de crecimiento de ciertos microorganismos. Una leche adulterada con suero de quesería puede adquirir una coloración amarilla-verdosa debida a la presencia de riboflavina.

Sabor: El sabor natural de la leche es difícil de definir, normalmente no es ácido ni amargo, sino más bien ligeramente dulce gracias a su contenido en lactosa. A veces se presenta con cierto sabor salado por la alta concentración de cloruros que tiene la leche de vaca que se encuentra al final del periodo de lactancia o que sufren estados infecciosos de la ubre (mastitis); otras veces el sabor se presenta ácido cuando el porcentaje de acidez en el producto es superior a 22-33 mL NaOH 0,1 N/100 mL (0,2 - 0,3 % de ácido láctico). Pero en general, el sabor de la leche fresca normal es agradable y puede describirse simplemente como característico.

Olor: El olor de la leche es también característico y se debe a la presencia de compuestos orgánicos volátiles de bajo peso molecular, entre ellos, ácidos, aldehídos, cetonas y trazas de sulfato de metilo. La leche puede adquirir, con cierta facilidad sabores u olores extraños, derivados de ciertos alimentos consumidos por la vaca antes del ordeño, de sustancia de olor penetrante o superficies metálicas con las cuales ha estado en contacto o bien de cambios químicos o microbiológicos que el producto puede experimentar durante su manipulación. Nelson y Trout (1964), describieron 17 diferentes sabores anormales y sugieren una metodología para clasificar la leche según su sabor con un valor máximo de 45 puntos. El cuadro 1 presenta un resumen de su clasificación. Un valor de 31- 40 se estima normal.

A nivel de la planta, la observación de los caracteres organolépticos de la leche constituye una prueba de plataforma que permite la segregación de las leches de peor calidad. La técnica más común consiste en oler el contenido de un recipiente (cantaral o tanque) inmediatamente después de haber sido destapado. Existen personas bien entrenadas que

mediante esta prueba pueden detectar leches que han sido mal refrigeradas, que han estado en contacto con utensilios sucios y hasta leches mastíticas.

En una planta lechera estas características deben determinarse diariamente en cada camión tanque, en cantaras representativas de productores, antes del empaque y después de 24 horas de procesada. En el laboratorio los alumnos estudiarán comparativamente los caracteres organolépticos de varias muestras de leche cruda contenida en pequeños recipientes y de varias muestras de leche pasteurizada de diferentes marcas producidas en la localidad, clasificándolas tomando como base el Cuadro 1 sugerido por Nelson y Trout (1964).

CUADRO 1
Guía General para la Clasificación de la Leche según su Sabor

Clasificación	Puntaje	Descripción del sabor específico
Excelente	40 - 45	Sin criticismo
Buena	38 - 39,5	Sabor ligeramente astringente y salado, carente de frescura, sabor ligero o definido a cocido, a pienso o sin sabor.
Regular	36 - 37,5	Sabor ligeramente a "establo" y oxidado; definitivamente astringente y salado carente totalmente de frescura, pronunciado sabor a cocido o sin sabor .
Pobre	35,5 o menos	Sabor ligero o definido a ácido, rancio y sucio; ligero, definido o pronunciado a "establo", amargo, extraño, a ajo/ cebolla, a malta, metálico; definido o pronunciado a establo y oxidado; pronunciado astringente, a pienso y salado.
Insalubre	Sin Puntaje	Sabor pronunciado ácido, rancio y a sucio.

Tomado de Nelson and Trout (1964): p 96. Se estima normal un Puntaje de 31 - 40.

Lactofiltración

La prueba de lactofiltración o sedimentación tiene por objeto establecer la presencia de materias extrañas en la leche, las cuales además de ser inaceptables en un producto de buena calidad, indican que éste ha sido producido o procesado bajo condiciones inadecuadas de limpieza y saneamiento que a veces no pueden determinarse por métodos microbiológicos. Consiste en filtrar determinada cantidad del residuo con una serie de discos patrones preparados con cantidades conocidas de sedimento, o bien con patrones fotográficos (Nelson - Trout, 1964).

Mediante esta prueba es posible establecer la presencia de impurezas que han caído en la leche durante el ordeño y/o manejo hasta la planta, derivadas del establo, utensilios de ordeño, medios de transporte y almacenamiento, tales como pelos, excremento, fragmentos vegetales, metálicos, tierra, insectos o sus partes, etc.; los cuales se separan por filtración y pueden observarse a simple vista o con ayuda de una lupa.

El valor indicativo de esta prueba, sin embargo, no puede considerarse absoluto ya que la ausencia de sedimento en la leche no indica necesariamente que haya sido producida y manipulada bajo buenas condiciones sanitarias, pues el sedimento puede ser removido previamente por filtración o clarificación. En consecuencia, esta prueba debe ser complementada con inspecciones periódicas a las granjas o plantas procesadoras a objeto de comprobar las condiciones de producción o procesamiento. Actualmente esta determinación es poco empleada ya que es practica común a nivel de la unidad de producción filtrar la leche inmediatamente después del ordeño o antes de pasarla a los tanques de almacenamiento.

En la practica de laboratorio se empleara el procedimiento descrito en la norma CONVENIN 937 – 79.

Materiales y Equipos:

- ✓ Disco de algodón de 3.18 cm de diámetro, área de filtración 1.0160 2,86 cm (Kendall Co., Walpol., Mass. O Aamerican Dry Milk Institute, La salle, Chicago).
- ✓ Sedimentadores: tubo de sedimentación tipo aspirante o sedimentador King STS modelo KA.
- ✓ Tarjetas para prueba de sedimentación (Equipo de la casa Sediment Testing Supply Co 20. E., Jackson, Chicago, Illinois).

- ✓ Patrones fotográficos (U.S. Department of Agriculture, photography División Washington D.C.) (Newlander - Atherton, 1964: p.172).

Muestras:

- ✓ Leche cruda
- ✓ Leche pasteurizada de diversas marcas.

Procedimiento:

Analizar cada una de las muestras asignadas de la siguiente manera:

1. Colocar un disco de algodón en el sedimentador.
2. Mezclar muy bien la muestra para lograr su homogeneidad y hacerla pasar a través del disco usando una técnica conforme con el tipo de sedimentador empleado.
3. Retirar el disco del aparato, desecarlo en un desecador de vidrio y montarlo en el pequeño sobre de papel transparente encerado de una tarjeta especial para registrar resultados. La leche residual actúa como adhesivo.
4. Comparar el disco obtenido con los patrones fotográficos o con patrones preparados utilizando cantidades conocidas de sedimento.
5. Reportar los resultados obtenidos para cada muestra.

Prueba Lactométrica (Peso Específico)

Un lactómetro es un areómetro especialmente diseñado para determinar el peso específico (Pe) de la leche a una determinada temperatura, el cual está dotado de una escala especial dividida en grados Quevenne (°Q) o en grados de la junta de salud Pública de New York (°NBH). Los grados Quevenne corresponden a la segunda y tercera cifra decimal del valor del peso específico y equivalen a los grados NBH multiplicados por 0,29.

El lactómetro de Quevenne está calibrado a 60 °F (15,6 °C) es un areómetro de bulbo voluminoso y vástago graduado para lograr mayor sensibilidad. El vástago está graduado para dar lecturas comprendidas entre 15 y 40 °Q con divisiones de 0,5 o 1 °Q. El lactómetro de la Junta de Salud de New York (NBH) posee la escala graduada de 0 a 120 °F (37,7 °C) y ésta graduada de 26 a 37 ° NBH. Algunos de estos aparatos presentan termómetros incorporados

que miden la temperatura a la cual se hace la lectura lactométrica, facilitando la correspondiente corrección de la temperatura mediante tablas o nomogramas especiales (APHA, 1965, AOAC, 1965).

La leche tiene un peso específico de 1,028 a 1,034 ó 28 a 34 °Q que varía considerablemente con el contenido de grasa y de sólidos totales; así, la leche descremada tiene una densidad mayor (1,034 - 1,036). Un lactómetro permite por lo tanto hacer determinaciones aproximadas en las zonas de producción, en la receptoría o en el laboratorio, y detectar adulteraciones de la leche original por separación de la grasa, por adición de leche descremada o agua. Igualmente permite calcular en forma aproximada el contenido de sólidos no grasos a partir del contenido porcentual de grasa y la lectura lactométrica corregida para el factor temperatura. Conviene recordar, que el peso específico de la leche no debe determinarse recién ordeñada, sino después de 4 horas, ya que luego de la extracción ella sufre un proceso de contracción e incremento de peso específico hasta que se estabiliza.

El peso específico de la leche puede también determinarse por otros métodos, tal como el uso del picnómetro (AOAC, 1965) o mediante una balanza de Mohr - Westphal.

La norma COVENIN exige que la leche cruda y pasteurizada completa debe tener un peso específico entre 1,028 a 1,033 g/mL a 15 °C.

Materiales y Equipos:

- ✓ Lactómetro de Quevenne con termómetro
- ✓ Cilindro graduado (500 mL)

Procedimiento (COVENIN 367-82):

1. Enfriar la muestra asignada a una temperatura por debajo de 15 °C y transferirla a un cilindro graduado de 500 mL, evitando la formación de burbujas.
2. Introducir el lactómetro en la muestra dejándolo flotar libremente por 30 segundos, teniendo cuidado de que no se adhiera a las paredes del recipiente y de que no permanezcan burbujas en la superficie del líquido.
3. Tomar la lectura lactométrica cuando el termómetro del aparato marque exactamente la temperatura de calibración del lactómetro (60 °F ó 15,6 °C) y leyendo la división de la escala más alta que alcanza el menisco de la leche.

4. En caso de que la lectura se tome a una temperatura diferente a la de graduación del lactómetro deben hacerse las correcciones correspondientes empleando tablas especiales (AOAC 1975), o utilizando el factor de conversión de $\pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{Q}$, por cada grado que la temperatura de medición difiera de la temperatura de calibración del lactómetro.
5. Convertir la lectura lactométrica a peso específico y reportar los resultados obtenidos.

Pruebas de Laboratorio

Las pruebas de laboratorios incluyen aquellas pruebas que por la necesidad de equipos o materiales especiales, solo pueden ser realizadas dentro de los mismos. En este grupo se estudiarán la determinación de la acidez titulable, pH, tiempo de reducción del azul de metileno, tiempo de reducción de la resazurina, prueba del alcohol y lactofermentación.

Acidez Titulable

La leche fresca tiene una acidez titulable equivalente a 13 a 20 mL de NaOH 0,1 N/100 mL (0,12 - 0,18 % ácido láctico) debido a su contenido de anhídrido carbónico, proteínas y algunos iones como fosfato, citrato, etc. Normalmente la leche no contiene ácido láctico; sin embargo, por acción bacteriana la lactosa sufre un proceso de fermentación formándose ácido láctico y otros componentes que aumentan la acidez titulable. De allí que esta determinación represente valiosa información sobre la calidad sanitaria del producto. La legislación venezolana (COVENIN) establece para la leche cruda a ser higienizada en la industria, no menos de 15 ni más de 19 mL de NaOH 0,1 N/100 mL, justificando valores menores sólo cuando se deben a causas fisiológicas y de 20 mL por transporte a grandes distancias.

Existen diversos métodos para determinar la acidez en la leche. En nuestro medio se realiza por titulación con NaOH 0,1 N usando fenolftaleína en solución alcohólica como indicador y el resultado se expresa en términos de mL de leche de NaOH 0,1 N requeridos para neutralizar 100 mL de leche. En los Estados Unidos, en cambio, se emplea el sistema de expresión en términos de porcentaje ácido láctico y en Europa se usan diversos sistemas como son los grados Soxhlet-Henkel (mL de NaOH N/4 por 100 mL) o los grados Dornic (mL

NaOH N/9 por 100 mL). La conversión de estas unidades puede hacerse en base a las siguientes relaciones:

$$\begin{aligned} \text{mL NaOH } 0,1 \text{ N}/100 &= \% \text{ ácido láctico}/0,009 \\ &= \text{°S-H} \times 2,5 \\ &= \text{°D} \times 1,1 \end{aligned}$$

Para facilitar la determinación pueden emplearse buretas especiales - automáticas. En nuestro medio es frecuente el uso del denominado acidímetro cuya bureta presenta una graduación de 0 a 1% de ácido láctico que permite efectuar lectura directas de la acidez en esos términos, cuando se titulan 9 mL de leche.

Materiales y Equipos:

- ✓ Erlenmeyers de 100 mL o 50 mL
- ✓ Pipetas de 1 y 10 mL
- ✓ Buretas Graduadas

Reactivos:

- ✓ Hidróxido de Sodio (NaOH) 0,1 N
- ✓ Solución alcohólica de fenolftaleína al 1%
- ✓ Agua libre de CO₂ (destilada y hervida)

Procedimiento:

1. Medir 20 mL de la muestra homogénea a 20 °C, transferirla a un erlenmeyer de 250 mL y diluir con 40 mL de agua libre de CO₂. COVENIN especifica 10 mL de la muestra preparada a 20°C en fiola de 125 mL.
2. Adicionar 2 mL de la solución indicadora fenolftaleína.
3. Titular con la solución de NaOH 0,1 N, colocada en una bureta, hasta la aparición del primer tinte rosado persistente por 30 seg.
4. Expresar la acidez de la muestra en términos de mL NaOH 0,1 N por 100 mL, en porcentaje de ácido láctico, en grados Soxhlet - Kenkel y en grados Dornic.

Determinación pH

El pH normal de la leche fresca es de 6,5 - 6,7. Valores superiores generalmente se observan en leches mastíticas, mientras que valores inferiores indican presencia de calostro o descomposición bacteriana.

La determinación del pH de la leche puede hacerse por un método colorimétrico utilizando indicadores, pero resulta inexacto por la opacidad de la leche que interfiere en la lectura del color y además por que solo da valores aproximados. El método más adecuado es el electrométrico empleando un electrodo de vidrio en combinación con un electrodo de referencia. El potencial se mide directamente en términos de pH en la escala de un potenciómetro calibrado con una solución buffer de pH conocido.

Materiales y Equipos:

- ✓ Potenciómetro

Reactivos:

- ✓ Soluciones buffer para calibración de pH 4 y 7

Procedimiento:

1. Preparar el potenciómetro de acuerdo con las instrucciones del aparato y haciendo la calibración con la solución buffer de pH conocido (4 y 7).
2. Ajustar el control de temperatura del aparato a la temperatura de la muestra.
3. Medir el pH y anotar los resultados

Prueba del Alcohol (reacción de estabilidad proteica)

Como se ha indicado anteriormente, la leche fresca tiene una acidez de 13 - 20 mL de NaOH 0,1 N/100 mL y un pH de 6,5 - 6,7. Valores superiores de la acidez, con la consiguiente disminución del pH, se debe generalmente a descomposición bacteriana propia de leches de

baja calidad. Esta condición puede demostrarse mezclando la leche con igual volumen de Etanol de 72°, ya que el alcohol a esa concentración produce floculación o coagulación del producto cuando la acidez es igual o superior a 22,5 mL NaOH 0,1 N/100 mL. Una prueba de alcohol positiva indica también poca estabilidad de la leche al calor, lo cual es muy importante si el producto a de ser pasteurizado o esterilizado. Esta prueba es también útil para la detección de leche anormal como calostro o leches con alteraciones en el balance salino, que las hacen más susceptibles a la congelación; pero en este sentido, realmente no es una prueba confiable (MIF, 1964).

Materiales y Equipos:

- ✓ Tubos de ensayos
- ✓ Pipetas estériles

Reactivos:

- ✓ Alcohol etílico de 72°

Procedimiento:

1. En un tubo de ensayo colocar 5 mL de la muestra homogénea y 5 mL de etanol de 70°. Tapar el tubo.
2. Mezclar suavemente los líquidos invirtiendo el tubo 2 o 3 veces, sin agitación.
3. Observar a contraluz e inclinando el tubo en varias direcciones si ha ocurrido floculación o coagulación de la mezcla. Anotar las observaciones.

Tiempo de Reducción del Azul de Metileno

Esta prueba ha sido mal llamada “reductasa” cuando realmente esta enzima no interviene en ella. El verdadero principio es el siguiente: el potencial de óxido-reducción (Eh) de la leche fresca aireada es de +0,35 a +0,40 voltios (350 a 450 milivoltios), el cual se debe principalmente al contenido de oxígeno disuelto en el producto. Si por cualquier causa ese oxígeno es separado, el Eh disminuye. Esto ocurre cuando los microorganismos crecen en la leche y consumen el oxígeno. Si el número de microorganismo es muy elevado, el consumo de

oxígeno será mayor y por consiguiente el Eh caerá rápidamente; si por el contrario, el número de microorganismos es pequeño, el Eh disminuirá lentamente.

El principio anterior encuentra aplicación en la determinación de la calidad sanitaria de la leche, utilizando como indicador de óxido-reducción al azul de metileno (APHA, 1972) este se presenta de color azul en su forma oxidada y es incoloro en su forma reducida (leucobase). En solución acuosa de pH 7,0 su oxidación es completa a Eh +0,075 voltios y su reducción es completa a Eh - 0,015 voltios.

En la leche, por existir un pH menor de 7 (6.5 - 6.7), la reducción completa del azul de metileno ocurre a un Eh más positivo, habiéndose demostrado que esto tiene lugar a un Eh entre +0,075 a +0,225. El tiempo en horas que tarda en pasar el azul de metileno de su forma oxidada (azul) a la reducida (incolora) bajo condiciones controladas es proporcional a la calidad sanitaria de la leche y aunque no es posible establecer con exactitud el número de microorganismos, es factible clasificar el producto dentro de ciertos grados aceptables o no aceptables, en base a los siguientes valores:

Buena a excelente	más de 8 horas
Regular a buena	6 - 8 horas
Aceptable	2 - 6 horas
Mala	menos de 2 horas

Debe tenerse presente que la anterior clasificación no siempre es apropiada ya que existen otros factores que pueden afectar al tiempo de reducción, entre ellos, el tipo de microorganismo, el número de leucocitos, el periodo de exposición a la luz, la cantidad de oxígeno disuelto y la tendencia de la leche a elevar los microorganismos hacia la superficie a medida que se va separando la crema en el tubo de prueba. Es así como ciertos microorganismos (*Lactococcus lactis*) son más activos en su capacidad reductora que otros, mientras que existen algunas especies que son muy poco activas en este sentido (*Streptococcus agalactiae*, *Bacillus subtilis*, microorganismos termodúricos). Por otra parte, a medida que aumenta el número de leucocitos en la leche y su exposición a la luz natural o artificial, el tiempo de reducción tiende a reducirse, mientras que la agitación (al aumentar la

cantidad de oxígeno disuelto) y la tendencia de la crema a ascender (arrastrando los microorganismos) son factores que tienden a retardar el tiempo de reducción.

La inexactitud de este método para valorar la calidad sanitaria de la leche cruda en nuestro medio, donde prevalecen leches de baja calidad, ha sido señalada por Casas y Boscán (1974), quienes encontraron que solamente las muestras de leche con recuentos inferiores a 100.000 ufc/mL (unidad formadora de colonias/mililitro) muestran correlación entre su carga microbiana y el tiempo de reducción; mientras que en la inmensa mayoría, con recuentos muy superiores (más del 96%), no encontraron ninguna correlación entre la carga microbiana y las pruebas indirectas de calidad comúnmente empleadas, como son precisamente el tiempo de reducción del azul de metileno y la acidez titulable. Este hecho establece la necesidad de introducir métodos más apropiados para determinar la calidad de la leche cruda, los cuales, al mismo tiempo permitan obtener resultados que se ajusten a la realidad y llenen los requisitos de rapidez y economía necesarios en estas pruebas. La norma COVENIN 903.77 sustituyó el TRAM por el recuento estándar.

La "Resolución sobre leche y derivados" de Venezuela (MSAS, 1959) estipuló para la leche cruda, destinada a la higienización industrial, un tiempo mínimo aceptable de 4 horas. La norma COVENIN establece que para los efectos de compra-venta se podrá utilizar el TRAM de acuerdo a lo siguiente:

Clase I: leche fría con más de 4 horas de TRAM

Clase II: leche fría con 2 a 4 horas de TRAM

Clase III: leche caliente con 30 min. a 2 horas de TRAM

Materiales y Equipos:

- ✓ Baño María termorregulador con tapa
- ✓ Medidor de acero o pipetas del 10 mL (estériles)
- ✓ Pipeta de 1 mL (estériles)
- ✓ Tubos de ensayo con tapones de goma (estériles)
- ✓ Reloj, Frasco ámbar (250 mL)

Reactivos:

- ✓ Solución de azul de metileno.

Procedimiento (COVENIN 939-76):

1. Colocar los tubos de ensayo estériles con sus tapones en la gradilla y adicionar a cada uno 1 mL de la solución de azul de metileno.
2. Con pipeta o medidor estéril, colocar 10 mL de cada muestra a analizar en cada uno de los tubos sin mezclar. Rotular.
3. Durante la preparación de las diferentes muestras, los tubos pueden mantenerse en un baño de agua fría (0 - 5° C) pero nunca por más de 2 horas.
4. Una vez preparados todos los tubos, llevarlos al baño maría regulado a 36 °C junto con un tubo patrón (leche sin indicador). Cuando la temperatura de la muestra alcance $36^{\circ} \pm 1$ °C, mezclar el contenido de los tubos por inversión (3 veces) para obtener perfecta distribución del colorante y de la crema; tapar el baño María para mantener los tubos al abrigo de la luz.
5. Comenzar a contar el tiempo de reducción (decoloración) en el momento en que se invierten los tubos y observar su color frecuentemente durante la primera media hora, sin agitarlos. Una muestra se considera reducida cuando presenta 4/5 decoloradas.

Si una muestra se decolora durante un periodo de incubación de 30 minutos, registrar el resultado "tiempo de reducción 30 minutos". Seguidamente puede observarse el color de los tubos e intervalos de 1 hora, pero se registran los resultados en horas enteras; así por ejemplo: si a las 2 ½ horas se observa decoloración, el resultado se registra "tiempo de reducción en 2 horas".

Tiempo de Reducción de la Resazurina

En 1929 el indicador resazurina fue introducido en Alemania como un sustituto del azul de metileno para pruebas de reducción en leche, desde entonces esta prueba se ha venido utilizando cada vez más por requerir menos tiempo. La resazurina es más electropositiva y más sensible que el azul de metileno para detectar ligeros cambios en el potencial de oxido-

reducción, por lo que permite obtener resultados más rápidos (en 1 ó 3 horas) y mayor sensibilidad para reconocer la presencia de calostro y leches anormales.

La resazurina es una oxazona que imparte color azul a la leche. Por pérdida de oxígeno se reduce en dos etapas: en la primera pasa por diversas tonalidades de violeta hasta rojo-rosa, color éste que se atribuye a la formación de un compuesto denominado resorufina; a diferencia del azul de metileno esta etapa de reducción es irreversible, es decir, en contacto con el oxígeno del aire el color azul original no se restituye. Si la pérdida de oxígeno continúa, la reducción pasa a una segunda etapa reversible, en la cual la resorufina se reduce a dihidro-resorufina, compuesto incoloro que por oxidación puede pasar de nuevo a resorufina (rojo-rosa).

La prueba se realiza en la leche en forma similar a la del azul de metileno, pero las lecturas y la interpretación de los resultados deben hacerse siguiendo diferentes normas. Así, en la llamada "prueba de 1 hora" se incuban las muestras hasta 36 °C y al cabo de 1 hora se observa su color preferiblemente con luz fluorescente contra un fondo gris neutro, haciéndose la clasificación conforme a lo siguiente (Schonherr,1959):

Muy buena o excelente:	Azul celeste
Buena:	Violeta azulado
Mediana, regular (aceptable):	Violeta rojizo
Mala:	Rojo - rosa
Muy mala:	Incoloro

La llamada "prueba de la lectura triple" requiere un tiempo de 3 horas y consiste en comparar el color de las muestras incubadas con el de un patrón o "estándar" único (Munsell 5P 7/4) a tres intervalos de 1 hora. Las muestras se clasifican en 4 categorías según el tiempo que tardan en llegar más allá del color del patrón (intermedio entre azul y rojo-rosa) de acuerdo con la siguiente nomenclatura: TRR 1 hora, TRR 2 horas, TRR 3 + horas.

Materiales y Equipos:

- ✓ Los mismos empleados en TRAM
- ✓ Patrón de color Munsell 5P 7/4

Reactivos:

- ✓ Solución de Resazurina al 0,005%.

Procedimiento:

Para la "prueba de la triple lectura" proceder como se indica a continuación:

1. Preparar las muestras siguiendo el procedimiento utilizado para la prueba de azul de metileno pero con 1 mL de la solución de resazurina y 10 mL de leche. Rotular y mezclar suavemente.
2. Después de 1 hora de incubación (36 °C) comparar cada tubo con el patrón de color Munsell 5P 7/4. Aquellas muestras que hayan adquirido y sobrepasado el referido color se registran como TRR 1 hora. Es preferible continuar incubando todas las muestras debido a que se puede obtener de ellas información adicional según la rapidez con que continúe cambiando su color. Invertir suavemente los tubos una vez.
3. Al cabo de la segunda y tercera hora de incubación repetir el proceso de comparación del color y registrar los resultados observados como TRR 3 horas respectivamente, invirtiendo también los tubos en el segundo intervalo 1 vez.
4. Aquellas muestras que al cabo de 3 horas aún no hayan cambiado el color mas allá del patrón, pueden registrarse como TRR 3+ horas.

A veces puede observarse que después de una rápida reducción inicial, algunas muestras continúan el cambio de color muy lentamente. Esto suele ocurrir en casos de leches que contienen bacterias de poca actividad reductora o a la presencia de elementos no bacterianos como un gran número de leucocitos. La diferenciación puede hacerse por observación microscópica.

Prueba de Lactofermentación

Cuando una muestra de leche se incuba a la temperatura de 36 °C sufre un proceso de fermentación ocasionado por la flora presente en dicha muestra. Las características

organolépticas del producto obtenido permiten hasta cierto punto establecer la calidad de leche original y clasificarla dentro de ciertas categorías como son:

- Líquida: se mantienen en estados líquido, homogénea después de 24 horas. Corresponde a leche pobre en microorganismos, especialmente en gérmenes lactofermentadores. Se considera de óptima calidad.
- Gelatinosa: presenta un aspecto de coágulo gelatinoso; corresponde a leche rica en gérmenes lactofermentadores con predominio de los *Lactococcus* sp. que producen la coagulación. El coágulo puede ser homogéneo y sin gas, o bien puede contener a penas pequeñas burbujas de gas. Se considera de calidad aceptable.
- Gaseosa con suero separado: corresponde a una leche que ha sido coagulada pero luego se ha producido gas por gérmenes probablemente del grupo coliformes. Se considera pobre en calidad.
- Grumosa con gas: corresponde a leche de mala calidad, en la cual ha ocurrido un proceso de coagulación por gérmenes lactofermentadores, con actividad considerable de gérmenes gasógenos del grupo coliformes y además enzimas, tipo cuajo.
- Con cuajada tipo queso: se caracteriza por la formación de una cuajada bien definida, con separación completa del suero. Es ocasionada por la presencia de gran número de gérmenes que producen gran cantidad de enzimas tipo cuajo.

Esta prueba puede realizarse aprovechando las muestras utilizadas para las pruebas de reducción del azul de metileno, continuando la incubación de estas por 24 horas a 36 °C. Es conveniente tener en cuenta que la prueba de lactofermentación es solo una indicación de la posible calidad de leche, pero carece de valor concluyente, a no ser que se acompañe del recuento total de microorganismos y si es posible de una observación microscópica.

Materiales y Equipos:

- ✓ Los mismos empleados en el TRAM.

Procedimiento:

1. Colocar en tubos de ensayo rotulados 10 mL de cada muestra.

2. Tapar los tubos y llevarlos a una estufa de 36°C durante 24 horas.
3. Pasado el tiempo de incubación observar las características de la muestra y anotar las observaciones. Clasificar las muestras de acuerdo con los tipos señalados.

AUTOEVALUACIÓN

Una vez culminada la lectura usted debe responder las siguientes preguntas:

1. ¿Cuales son los componentes responsables del color, sabor y olor de la leche?
2. Que información importante puede obtener de las siguientes pruebas: sedimento, prueba lactométrica, pH, acidez titulable, TRAM, alcohol 72° y lactofermentación.
3. Explique el fundamento de las pruebas de pH, acidez titulable, TRAM, alcohol 72 ° y lactométrica.
4. Analice cuales y porque las pruebas estudiadas determinan indirectamente la calidad microbiológica de la leche.

Verifique que las respuestas emitidas por usted sean las correctas, de ser así, felicidades, asimilo usted la lectura y los conocimientos necesarios para este tema. Si las respuestas no fueron las correctas debe leer de nuevo con detenimiento el contenido de esta guía.

Bibliografía

1. A.O.A.C. Methods of Analysis of Association of Analytical Chemists. A.O.A.C., P.O. Box 540, Benjamin Franklin Station, Washinton 4, D.C. 1965.
2. ALAIS, CH. Ciencia de la Leche. Editorial Continental. 5ta Edición. México DF, México. 574 pp. 1984.
3. BRIÑEZ, W. J.; FARIA, J. F.; ISEA, W.; ARANGUREN, J. A. y VALVUENA, E. Efectos del Mestizaje, Etapa de Lactación y Número de partos de la Vaca Sobre la Producción y Algunos Parámetros de Calidad en Leche. Revista Científica, FCV-LUZ Vol VI – N° 1: 99-106. 1996.
4. COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma Venezolana Leche Cruda N° 903-93. 1993.
5. COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Leche Fluida. Determinación de Acidez Titulable N° 658-86. 1986.
6. COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Leche Fluida. Determinación de Densidad Relativa N° 367-82. 1982.
7. COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Leche y Productos Lácteos. Métodos para la toma de Muestras N° 938-83. 1983.
8. COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Leche y Productos derivados. Método de Ensayo. Reducción del Azul de Metileno N° 939-76. 1976.
9. FARIA, J. F. Algunas Características de Calidad Química de leche cruda del Distrito Perijá del Estado Zulia. (Trabajo de Ascenso). Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia. 22 pp. 1974.
10. FUENMAYOR, C.; CHICCO, C. F.; BODISCO, V. y CAPO, E. Estudio de los Componentes de la Leche de Vacas Holstein y Pardo Suizas Durante Cuatro Lactancias en Venezuela. Agronomía Tropical. Vol XXIII: 541-554. 1975.
11. ROBINSON, R. K. Microbiología lactologica. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España. Vol N° 1: 227 pp. 1987.

12. SANCHEZ, M.; BOSCAN, L. y DE JONGH, F. Características Físico-Químicas y Sanitarias de la Leche del estado Mérida, Venezuela. I. Zonas Altas. Revista Científica, FCV-LUZ Vol VI – N° 2: 99-110. 1996.
13. SANCHEZ, M.; BOSCAN, L. y DÍAZ, C. Características Físico-Químicas y Sanitarias de la Leche del estado Mérida, Venezuela. II. Zonas Bajas. Revista Científica, FCV-LUZ Vol VI – N° 2: 111-116. 1996.
14. VARGAS, T.; CHACON, E.; APONTE, J.; GARBATTI, J.; BELTRAN, J.; ARRIOJAS, L.; QUERALES, A. y DEMEY, J. Estudios Sobre la Calidad de la Leche en la Zona Norte del Estado Tachira. Congreso Venezolano de Zootécnia. San Juan de los Morros – Guárico, Venezuela. Vol I: 1021. 1994.
15. WALSTRA, P. y JANNES, R. Química y Física Lactológica. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España. 423 pp. 1987.